

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ERIEL FORVILLE DE ANDRADE

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS  
E FLORES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

CURITIBA

2014

ERIEL FORVILLE DE ANDRADE

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE  
FOLHAS E FLORES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, como requisito exigido para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lucia Masson

CURITIBA  
2014

---

A553c

Andrade, Eriel Forville de

Composição química e atividade biológica de extratos de folhas e flores de yacon (*smallanthus sonchifolius*) / Eriel Forville de Andrade. – Curitiba, 2014..

109f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientadora: Maria Lucia Masson.

Bibliografia: p. 96-104.

I. Yacon (*smallanthus sonchifolius*). 2. Antioxidantes. 3. Compostos fenólicos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lucia. III. Título.

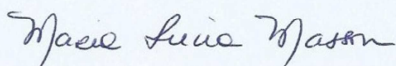
CDD: 664.8

---

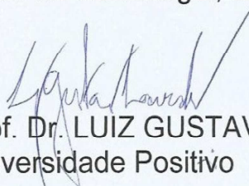
**ERIEL FORVILLE DE ANDRADE**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON (*Smallanthus  
sonchifolius*)**

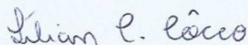
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão  
formada pelos professores:



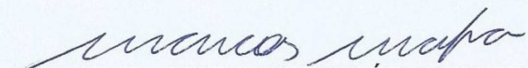
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. MARIA LUCIA MASSON  
Setor de Tecnologia, UFPR



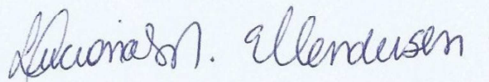
Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO LACERDA  
Universidade Positivo



Dr.<sup>a</sup>. LÍLIAN CRISTINA CÔCCO  
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA  
Setor de Tecnologia, UFPR



Dr.<sup>a</sup>. LUCIANA DE SOUZA NEVES ELLENDERSEN  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 10 de dezembro de 2014.

**À minha família, aos meus pais, Edson Forville de Andrade e Lígia Forville de Andrade, a minha esposa Heloisa Pacheco Braga por todo amor e confiança dedicados, sem o qual nada seria possível.**

**Com amor dedico a vocês este trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me concebido a vida, para que eu pudesse estar aqui escrevendo estes agradecimentos e por permitir que eu pudesse completar mais esta etapa da minha vida.

A minha orientadora professora Maria Lucia Masson, pela orientação e pela amizade construída durante este período de convivência.

Aos Amigos do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - (CEPPA) por se fazerem presentes sempre que necessário.

Ao CEPPA sem o qual seria impossível a realização do presente estudo, por disponibilizar toda sua estrutura física e de pessoal além de permitir a minha ausência para o cumprimento das exigências do programa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos (LACAUT).

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, em especial aos amigos, Danielle, João, Tiago, Érika.

A todos os amigos do Laboratório LATOS pela companhia durante esses anos.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética do departamento de Química da UFPR.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPEAL), por viabilizar a realização do estudo.

A CAPES pelos recursos utilizados na realização deste estudo.

“Sonhe como se fosse viver para sempre,  
viva como se fosse morrer amanhã”

James Dean

## RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é uma planta nativa da região dos Andes, introduzida no Brasil na década de 1980. As suas raízes são atribuídas algumas propriedades funcionais, conferida pelas fibras solúveis e insolúveis presentes nestas estruturas. Suas folhas são utilizadas no preparo de chá terapêutico, ao qual são atribuídas propriedades antidiabéticas. Estudos sugerem que os compostos fenólicos, presentes nestas folhas, são responsáveis pelo caráter antioxidante de seus extratos. Com relação às flores do yacon, até o momento inexistem estudos a respeito de sua composição química, assim como, das propriedades dos extratos obtidos a partir desta matriz. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos das folhas e flores do yacon obtidos por infusão, decocção e extração com metanol, assim como, avaliar a atividade antimicrobiana de lactonas sesquiterpênicas isoladas das folhas desidratadas de yacon. Após o processo de secagem as folhas e flores foram trituradas e os extratos foram quantificados a concentração de compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, flavonoides totais pelo método espectrofotométrico e da atividade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH e ABTS. Os compostos fenólicos foram identificados por meio da HPLC-DAD. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana de lactonas sesquiterpênicas, obtidas a partir das folhas de yacon. A identificação destes compostos foi realizada por meio da CG/MS e RMN. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela metodologia de Kirby-Bauer e a concentração inibitória mínima por micro diluição em placas. O extrato das folhas de yacon obtidos por decocção apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais (42,20 mgEAG/g e 39,71 mgER/g, respectivamente). O ácido gálico e a rutina foram os compostos fenólicos mais abundantes nos extratos das folhas de yacon (1,97 e 2,81 mg/g, respectivamente). A miricetina e o ácido gálico foram os fenólicos em maior concentração nos extratos provenientes das flores de yacon (16,09 e 1,36 mg/g, respectivamente). A decocção das folhas obteve os resultados mais expressivos, para atividade antioxidante por DPPH ( $EC_{50} = 220,50$  g/g DPPH) e a infusão por ABTS (422,13  $\mu$ M Trolox/g). Foi observada uma correlação positiva entre os resultados dos ensaios de compostos fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante dos extratos de folhas e flores de yacon. Nas folhas de yacon foi constatada a presença das lactonas enidrina e uvedalina em uma proporção de 3:1. Estas lactonas, apresentaram o potencial de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, com uma concentração mínima de 0,75 mg/mL. Desta maneira, os resultados obtidos neste estudo demonstram que, tanto os extratos das folhas quanto das flores de yacon são promissoras fontes de compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante e que as lactonas sesquiterpênicas, isoladas das folhas de yacon, podem vir se tornar alternativas no desenvolvimento de produtos com capacidade antimicrobiana, de interesse a indústria de alimentos.

Palavras chave: yacon; compostos fenólicos; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a plant that is native to the Andes region, which was introduced into Brazil in the 1980s. Some functional properties have been attributed to its roots, which are conferred by soluble and insoluble fibers present in their structure. Its leaves are used in the preparation of therapeutic tea, to which anti-diabetic properties are attributed. Studies suggest that the phenolic compounds present in these leaves are responsible for the antioxidant character of its extracts. There are no studies regarding the chemical composition of yacon flowers or the properties of extracts obtained from this matrix. Thus, the aim of this study was to evaluate the composition of phenolic compounds and the antioxidant activity of extracts of yacon leaves and flowers obtained by infusion, decoction and methanol extraction, as well as to assess the antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from dehydrated yacon leaves. The yacon leaves and flowers used in this study were collected in April 2011, in the city of São José dos Pinhais, Paraná, Brazil. After drying, the samples were crushed and the extracts were obtained. Experiments were conducted using the extracts to evaluate the concentration of total phenolics by the Folin-Ciocalteu method, total flavonoids by the spectrophotometric method and antioxidant activity by the DPPH and ABTS methods. The individual phenolic compounds were identified by HPLC-DAD. This study also evaluated the antimicrobial activity of the sesquiterpene lactones obtained from the dried yacon leaves. The identification of these compounds was performed by GC/MS and NMR. The evaluation of antimicrobial activity was performed by the Kirby-Bauer method, and the evaluation of the minimal inhibitory concentration was performed by the methodology of micro-dilution in plates. The extract of yacon leaves obtained by decoction had the highest amount of total phenolic compounds and total flavonoids (42.20 mgGAE/g and 39.71 mgRE/g, respectively). Gallic acid, and the flavonoid rutin were the most abundant phenolic compounds in the extracts of the yacon leaves (1.97 and 2.81 mg/g, respectively). The flavonoid myricetin, and gallic acid, were the phenolic compounds found in the highest concentration in the extracts from the yacon flowers (16.09 and 1.36 mg/g, respectively). The decoction of the yacon leaves showed the most significant results with respect to antioxidant activity using the DPPH method ( $EC_{50} = 220.50$  g/g DPPH) and infusion by the ABTS method (422.13  $\mu$ M Trolox/g). A positive correlation was observed between the results of the tests of phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity of the extracts from the yacon leaves and flowers. The NMR tests helped to elucidate the chemical structures of the sesquiterpene lactones extracted from the yacon leaves, revealing the presence of the lactones enhydrin and uvedalin in a ratio of 3:1. The experiments conducted to evaluate the antimicrobial activity of these lactones revealed the potential of these compounds to inhibit the growth of the *Staphylococcus aureus* microorganism, with a minimal inhibitory concentration of 0.75 mg/mL. Thus, the results of this study demonstrate that both the extracts from yacon leaves and flowers are promising sources of phenolic compounds with a high antioxidant potential, and that the sesquiterpene lactones isolated from yacon leaves could become alternatives in the development of products with antimicrobial properties of interest to the food industry.

Key words: yacon; phenolic compounds; antioxidant activity; antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CULTIVO DE YACON EM DIVERSAS REGIÕES DO MUNDO .....	25
FIGURA 2 – DETALHE DE EXEMPLAR DE <i>Smallanthus sonchifolius</i> (FOLHA E FLOR) .....	27
FIGURA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM FOLHAS DE YACON .....	31
FIGURA 4 – PRINCIPAIS TERPENOS PRESENTES NAS FOLHAS DE YACON .....	32
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS CLASSES DE FLAVONOIDES COM BASE NA POSIÇÃO DO ANEL AROMÁTICO BENZOPIRANO .....	34
FIGURA 6 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS CATEQUINAS .....	36
FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE PROCIANIDINA E PRODELFINIDINA .....	37
FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS .....	37
FIGURA 9 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE FLAVONONAS, ISOFLAVONAS, FLAVONÓIS E FLAVONAS .....	38
FIGURA 10 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CINÂMICO .....	39
FIGURA 11 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE REPRESENTANTES DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE SESQUITERPÊNOS .....	41
FIGURA 12 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS .....	43
FIGURA 13 – IMAGEM DE SATÉLITE DA ÁREA DO CULTIVO DO YACON UTILIZADO NESTE TRABALHO .....	44

FIGURA 14 – ESQUEMA DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) – MÉTODO DE MICRO DILUIÇÃO EM CALDO MUELLER - HINTON.....	55
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE FOLHAS DE YACON .....	58
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA REFERENTE AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE FLOR DE YACON .....	59
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS: (A) – FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) ÁCIDO GÁLICO, (2) ÁCIDO CAFEICO, (3) ÁCIDO P-COUMARICO E (4) ÁCIDO FERRÚLICO .....	67
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS: (A) – FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) ÁCIDO GÁLICO, (2) ÁCIDO CAFEICO, (3) ÁCIDO P-COUMARICO E (4) ÁCIDO FERRÚLICO .....	69
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON PARA A DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES: (A) – FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) RUTINA, (2) MIRICETINA E (3) QUERCITINA .....	71
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON PARA A DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES: (A) – FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) RUTINA, (2) MIRICETINA, (3) QUERCITINA E (4) KAEMPFEROL .....	72
FIGURA 21 – LACTONAS SESQUITERPÊNICAS PRECIPITADAS DURANTE O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	76
FIGURA 22 – ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE À SUBSTÂNCIA ENIDRINA.....	77
FIGURA 23 – ESPECTRO DE MASSA REFERENTE A SUBSTÂNCIA UVEDALINA.....	77

FIGURA 24 – ESTRUTURA DA ENIDRINA E DA UVEDALINA. (CARBONOS NUMERADOS CONFORME IUPAC) .....	81
FIGURA 25 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE $\delta$ 6,9 E $\delta$ 7,2 DO ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ QUANTITATIVO DA FRAÇÃO ENIDRINA MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE ENIDRINA ( $\delta$ 7,15) E UVEDALINA ( $\delta$ 7,01) (600 MHZ, SOLVENTE/REFERÊNCIA: $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) .....	81
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO ENIDRINA (600 MHZ, SOLVENTE/REFERÊNCIA: $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ).....	82
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO ENIDRINA (150 MHZ, SOLVENTE/REFERÊNCIA: $\text{CDCl}_3/\text{CDCl}_3$ ) .....	83
FIGURA 28 – ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-HSQC (EDITADO) DA FRAÇÃO ENIDRINA (SOLVENTE/REFERÊNCIA: $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) .....	84
FIGURA 29 – ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-HMBC DA FRAÇÃO ENIDRINA (SOLVENTE/REFERÊNCIA: $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ).....	85
FIGURA 30 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS AQUOSOS E METANÓLICOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON: (A) <i>Staphylococcus aureus</i> , (B) <i>Escherichia coli</i> E (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	86
FIGURA 31 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON: (A) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (B) <i>Escherichia coli</i> E (C) <i>Salmonella enterica</i> .....	88
FIGURA 32 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM RESULTADO POSITIVO CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	90
FIGURA 33 – ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> .....	91

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE TRÊS VARIEDADES DE RAÍZES DE YACON E DADOS DE PRODUTIVIDADE .....	29
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE YACON.....	29
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES EM FRUTAS E VEGETAIS (µg/g) .....	35
TABELA 4 – PERCENTUAL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS .....	39
TABELA 5 – GRANDIENTE DE ELUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	49
TABELA 6 – GRANDIENTE DE ELUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	50
TABELA 7 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON (g/100g) .....	57
TABELA 8 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON.....	59
TABELA 9 – MINERAIS PRESENTES EM FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON (mg/Kg) .....	61
TABELA 10 – RENDIMENTOS DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	62
TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON .....	63
TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	65

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON.....	67
TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON.....	68
TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON.....	70
TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON.....	71
TABELA 17 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E ABTS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E FOLHAS DE YACON .....	74
TABELA 18 – SINAIS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO NOS EXPERIMENTOS DE RMN 1D E 2D DA ENIDRINA .....	79
TABELA 19 – SINAIS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO NOS EXPERIMENTOS DE RMN 1D E 2D DA UVEDALINA .....	80
TABELA 20 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS AQUOSOS E METANÓLICOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	87
TABELA 21 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/DISCO NA AUSÊNCIA DE LUZ .....	88
TABELA 22 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/DISCO NA PRESENÇA DE LUZ.....	89
TABELA 23 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 90 µg/DISCO NA AUSÊNCIA DE LUZ .....	89

TABELA 24 – HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 90 µg/DISCO NA PRESENÇA DE LUZ..... 90

## LISTA DE ABREVIATURA

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	– <i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
AOCS	– <i>American Oil Chemists Society</i>
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
CEPPA	– Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
CG	– Cromatografia em Fase Gasosa
CG/MS	– Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de massas
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CLAE	– Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
DEPT	– Espectroscopia de RMN $^{13}\text{C}$ por Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização (do inglês “ <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> ”)
DMSO	– Dimetilsulfóxido
FOS	– Fruto-oligossacarídeo
ICP-OES	– Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente
LACAUT	– Laboratório de Análise de Combustíveis
NCCLS	– <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PPEGAL	– Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos
RMN	– Ressonância Magnética Nuclear
RMN $^1\text{H}$	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
STL	– Lactonas sesquiterpênicas
UFC	– Unidades Formadoras de Colônias
UV-VIS	– Ultravioleta e Visível
TSA	– Agar Triptona de Soja
( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-HMBC	– Espectroscopia de Coerência Heteronuclear através de muitas ligações entre $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (do inglês “ <i>Heteronuclear Correlations Over Longer Ranges</i> ”)



$(^1\text{H}-^{13}\text{C})$ -HSQC – Espectroscopia de correlação heteronuclear múltiplo-quântica entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (do inglês “*Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*”)

## LISTA DE SÍMBOLOS

Ba	– Bário
°C	– graus Célsius
Ca	– Cálcio
Cd	– Cádmió
Cu	– Cobre
d	– dupleto
dd	– duplo dupleto
ddd	– duplo duplo dupleto
dtd	– duplo tripleto duplo
eV	– eletron volt
Fe	– Ferro
g	– grama
H	– Hidrogênio
h	– hora
J	– constante de acoplamento
Kg	– kilo grama
L	– litro
M	– molar
m	– multipleto
Mg	– Magnésio
mg	– miligrama
mM	– milimol
mm	– milímetro
mL	– mililitro
Mn	– Manganês
nm	– Nanômetro
P	– Fósforo
Pb	– Chumbo
s	– simpletos
Sn	– Estanho

$\mu\text{m}$	– micrômetro
$\mu\text{L}$	– microlitro
Zn	– Zinco
$\delta$	– Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
3.1 YACON.....	24
3.2 HISTÓRICO .....	24
3.3 TAXONOMIA DA ESPÉCIE <i>Smallanthus sonchifolius</i> .....	26
3.4 CARACTERÍSTICAS E MORFOLOGIA BOTÂNICA.....	26
3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS DA PLANTA .....	28
3.5.1 Raízes .....	28
3.5.2 Folhas.....	29
3.6 COMPOSIÇÕES QUÍMICAS DAS FLORES DE YACON .....	33
3.7 ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL.....	33
3.8 FLAVONOIDES.....	34
3.8.1 Flavonoides em alimentos.....	36
3.8.2 Propriedades antioxidantes dos flavonoides .....	38
3.9 ÁCIDOS FENÓLICOS .....	39
3.9.1 Ácidos fenólicos em alimentos .....	39
3.10 SESQUITERPENOS .....	41
3.10.1 Lactonas sesquiterpênicas.....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1 MATERIAIS .....	44
4.1.1 Obtenção de folhas e flores de yacon .....	44
4.1.2 Secagem do material.....	45
4.1.3 Reagentes .....	45
4.1.4 Equipamentos .....	46
4.2 MÉTODOS .....	46
4.2.1 Caracterização da matéria-prima: folhas e flores de yacon.....	46
4.2.2 Metodologia de obtenção dos extratos das folhas e flores de yacon .....	47
4.2.3 Determinação do rendimento dos processos de extração.....	48
4.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos.....	48
4.2.5 Determinação de flavonoides totais .....	48
4.2.6 Determinação do perfil de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (clae-dad) .....	49
4.2.7 Atividade antioxidante – dpph e abts.....	51
4.2.7.1 Captura do radical dpph .....	51
4.2.7.2 Captura do radical abts <sup>•+</sup> .....	51
4.2.8 Processo de extração e purificação de lactonas sesquiterpênicas das folhas de yacon.....	52
4.2.9 Identificação de lactonas sesquiterpênicas isoladas de folhas de yacon (RMN e GC-MS/MS).....	53
4.2.10 Atividade antimicrobiana de lactonas sesquiterpênicas isoladas de folhas de yacon.....	54
4.2.11 Determinação da concentração inibitória mínima (cim) de lactonas sesquiterpênicas isoladas de folhas e flores de yacon.....	55

4.2.12 Análise estatística .....	56
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FOLHAS E FLORES DE YACON ....	56
5.1.2 Perfil de ácidos graxos .....	57
5.1.3 Determinação da concentração de minerais das flores e flores de yacon .....	60
5.2 RENDIMENTOS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON .....	61
5.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	63
5.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON .....	64
5.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON POR HPLC-DAD.....	66
5.5.1 Ácidos fenólicos .....	66
5.5.2 Flavonoides .....	69
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON – MÉTODO DPPH .....	73
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - ABTS DE EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON.....	74
5.8 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LTS) DAS FOLHAS DE YACON .....	75
5.9 ENSAIOS DE CG – EM.....	76
5.10 IDENTIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON POR MEIO DA RMN .....	78
5.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS E FLORES DE YACON E LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON .....	86
5.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON .....	87
5.13 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) IN VITRO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> .....	91
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>93</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>106</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>107</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>108</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O yacon, é uma espécie nativa da região andina, que originalmente foi classificado como *Polymnia sonchifolia* por [Poepp&Endl] H. Robinson. Atualmente, é classificada como *Smallanthus sonchifolius*, espécie representante da família *Asteraceae* (OLIVEIRA; NISHIMOTO, 2004).

O cultivo do yacon foi introduzido no Brasil por imigrantes japoneses no final da década de 1980, para a produção de chá, por acreditarem nas propriedades antidiabética das folhas. O estado de São Paulo foi o pioneiro no cultivo comercial do yacon na década de 1990, no município de Capão Bonito (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, diversos estudos sugerem que o yacon apresenta importante valor funcional, devido às propriedades fitoquímicas dos compostos: frutooligosacarídeos, ácidos clorogênicos, L-Triptofano, ésteres do ácido cafeíco, ácido ferrúlico e óleos essenciais, como o óleo  $\beta$ -pineno, cariofileno e  $\gamma$ -cardineno, presentes em suas folhas e raízes (OJANSIVUA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SIMONOVSKA *et al.*, 2003).

A principal forma de consumo do yacon é a *in natura*, sendo a raiz tuberosa, de gosto doce, a parte mais consumida. Outra forma de utilização da raiz do yacon é para a produção de xaropes destinados a indivíduos com problemas digestivos (SIMONOVSKA *et al.*, 2003). Recentes estudos demonstraram os benefícios da ingestão de extrato das raízes do yacon no tratamento da infertilidade de indivíduos com hipogonadismo colaborando para a manutenção dos níveis de testosteronas destes indivíduos (PARK e HAN, 2013).

Diversas propriedades benéficas são atribuídas às folhas do yacon quando estas são utilizadas no preparo de chá na medicina popular (AYBAR *et al.*, 2001). O extrato preparado a partir das folhas possuem várias propriedades fitoquímicas como atividade antimicrobiana (LIN *et al.*, 2003), anti-inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e antioxidante (VALENTOVÁ *et al.*, 2003).

O isolamento de substâncias do exudado de tricomas glandulares das folhas de *Smallanthus sonchifolius*, como diterpenóides do tipo ent-kaurene e compostos como as lactonas sesquiterpênicas sonchifolina, polimatina, uvedalina e enidrina,

demonstraram atividade antifúngica para *Perycularia oryzae*, fungo causador de doenças no arroz (INOUE *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Joung *et al.* (2010), demonstraram que extratos obtidos pela extração das folhas de yacon com n-hexano apresentam uma excelente atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*, resistente ao antibiótico meticilina. Este micro-organismo é tido como um problema de saúde pública por ser associado a eventos de infecção hospitalar. Ainda neste estudo foi observada uma potencialização no efeito antimicrobiano destes extratos, quando os experimentos foram realizados na presença de luz a uma intensidade de 4000 lux.

OLIVEIRA *et al.* (2013) observaram o efeito antiedematoso *in vivo* de extratos de folhas de yacon, sugerindo que este efeito se dá pela presença da lactona sesquiterpênica enidrina presentes em concentrações apreciáveis nestes extratos.

Estudos sobre as propriedades fitoquímicas das flores de yacon e de extratos obtidos a partir destas estruturas são escassos na literatura, no entanto, algumas características comuns à família *Asteraceae* podem ser atribuídas, como a presença de flavonoides e ácidos fenólicos, tornando-as desta maneira, promissoras fontes destes compostos.

Desta forma, o estudo de extratos e compostos provenientes das folhas e flores de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é de grande importância, uma vez que estes extratos constituem-se como potenciais fontes de substâncias bioativas de valor biológico que futuramente podem vir a ser utilizadas pela indústria de alimentos e outras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar a composição química e a atividade biológica dos extratos de folhas e flores de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e a atividade antimicrobiana de lactonas sesquiterpênicas isoladas das folhas desidratadas de yacon.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que os objetivos deste trabalho pudessem ser alcançados, foram realizadas as seguintes etapas:

- Caracterização físico-química da matéria-prima (folhas e flores de yacon);
- Determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de folhas e flores de yacon;
- Determinação da concentração de flavonoides totais dos extratos de folhas e flores de yacon;
- Extração, identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides individuais, dos extratos de folhas e flores de yacon;
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de folhas e flores de yacon;
- Extração, isolamento e identificação de lactonas sesquiterpênicas de folhas desidratadas de yacon;
- Avaliação da atividade antimicrobiana de lactonas sesquiterpênicas extraídas de folhas de yacon.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 YACON

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*), espécie originária da região andina, recebe diferentes denominações nas línguas dominantes dessa região (Aymara e Quéchua). No dialeto Aymara os termos *aricoma* e *aricuma* são os mais utilizados. No dialeto Quéchua os termos empregados são *llaqon*, *llacum*, *llacuma* e *yacumpi*. Já na região do Equador a espécie é conhecida pelo nome de *jicama*, *chicama*, *shicama*, *jiquima* e *jiquimilla*, e na Colômbia o termo *arboloco* é o mais utilizado. Nas demais regiões do mundo, o yacon recebe denominações diferentes daquelas utilizadas na região de origem, como por exemplo, *Poire de terre* na França e *Yacon strawberry* na Inglaterra (GRAU e REA, 1997).

#### 3.2 HISTÓRICO

O cultivo e consumo do yacon datam dos tempos pré-incas, nas regiões de clima temperado entre a Colômbia e Venezuela até o nordeste da Argentina, em altitudes que podem variar de 2000 a 3400 metros (SANTANA; CARDOSO, 2008).

Nas últimas três décadas, seu cultivo foi expandido para outros países como Estados Unidos, Nova Zelândia e Japão, onde estão ampliando as áreas destinadas à produção do yacon, mas ainda sem grande representatividade comercial. A partir, da introdução do cultivo do Yacon no Japão observou-se o surgimento de novas regiões produtoras como Coréia e Brasil (GRAU; REA, 1997). No Brasil, o yacon foi introduzido como cultivo comercial no ano de 1991, na cidade de Capão Bonito (SP) (OLIVEIRA; NISHIMOTO, 2004).

Atualmente, a região de maior destaque na produção do yacon é a andina, caracterizada pela agricultura familiar destinada ao consumo próprio. As parcelas destinadas à comercialização não ultrapassam um hectare, o que representa uma importante alternativa para a agricultura de subsistência. O yacon não é muito

cultivado nos países sul-americanos, por se tratar de um alimento de baixo valor calórico, onde o cultivo de batata e milho é priorizado para a alimentação da população (GRAU; REA, 1997).

Devido às propriedades medicinais atribuídas ao yacon, o interesse comercial por esta espécie teve um aumento significativo nos mercados das cidades, levando ao desenvolvimento das atividades comerciais em torno de seu cultivo (SANTANA; CARDOSO, 2008). Na região dos Andes, as raízes do yacon são consideradas frutas e consumidas descascadas como ingredientes de saladas de frutas. Uma prática convencional da região é expor os tubérculos ao sol durante alguns dias para acentuar as características sensoriais para o consumo (OJANSIVU *et al.*, 2011). Uma grande variedade de produtos derivados do yacon pode ser encontrada nos supermercados dos países de toda a América Latina, como Peru, onde, comumente são disponibilizados produtos como xaropes, sucos, marmeladas e chás das folhas (FIGURA 1) (OJANSIVU *et al.*, 2011).

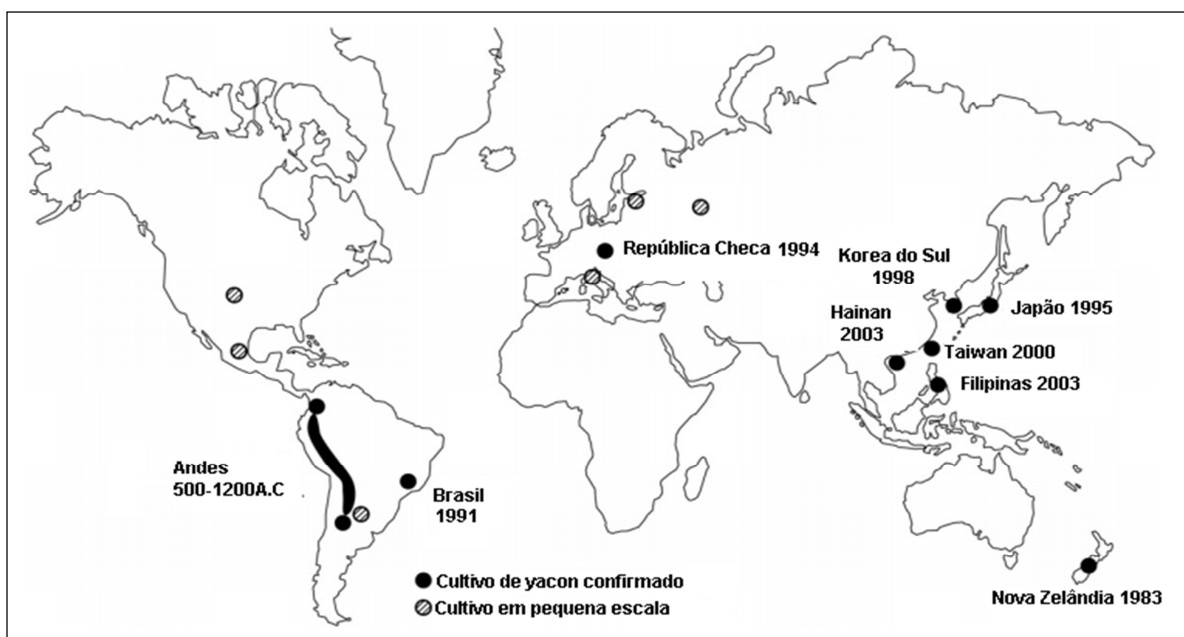


FIGURA 1 – CULTIVO DE YACON EM DIVERSAS REGIÕES DO MUNDO

FONTE: OJANSIVU *et al.*, (2011)

### 3.3 TAXONOMIA DA ESPÉCIE *Smallanthus sonchifolius*

O yacon é um representante da família *Asteraceae* (*Compositae*), cujo nome científico é denominado *Smallanthus sonchifolius* [(Poepp. & Endl.) H. Robinson]. Na literatura científica também pode ser chamado de *Polymnia sonchifolia*, (Poepp. & Endl.) ou *Polymnia edulis* (Wedd) (FIGURA 2).

Segundo Ojansivu *et al.* (2011) e Santana; Cardoso (2008), a sua classificação taxonômica é:

- Super-reino: *Eucarionte*;
- Reino: *Plantae*;
- Sub-reino: *Embriófita*;
- Filo: *Tracófitas*;
- Superclasse: *Angiosperma*;
- Classe: *Dicotiledônea*;
- Ordem: *Asterales*;
- Família: *Asteraceae* (*Compositae*);
- Gênero: *Smallanthus*;
- Espécie: *sonchifolius*.

### 3.4 CARACTERÍSTICAS E MORFOLOGIA BOTÂNICA

O yacon é uma planta perene herbácea que pode medir de 1,5 a 3 m de altura. O desenvolvimento desta espécie é extremamente adaptável ao clima, à altitude e aos tipos de solo, sendo caracterizado como uma planta rústica e resistente a períodos de seca (FIGURA 2) (SANTANA; CARDOSO, 2008).

O sistema radicular é composto por três partes: rizoma, raízes fibrosas e raízes de reserva ou tuberosas. Os rizomas são ricos em fibras não digestíveis e neles são encontradas gemas que dão origem a novas plantas. As raízes fibrosas têm função de fixação da planta no solo e absorção de água e nutrientes. As raízes tuberosas, parte comestível da planta, variam de 4 a 20 cm, e podem pesar até 1000 g (GRAU e REA, 1997).

O sistema aéreo da planta é constituído de caule cilíndrico ou sub-angular com a presença de gemas vegetativas e florais. As folhas inferiores apresentam forma ovalada com hastes ou sub-hastes, conectadas e articuladas com a base (FIGURA 2). As folhas superiores apresentam forma oval-lanceolada sem haste; tanto a epiderme superior quanto a inferior são recobertas por tricomas (0,8 a 1,5 mm de comprimento por 0,05 mm de diâmetro); e suas glândulas contêm compostos terpênicos (AYBAR *et al.*, 2001; GRAU e REA , 1997).

As inflorescências se apresentam na posição terminal, composta por três a cinco flores, cada uma com três capítulos e cinco brácteas. A flor apresenta cor amarelo brilhante a alaranjado, com 12 mm de comprimento e 7 mm de largura, e as cispselas (pseudo frutos de *Asteraceae*) são de coloração roxo, tendendo a marrom na maturidade (FIGURA 2).



FIGURA 2 – DETALHE DE EXEMPLAR DE *Smallanthus sonchifolius* (FOLHA E FLOR)

FONTE: O autor (2014)

### 3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS DA PLANTA

#### 3.5.1 RAÍZES

As raízes tuberosas do yacon possuem características sensoriais agradáveis, com sabor semelhante àqueles encontrados em frutas como o melão, que possui polpa amarelada e crocante com alto teor de água, variando entre 85 a 90% (VALENTOVÁ *et al.*, 2008).

Diferentemente da maioria das raízes de reserva, o yacon não armazena carboidratos na forma de amido e sim como oligossacarídeos (frutooligossacarídeos (FOS) e sacarose) e monossacarídeos (frutose e glicose) (GRAEFE *et al.*, 2004). As concentrações de açúcares, presentes na matéria seca do yacon, variam entre 40 a 70% de FOS, 5 a 15% de frutose e sacarose, e inferiores a 5% de glicose (MARIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2003).

Os carboidratos de reserva mais abundantes nos órgãos subterrâneos do yacon são os frutanos do tipo inulina com grau de polimerização (GP) > 10 (OLIVEIRA, 2004). Esse tipo de açúcar é naturalmente encontrado em diversos tipos de plantas, no entanto, raramente em concentrações elevadas. Os FOS são quimicamente formados por uma molécula de glicose ligada em duas a dez moléculas de frutose. As ligações entre as moléculas são resistentes à hidrólise enzimática do sistema digestivo humano, reduzindo drasticamente o valor calórico deste carboidrato, como mostra a tabela 1 (MARIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2005). Os FOS são reconhecidos como fibras solúveis e o seu consumo auxilia a reposição da flora intestinal e aumento da absorção de cálcio (ZULETA; SAMBUCETTI, 2001).

As proteínas e lipídeos são responsáveis por aproximadamente 2,4 a 4,3% e 0,14 a 0,43% de matéria seca, respectivamente. Os principais nutrientes são: potássio, cálcio, fósforo, magnésio, sódio e ferro, destacando-se o potássio, que é encontrado em quantidades significativas de aproximadamente 230 mg de matéria fresca comestível (MARIQUE; PÁRRAGA; HERMANN, 2003).

Segundo Simonovska *et al.* (2003), os compostos fenólicos (ácido clorogênico e cafeíco e o aminoácido triptofano), presentes nos tubérculo de yacon, conferem propriedades antioxidativas à raiz. Takenaka (2003) constatou nos tubérculos de yacon a presença de três isômeros do ácido cafeoil: o 6,8 – dioxabicyclo [3,2,1]), (ocatano, o 2 – o – caffeoyl) e o ( 3 – o – caffeyol).

Recentes estudos demonstraram os benefícios da ingestão de extrato das raízes do yacon no tratamento da infertilidade de indivíduos com hipogonadismo colaborando para a manutenção dos níveis de testosteronas destes indivíduos (PARK e HAN, 2013).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE TRÊS VARIEDADES DE RAÍZES DE YACON E DADOS DE PRODUTIVIDADE

Variedade	SAL136	AKW5075	ARB5073
Matéria Seca (g/Kg)	136	98	115
Carboidratos Totais (g/Kg)	127	89	105
FOS (g/Kg)	89	31	61
Frutose (g/Kg)	2,8	2,3	4,4
Glicose (g/Kg)	4,6	21,1	7,5
Sacarose (g/Kg)	12	19	14
Proteína (g/Kg)	3,3	3,5	0,49
Lipídeo (g/Kg)	0,19	0,29	0,31
Fibra (g/Kg)	3,6	3,5	3,7
Potássio (mg)	2859	1969	1999
Rendimento t/ha <sup>2</sup>	23	84	10

FONTES: MARIQUE; PÁRRAGA; HERMANN (2003)

### 3.5.2 FOLHAS

A composição química das partes aéreas do yacon pode variar de acordo com o tipo do manejo, solo, clima e região do cultivo. Valentová e Ulrichová (2003) apresentaram a composição média dos nutrientes presentes na folha seca de yacon,

conforme mostram as tabelas abaixo (TABELA 2). As folhas frescas do yacon apresentam aproximadamente 80% de água.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE YACON

FOLHAS DESIDRATADAS DE YACON	
PARÂMETROS	g/100g
Umidade	10,47
Proteína	21,48
Lipídeo	4,20
Cinza	12,52
Fibra	11,63
PARÂMETROS	mg/100g
Cálcio	1805
Fósforo	543
Ferro	7,29
Cobre	<0,5
Manganês	<0,5
Zinco	2,93

FONTE: VALENTOVÁ e ULRICHOVÁ, (2003)

Estudos realizados por Simonovska *et al.* (2003), demonstraram a presença dos compostos fenólicos: ácido clorogênico (FIGURA 3 (1a)), ácido ferrúlico (FIGURA 3 (1b)) e ácido cafeíco (FIGURA 3 (1c)), como constituintes das folhas de yacon, que conferem importante poder antioxidante ao extrato obtido desta matéria prima.

Os óleos essenciais também estão presentes nas folhas de yacon, tendo destaque o:  $\beta$ -pineno, cariofileno e  $\gamma$ -cardineno (ADAM *et al.*, 2005).

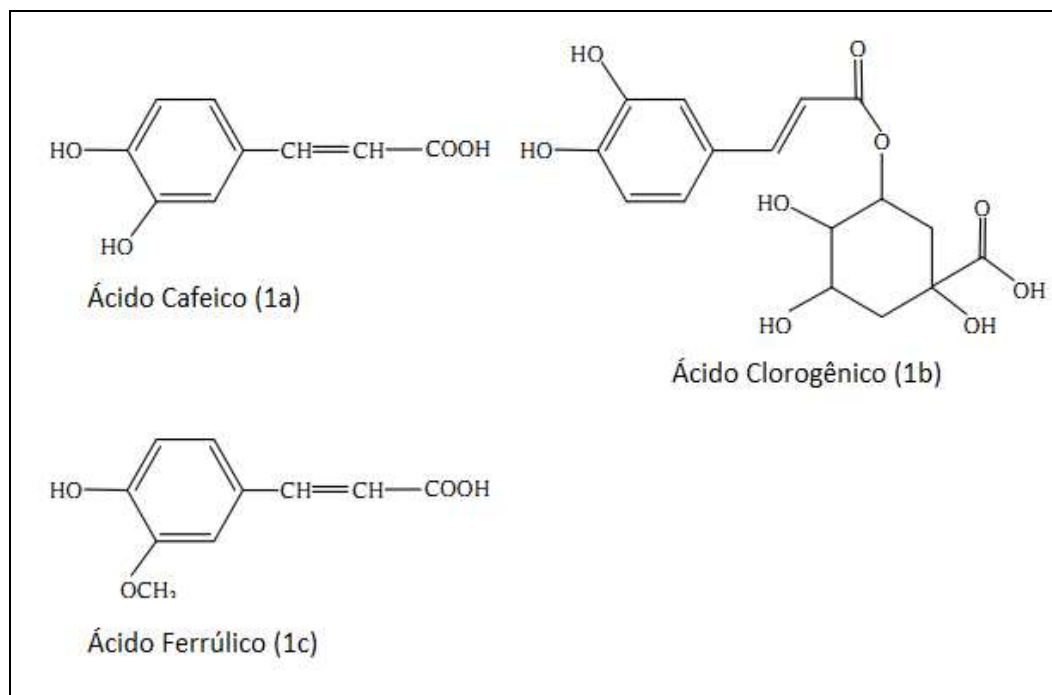


FIGURA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM FOLHAS DE YACON

FONTE: SIMANOVSKA *et al.*, (2003)

Estudos fitoquímicos realizados com os tricomas (estruturas de defesa), presentes nas folhas do yacon, demonstraram a presença de lactonas sesquiterpênicas (STL) pertencentes à classe dos melampolideos, que apresentam importante capacidade antifúngica. No extrato alcoólico das folhas foram identificadas as lactonas sesquiterpênicas: enidrina, uvedalina, sonchifolina, ácido ent-kaurênico (FIGURA 4) e da lactona fluctuanina; além de dois novos tipos de melampolideos: os ésteres metílico do ácido 8 $\beta$  – tigloyloxymelampolid – 14 - oic e o 8 $\beta$  - methacryloyloxymelampolideo (CHROO *et al.*, 2003; OJANSIVU *et al.*, 2011).

Oliveira *et al.* (2013) observou o efeito antiedematoso *in vivo* de extratos de folhas de yacon, sugerindo que este efeito se dá pela presença de lactona sesquiterpênica como a enidrina.



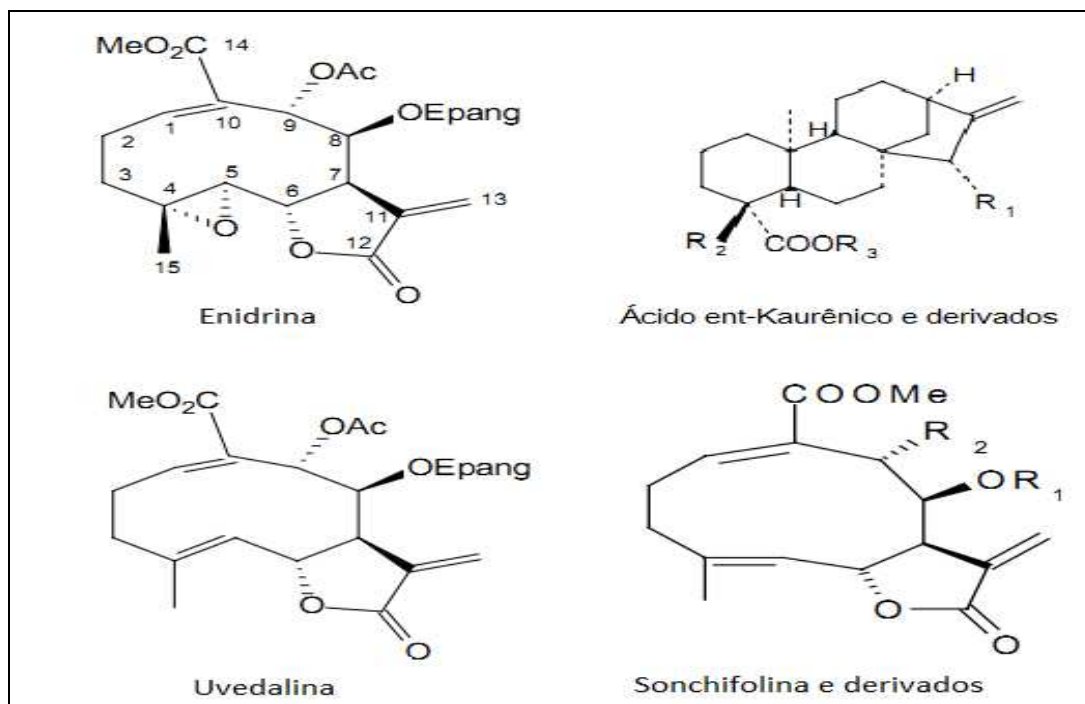


FIGURA 4 – PRINCIPAIS TERPENOS PRESENTES NAS FOLHAS DE YACON

FONTE: VALENTOVÁ e ULRICKOVÁ, (2003); SCHORR e DA COSTA, (2003)

Em países como Japão e Brasil as folhas do yacon vêm sendo utilizadas como matéria prima para a produção de infusão (chá), a qual é conhecida e consumida na medicina popular para o tratamento da diabetes melito. As demais partes da planta como flores e caules, podem ser utilizadas como forragem para rebanhos devido a importante carga proteica presentes nestas estruturas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Aybar *et al.* (2001), demonstraram que as cobaias (camundongos) portadoras de diabetes melito, tratadas durante um período de 30 dias com extrato aquoso de folhas de yacon numa concentração de 2%, apresentaram um aumento significativo dos níveis de insulina circulantes no plasma sanguíneo, por estimular a secreção deste hormônio e inibir a sua degradação por substâncias presentes na planta.

Estudos realizados em camundongos demonstraram que o uso prolongado do extrato liofilizado das folhas de yacon em concentrações elevadas, cerca de 100 mg/Kg, pode ocasionar danos renais sérios quando utilizado desta maneira (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Barcellona *et al.* (2012), apresentaram um estudo demonstrando que a administração via oral de extratos obtidos, a partir da decocção de folhas de *Smilax sonchifolius*, a cobaias (camundongos) é segura em dose máxima de

0,28 g/kg por dia, promovendo um efeito hiperglicêmico nos indivíduos submetidos a este tratamento, contrapondo os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2011).

### 3.6 COMPOSIÇÕES QUÍMICAS DAS FLORES DE YACON

Estudos relacionados às propriedades químicas das flores de yacon são muito escassos, no entanto, algumas características comuns à família *Asteraceae* podem ser atribuídas a elas.

Um dos principais componentes químicos das flores da família *Asteraceae* são os óleos essenciais. Na pesquisa desenvolvida por Maggi *et al.* (2009) em flores da espécie *Anchillea linguistica* (*Asteraceae*), revelou a presença de 101 componentes no óleo essencial, dos quais, 38 foram identificados pela primeira vez nesta espécie, tendo destaque o linolol, viridiflorol,  $\beta$ -pineno, 1,8 cineole e terpinen-4-ol.

Flavonoides glicosídicos, flavonoides aglicosídicos e compostos fenólicos, são importantes constituintes químicos nas flores de mesma espécie da família do yacon. Em estudos realizados por Nováková *et al.* (2010) com flores de camomila (*Matricaria recutita* L.-*Asteraceae*), demonstrou a presença de 12 compostos entre flavonoides, ácidos fenólicos e cumarinas, sendo o apigenina-7-glicosídica, ácido clorogênico, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, ácido cafeíco, umbelliferona, quercetina-3-glicosídicas, luteolina, apigenina, isorhamentina, kaempferol e rutina, os principais representantes destes grupos de compostos.

### 3.7 ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL

Os processos oxidativos que ocorrem no metabolismo humano são um dos fatores mais importantes no desencadeamento de doenças cardiovasculares, de doenças do sistema imunológico, de disfunções cerebrais, de câncer e do envelhecimento. Quando o sistema imune humano é suprimido por uma excessiva produção de agentes oxidantes, os ácidos nucléicos, os lipídeos e as proteínas podem sofrer danos, acarretando injúrias aos tecidos. Desta maneira, o aumento da

ingestão de antioxidantes naturais auxilia na manutenção do balanço entre os agentes antioxidantes e oxidantes, diminuindo ou evitando que esses processos ocorram (TAI *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que frutas e vegetais são protetores contra as doenças oxidativas, devido ao caráter anti-oxidativos das suas vitaminas e minerais e compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonoides (PIETTA e SIMONETTI, 1999).

### 3.8 FLAVONOIDES

Flavonoides são fitoquímicos comumente encontrados em plantas, os quais possuem efeitos positivos à saúde humana. Aproximadamente 4000 flavonoides vêm sendo identificados e estudados quanto as suas propriedades funcionais (PETERSON e DWYER, 1998).

Estruturalmente, os flavonoides são caracterizados por uma cadeia carbônica de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (fenil-benzopirano). Com base na posição da ligação do anel aromático benzopirano, podemos dividir este grupo em três classes: flavonoides (2-fenil-benzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos) e neoflavonoides (4-benzopiranos) (FIGURA 5).

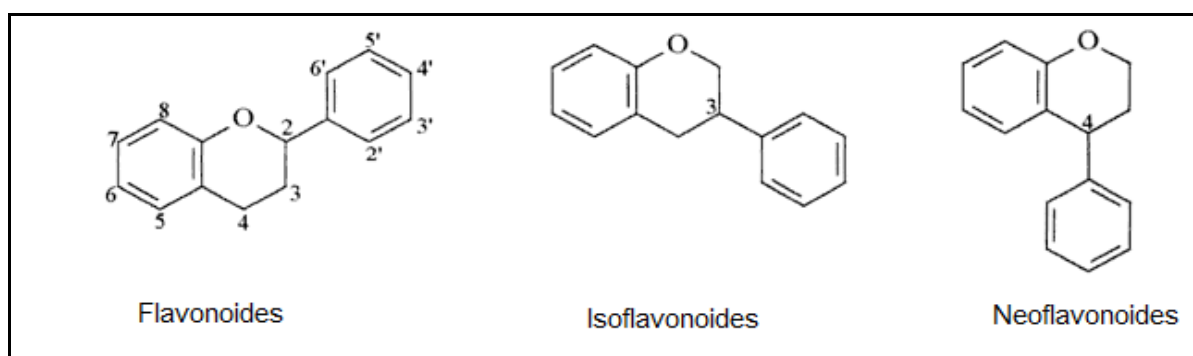


FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS CLASSES DE FLAVONOIDES COM BASE NA POSIÇÃO DO ANEL AROMÁTICO BENZOPIRANO

FONTE: MARAIS *et al.*, (2007)

Os flavonoides mais comumente encontrados em alimentos são as catequinas, proantocianinas, antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavononas e seus glicosídeos (TABELA 3) (PIETTA e SIMONETTI, 1999).

Os flavonoides são considerados nanonutrientes, no entanto, são componentes importantes na dieta humana, podendo chegar ao consumo diário de 1g. Grande parte desta mistura de flavonóides é oriunda de bebidas como vinhos (300 mg de compostos fenólicos totais) e chás, os quais podem contribuir com elevadas concentrações destes compostos (150 mg de catequinas). No chá verde são encontrados os flavonoides, flavonol, epicatequina, epigallocatequina e seus ésteres. Em frutas e vegetais, a presença de flavonóis e flavonas tem uma menor contribuição (> 50 mg/dia) (SIMONETTI; PIETTA; TESTOLIN, 1997).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES EM FRUTAS E VEGETAIS (µg / g)

<b>FONTE</b>	<b>Rutina*</b>	<b>Quercetina*</b>	<b>Kaempferol*</b>
<b>VEGETAIS</b>			
Batata	nd <sup>a</sup>	nd	23,40
Tomate	0,9	1,58	7,50
Pimentão Verde	21,70	14,10	3,17
Berinjela	Nd	1,58	Nd
Cenoura	4,38	nd	7,20
Salsa	Nd	7,03	45,10
Radish	Nd	nd	3,36
Repolho	5,54	nd	7,20
Brócolis	1,17	9,77	16,10
Alface	Nd	4,78	Nd
Cebola	Nd	33,70	10,9
Pepino	1,89	nd	7,61
<b>FRUTAS</b>			
Kiwi	Nd	2,07	30,60
Melancia	Nd	nd	18,10
Laranja	Nd	17,50	31,50
Pêssego	Nd	1,08	6,54
Maçã	Nd	5,27	26,70
Uva	8,24	nd	16,80

<sup>a</sup> = Não detectado

FONTE: PIETTA e SIMONETTI, 1999

### 3.8.1 FLAVONOIDES EM ALIMENTOS

As catequinas estão amplamente distribuídas nas plantas, no entanto, apenas chás feitos das folhas destas plantas são ricos em catequinas, representando 25% do peso seco das folhas (PIETTA e SIMONETTI, 1999). Na Figura 6 são apresentadas as fórmulas estruturais de algumas catequinas.

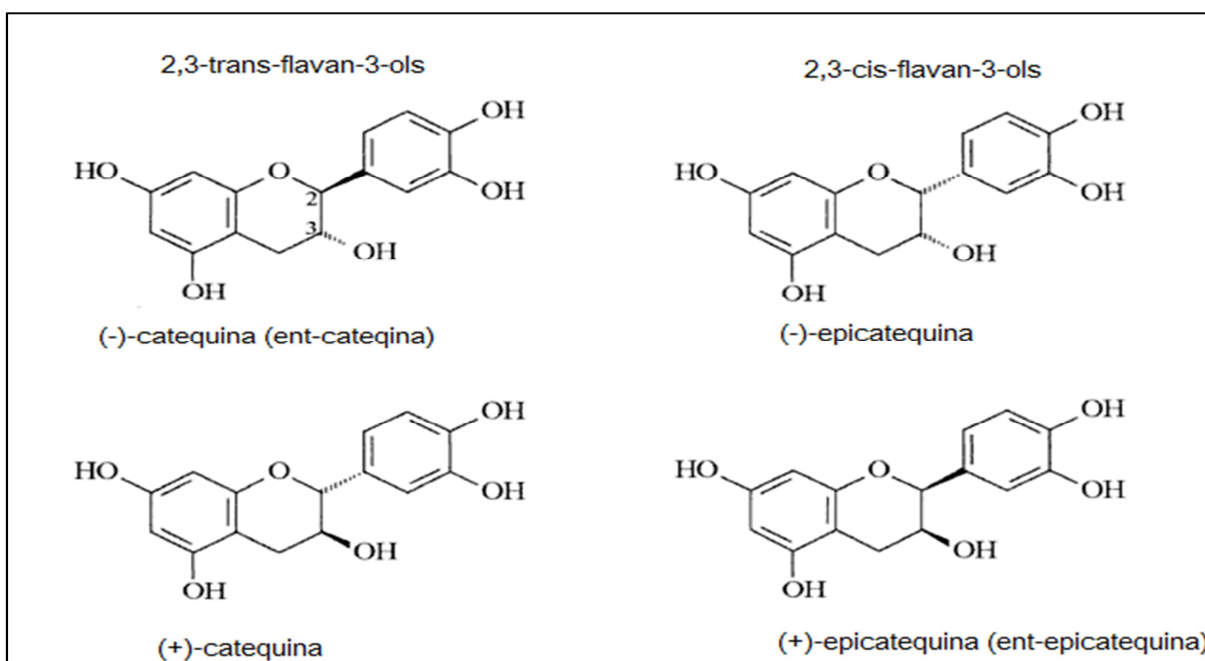


FIGURA 6 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS CATEQUINAS

FONTE: MARAIS *et al.*, (2007)

As procianidinas são comumente encontradas em alimentos como maçã, uva, morango, ameixa e cevada, e constituem-se de oligômeros de unidades de flavan (3) ol (HASLAM, 1989). Na Figura 7 são apresentadas as estruturas da procianidina e prodelfinidina.

Antocianinas e antocianidinas: são pigmentos naturais e estão presentes na maioria das plantas, sendo responsáveis pela coloração vermelha, roxa e azul das flores e frutas (PIETTA e SIMONETTI, 1999). Em flores, as antocianinas podem ocorrer na forma complexada com flavonas e íons metálicos de ferro e magnésio. São pH dependente, com valores próximos de 3,5, se apresentam incolores e com o

aumento do pH assumem uma coloração azul (FIGURA 8) (PETERSON e DWYER, 1998).

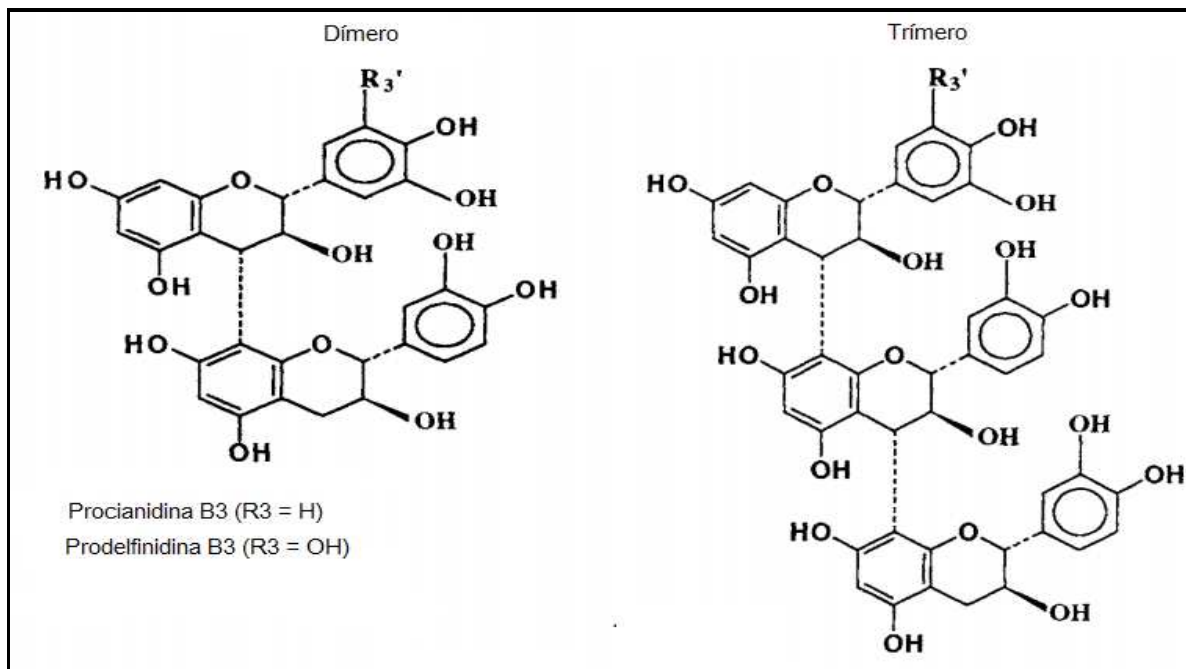


FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE PROCIANIDINA E PRODELFINIDINA

FONTE: PIETTA e SIMONETTI, (1999)

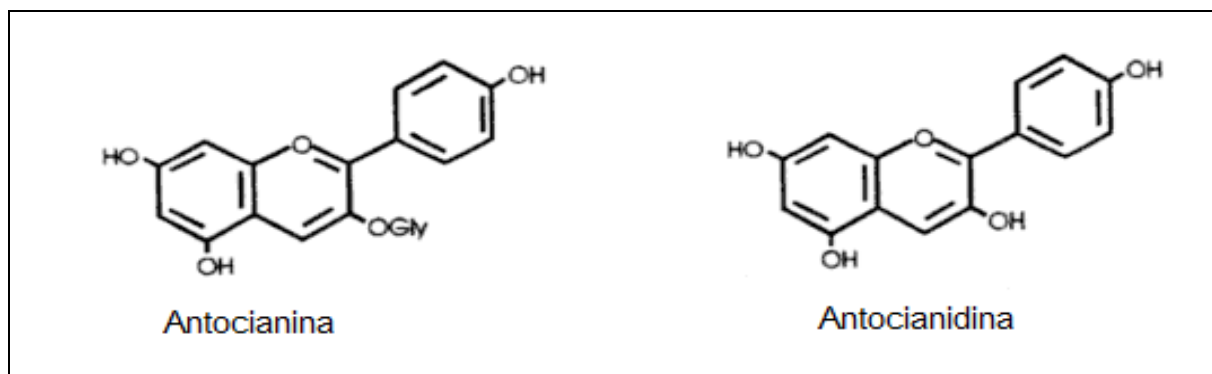


FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS

FONTE: HENRY, (1996)

Flavonóis e flavonas ocorrem principalmente nas folhas mas podem estar presentes em outras estruturas das plantas (FIGURA 9). A quercetina na forma glicosídica é predominante em vegetais, onde estão presentes os glicídios kaempferol e luteolina (HERMANN, 1976).

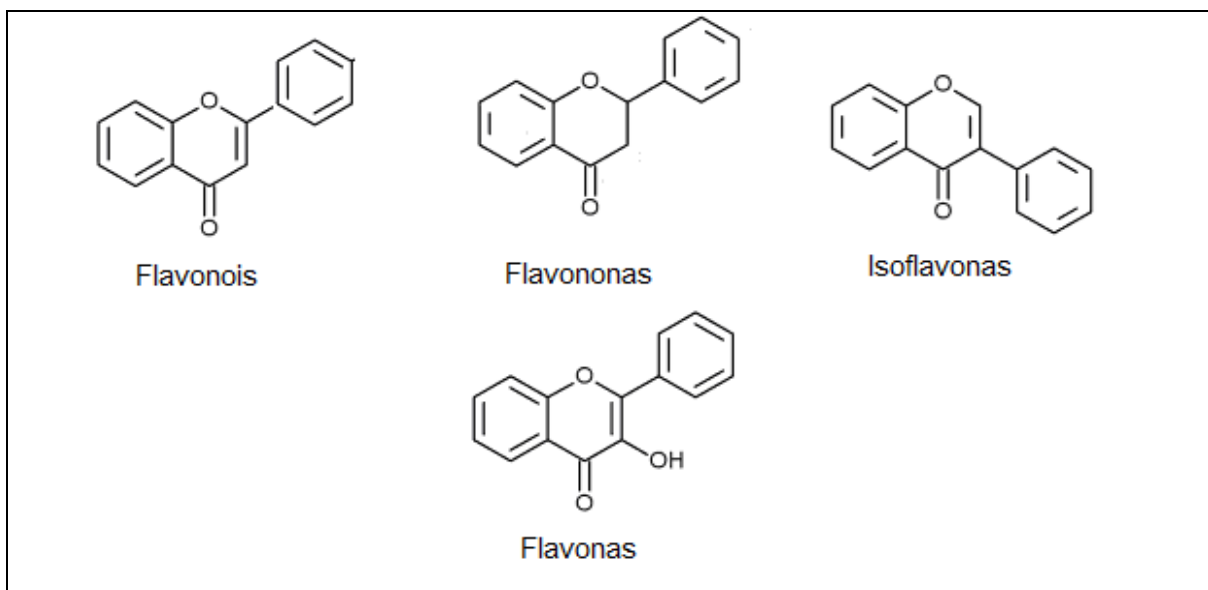


FIGURA 9 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE FLAVONONAS, ISOFLAVONAS, FLAVONÓIS E FLAVONAS

FONTE: CHEMLER *et al.*, (2009)

### 3.8.2 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DOS FLAVONOIDES

Algumas propriedades como a remoção de radicais livres, inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas (fosfolipase A2, cicloxigenase e lipoxigenase) e ação anti-inflamatória, são fortes evidências correlacionadas com a capacidade antioxidativa dos flavonoides (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999).

Os flavonoides são doadores de hidrogênio e tem a capacidade de reduzir a multiplicação de grupos hidroxila, com a habilidade de deslocar o radical antioxidante para dentro da estrutura ligada ao anel aromático (RICE-EVANS, 1999).

Esta característica confere importante capacidade antioxidante sobre a peroxidação de lipídeos, podendo ser relacionada com a propriedade de remoção de radicais  $\text{OH}^\cdot$  e  $\text{O}_2^\cdot$  e com sua reatividade com radicais peróxidos (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999).

Estudos realizados com indivíduos na faixa etária de 50 anos, não fumantes e que introduziram em sua dieta os flavonoides, comprovaram que esses compostos são capazes de inibir o desenvolvimento de tumores no pulmão. A maçã foi a fonte de flavonoides mais promissora na prevenção deste tipo de câncer (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Na Tabela 3 estão descritas as concentrações de alguns flavonoides encontrados em diferentes alimentos de origem vegetal.

### 3.9 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos fazem parte de um grande grupo de polifenóis hidrofílicos comuns em frutas e vegetais. O ácido clorogênico, um subgrupo formado pela esterificação dos ácidos hidroxicinâmicos como o ácido quínico, é o ácido fenólico mais encontrado em vegetais comestíveis (PADAYACHEE *et al.*, 2012).

Dentre os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico estão o ácido: cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferrúlico (FIGURA 10) (PIETTA e SIMONETTI, 1999).

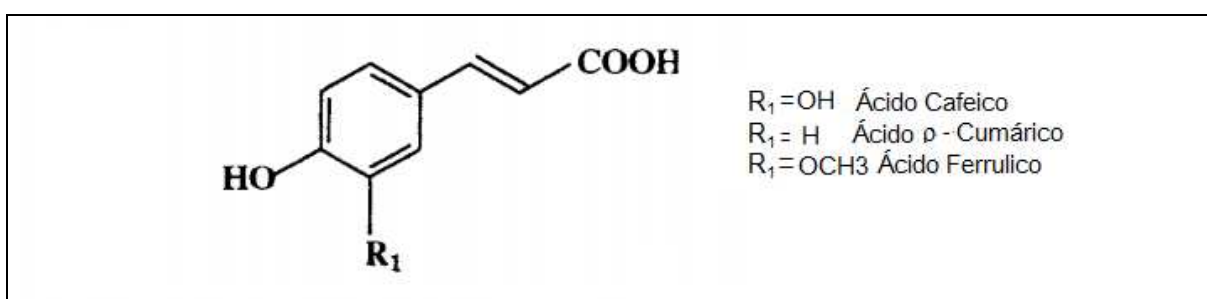


FIGURA 10 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CINÂMICO

FONTE: PIETTA e SIMONETTI, (1999)

#### 3.9.1 ÁCIDOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS

Nas últimas décadas, as propriedades benéficas atribuídas ao consumo de ácidos fenólicos vêm chamando a atenção das diferentes áreas do conhecimento em especial à de alimento, melhoramento genético de plantas, medicina e epidemiologia (XU e HOWARD, 2012). Estudos demonstram que o consumo de alimentos ricos em ácidos fenólicos está relacionado a benefícios à saúde, como a redução dos riscos de doenças cardiovasculares e câncer (ROCKERNBACH *et al.*, 2008).

Os ácidos fenólicos são os principais constituintes dos compostos fenólicos presentes nos alimentos e representam aproximadamente um terço dos compostos fenólicos da nossa dieta. Estão intimamente ligados a características sensoriais e nutricionais dos vegetais comestíveis e estão envolvidos nos processos de



características indesejáveis, como a geração de *off-flavors*, acidez, amargor, adstringência e escurecimento enzimático (YILDIZ, 2010).

Os ácidos coumárico, cafeico, ferrúlico e sinápico são os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico mais abundantes em frutas e vegetais, como demonstra a Tabela 4 (RICE-EVANS e PACKER, 2003).

O ácido fenólico tem sido apontado como substituto ideal de preservativos em formulações de alimentos, devido principalmente a sua propriedade antioxidante e antimicrobiana. Estes compostos também vêm sendo usado como ingrediente funcional em alimentos, com o intuito de aumentar a capacidade antioxidante e os benefícios à saúde destes produtos (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

TABELA 4 – PERCENTUAL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS\*-  
CONTINUA

<b>Alimento</b>	<b><math>\rho</math>-Coumárico</b>	<b>Ác. Cafeico</b>	<b>Ác. Ferrúlico</b>	<b>Ác. Sinápico</b>
Maçã	5 – 20	84 - 94	1 – 5	-
Damasco	3 – 5	87 - 91	6 – 9	-
Amora	23 – 35	38 - 77	12 - 27	1
Groselha Verde	53 – 67	17 - 41	6 - 16	-
Martilho	0 – 8	90 - 100	0 – 2	0,5
Cereja	20 – 65	35 - 79	0,2 - 1,2	-
Café	-	67	1	-
Uva Branca	25	50	25	-
Uva vermelha	66	33	1	-
Pomelo (toranja)	21 – 37	19 - 42	29 - 47	0,6 – 6
Limão	41 – 55	18 - 28	20 - 31	2 – 13
Melão	27 – 73	0,03 - 32	0,2 - 42	-
Laranja	13,5 - 14,7	53 - 23	18 - 43	16 – 19
Pêssego	1 – 3	93 - 97	2 – 4	-
Pera	1 – 8	99	1	-
Pimenta	2 – 27	14 - 67	3 - 74	0 – 28
Abacaxi	53,8	10,8	22,1	13,2

TABELA 4 – PERCENTUAL DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS\*-  
CONTINUAÇÃO

Alimento	$\rho$ -Coumárico	Ác. Cafeico	Ác. Ferrúlico	Ác. Sinápico
Ameixa	2 – 25	72 - 95	0 – 8	-
Abobora	91	-	-	9
Groselha	33 – 37	42 - 48	19 - 21	-
Morango	56 – 92	8 - 44	-	-
Tomate	2 – 21	69 - 91	0 – 9	0,3 - 21
Groselha Branca	48 – 85	10 - 31	6 - 21	-

\* Percentual em relação ao total de ácidos fenólicos de cada alimento

FONTE: MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, (1990)

### 3.10 SESQUITERPENOS

Sesquiterpenos são derivados da cadeia de três unidades de isoprenos. São conhecidos mais de 200 diferentes tipos e várias centenas destes, ainda são desconhecidos. Estes compostos podem ser classificados em três principais grupos: acíclicos (ex. farnesol), monocíclicos (ex. bisaboleno) e bicíclicos (ex. cadineno) (FIGURA 11) (HOFFMAN, 2003).

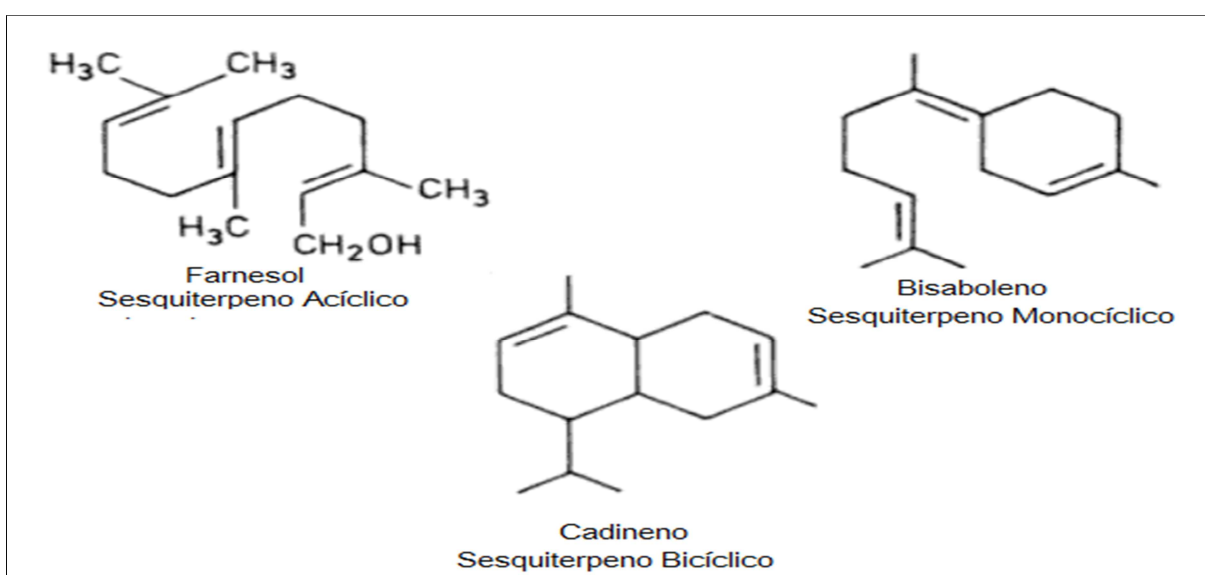


FIGURA 11 - FÓRMULA ESTRUTURAL DE REPRESENTANTES DOS PRINCIPAIS SESQUITERPÊNOS

FONTE: BAYER; WALTER, (1987)

### 3.10.1 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

As lactonas sesquiterpênicas são um grupo distinto dos demais sesquiterpenos, devido à presença de um grupo  $\alpha$ -lactona (HOFFMAN, 2003). Estes compostos estão distribuídos em grande parte das plantas pertencentes à família *Asteraceae* e tem como principais funções a defesa contra agentes externos, como insetos e plantas invasoras (POLYA, 2003).

As lactonas sesquiterpênicas são encontradas principalmente nas partes aéreas destas plantas (folhas e flores), em concentrações de aproximadamente 5% do peso seco. Algumas espécies armazenam estes compostos em estruturas glandulares denominadas tricomas, que quando tocadas, liberam estas substâncias para o meio externo (HOFFMAN, 2003). Elas podem ser classificadas em quatro grandes grupos: germanacrolídeos, eudesmolídeos, alantolactona, guaianolídeos e pseudoguaianolídeos (FIGURA 12) (HOFFMAN, 2003). Cada um destes grupos possuem características fitoquímicas particulares e desta forma são destinadas as diferentes aplicações, como:

- Germanacrolídeos: possui uma estrutura bicíclica e tem como característica propriedades citotóxicas e antineoplásicas (ex. Budlein);
- Eudesmolídeos: inclui uma grande variedade de lactonas sesquiterpênicas e tem como principal características a capacidade antimicrobiana e propriedades antialimentares para inseto (ex. Santamarin);
- Alantolactonas: é um subgrupo dos eudesmolídeos e tem como principal característica fitoquímica, propriedades citotóxicas e antialimentares contra insetos (ex. Helenin);
- Guaianolídeos: este grupo é composto por uma grande variedade de lactonas sesquiterpênicas com propriedades antineoplásicas e citotóxicas, caracterizados pelo amargor e capacidade antialimentar contra insetos (ex. Artabsin);
- Pseudoguaianolídeos: diferem dos guaianolídeos por apresentarem uma substituição do radical 5-metil entre a junção do carbono 5 e 7 do anel aromático; neste grupo incluem compostos com propriedades antialimentares para insetos, citotóxicas, anti-inflamatórias e antineoplásicas (ex. Ambrosin e Hymenim) (POLYA, 2003).

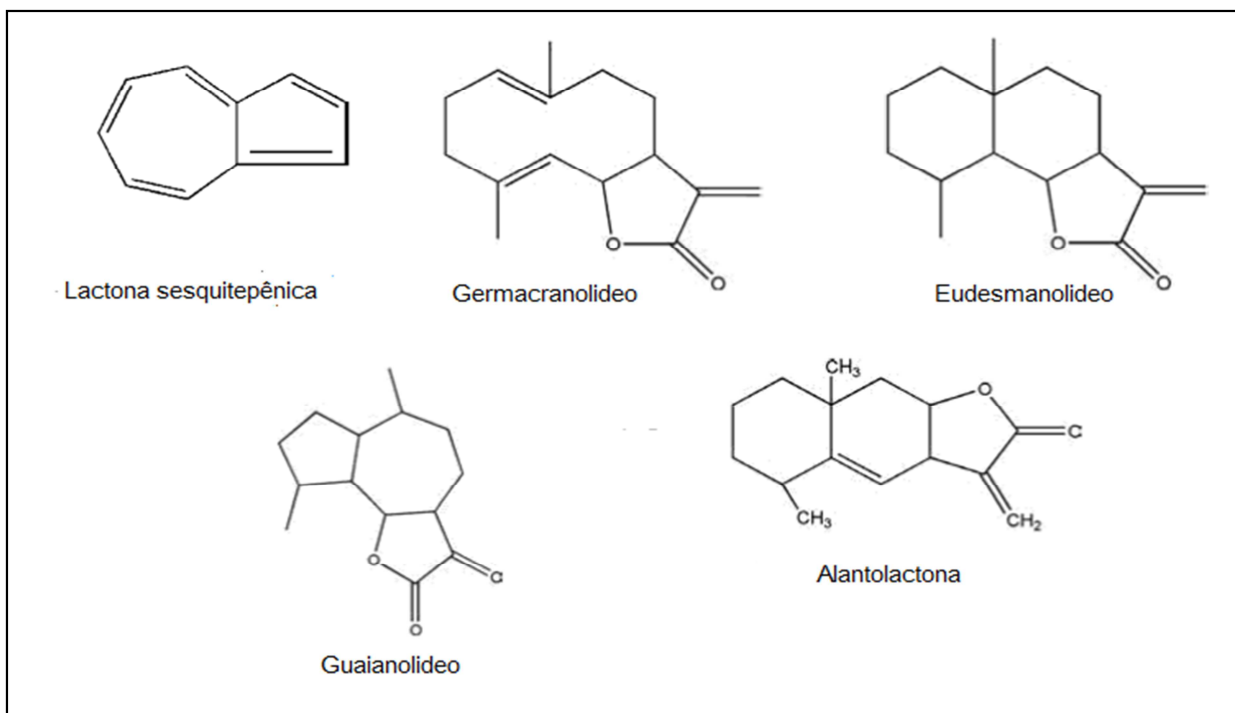


FIGURA 12 – FÓRMULA ESTRUTURAL DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

FONTE: HOFFMAN, (2003)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

*Este capítulo descreve os materiais e os métodos que foram empregados no desenvolvimento deste trabalho.*

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 OBTENÇÃO DE FOLHAS E FLORES DE YACON

As folhas e flores de yacon utilizadas neste estudo foram coletadas durante o mês de abril de 2011, no município de São José dos Pinhais (Colônia Murici), Paraná, Brasil (latitude 25°37'14"; 49°07'40" W; 906 m de altitude) (FIGURA 13). Um espécime foi identificado e a sua exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Paraná.



FIGURA 13 – IMAGEM DE SATÉLITE DA ÁREA DO CULTIVO DO YACON UTILIZADO NESTE TRABALHO

FONTE: GOOGLE MAPS (2013)

#### 4.1.2 SECAGEM DO MATERIAL

Após a coleta, as folhas de yacon passaram por processo de secagem conforme a metodologia descrita por Valentová *et al.* (2003), a qual consiste na secagem a temperatura de 40°C durante 24 h em estufa com fluxo forçado de ar.

Já a secagem das flores coletadas foi realizada a temperatura de 50°C durante 72 h, baseada na metodologia descrita por Diniz; Astarita; Santarém (2007).

#### 4.1.3 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de alto grau de pureza. Os insumos, como solventes e padrões analíticos, utilizados para a realização das técnicas cromatográficas de espectrometria de massa e demais técnicas afins, foram de grau de pureza HPLC, com o intuito de se obter maior confiabilidade e precisão nos resultados obtidos.

Os solventes metanol e clorofórmio, grau HPLC foram adquiridos da empresa Carlo Erba. Os demais reagentes e padrões: ácido ferrúlico (CAS n.º 537-98-4), ácido caféico (CAS n.º. 331-39-5), ácido salicílico (CAS n.º 69-72-7), miricetina (CAS n.º 529-44-2), quercetina (CAS n.º 117-39-5), rutina (CAS n.º 153-18-4), kaempferol (CAS n.º 520-18-3), ABTS 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (CAS n.º 30931-67-0), Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (CAS n.º 53188-07-1) e DPPH (2,2-difenil-1 picril-hidrazil) (CAS n.º 1899-66-4), foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (Alemanha). Os meios de culturas utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana foram adquiridos da marca Difco e Laborclin.

#### 4.1.4 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram:

- Espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo 1650;
- Cromatógrafo em fase líquida (HPLC) da marca Agilent Technology<sup>®</sup>, modelo 1200, acoplado a detector de arranjo de diodo (DAD);
- Cromatógrafo em fase gasosa, acoplado a espectrômetro de massas (CG-MS) da marca Varian<sup>®</sup>, modelo GC-450;
- RMN - Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker<sup>®</sup> AVANCE III;
- Cromatógrafo em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG) Varian<sup>®</sup> CP3900;
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) Varian<sup>®</sup> 720ES;
- Os demais equipamentos e vidrarias utilizados na execução deste trabalho, foram disponibilizados pelos laboratórios do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL), Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) e Laboratório de Análises de Combustíveis (LACAUT).

#### 4.2 MÉTODOS

##### 4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA: FOLHAS E FLORES DE YACON

Para a caracterização da matéria prima foram determinados os parâmetros umidade, teor de lipídeos, proteínas e fibras alimentares, foram utilizados os métodos 963.15, 991.20, 985.29 e 996.06, respectivamente, da AOAC, 18 ed. Revisão 4 (2011); e o perfil de ácidos graxos foi analisado pelo método Ce 1F-96 da AOCS (1995).

A determinação do teor de cinzas foi realizada segundo o método 018/IV, descrito nos métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). O valor de carboidratos foi obtido por meio de cálculo, conforme resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A determinação da concentração de metais presente nas folhas e flores de yacon foi determinada por meio da espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

#### 4.2.2 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E FLORES DE YACON

A metodologia de extração utilizada neste estudo, foi baseada no trabalho realizado por Simonovska *et al.* (2003), que constitui na obtenção de três extratos:

- (1) Infusão (INF): a extração por infusão foi realizada através da pesagem de 1,0 g das folhas ou flores secas de yacon, previamente trituradas, seguido da adição de 100 mL de água ultra pura em ebulição. Após 20 minutos, a infusão formada foi resfriada e filtrada e o volume foi aferido com balão de 100 mL com água ultra pura e encaminhado para análise.

- (2) Decocção (DEC): a extração por decocção foi realizada através da pesagem de 1,0 g das folhas ou flores secas de yacon em balão de fundo chato de 150 mL, previamente triturada, seguido da adição de 100 mL de água ultra pura. Os balões com as amostras foram acoplados ao sistema de condensadores aquecidos até ebulição durante 20 minutos, resfriadas e filtradas e o volume foi aferido com balão de 100 mL com água ultra pura e encaminhado para análise.

- (3) Extração com solvente (FL-MTN): neste procedimento, foi realizada a pesagem de 1,0 g de folhas ou flores de yacon em recipientes confeccionados com papel filtro e levado ao sistema Soxhlet, para a extração durante um período de 24 horas com 150 ml de metanol. O extrato proveniente do processo de extração foi transferido para balão volumétrico de 200 mL e o volume, foi aferido com metanol e encaminhado para a análise.



#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

A determinação do rendimento dos processos de extração foi baseada na metodologia descrita pela AOAC, método de análise n.º 920.104. Uma alíquota de 25 mL de cada extrato obtido, conforme descrito no item 4.2.2, foi transferido para cadinho de porcelana previamente pesado. Em seguida, as amostras foram evaporadas em banho-maria e levadas a estufa de secagem, por um período de 1 hora a temperatura de 100 °C. Após este período, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador e uma nova pesagem foi realizada. O resultado foi obtido pela diferença do peso do cadinho vazio com o peso do cadinho com a amostra, e expresso em percentual (%) de sólidos totais nos extratos com seu desvio padrão (média  $\pm$  desvio-padrão).

#### 4.2.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos de folhas e flores de *Smallanthus sonchifolius*, foi realizada por meio do método de Folin–Ciocalteu, descrito por Lim *et al.* (2011). Uma alíquota de 1 mL da amostra foi adicionado a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada (35%) foi adicionada a reação. A reação foi mantida em ambiente protegido de luz por 90 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 725 nm. A concentração dos compostos fenólicos totais foi expressa em miligramas de ácido gálico por grama de peso seco de folhas ou flores de yacon (mg EAG/g) por meio de uma curva analítica (APÊNDICE).

#### 4.2.5 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação da concentração de flavonoides totais dos extratos foi realizada segundo San *et al.* (2011). Uma alíquota de 500  $\mu$ L de cada uma dos extratos foi adicionado a 1 mL de uma solução de NaNO<sub>2</sub> (5%). Deixou-se reagir por 6 minutos e foram adicionados a mistura 1 mL de AlCl<sub>3</sub> e 10 mL de NaOH (1 M). O

volume foi aferido para 25 mL com etanol a 70%, homogeneizado e deixado em repouso durante 15 minutos para reação.

A absorbância foi medida no comprimento de onda de 515 nm, utilizando como branco analítico o etanol a 70%. Uma curva analítica foi elaborada para expressar os resultados em miligramas de rutina por grama de folhas ou flores de yacon (mgER/g) por meio de uma curva analítica (APÊNDICE).

#### 4.2.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS (ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES) POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

Os ensaios cromatográficos foram realizados em um cromatógrafo em fase líquida, equipado com uma bomba quaternária, um detector de arranjo de diodos (DAD) e com coluna cromatográfica Zorbax Eclipse C18 (5 µm; 4.6 mm x 250 mm).

Para a realização das corridas cromatográficas foram utilizadas duas programações de eluição: uma na identificação e quantificação dos ácidos fenólicos ferrúlico, cafeico, salicílico e gálico; e outra para a determinação da concentração de flavonoides, miricetina, quercetina, rutina e kaempferol. A fase móvel foi composta por ácido fórmico 1% (v/v) (Fase A) e metanol (Fase B). O gradiente de eluição de ambos os métodos estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Tempo (min.)	Fase Móvel % (A)	Fase Móvel % (B)
0 – 40	75	25
40 – 55	25	75
55 – 65	75	25

FONTE: O autor (2014)

TABELA 6 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

Tempo (min.)	Fase Móvel % (A)	Fase Móvel % (B)
0 – 20	45	55
20 – 30	55	45
30 – 40	35	65
40 – 50	45	55

FONTE: O autor (2014)

O fluxo da fase móvel para ambos os métodos foi de 1 mL/min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda de 278 nm e 325 nm, na quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides, respectivamente. O volume de injeção foi de 10 µL. A identificação dos analitos de interesse foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção, dos picos encontrados nas amostras com padrões de referência e por meio da co-cromatografia. A quantificação das amostras foi realizada por meio da construção de curvas de calibração (5 pontos), obtida para cada um dos padrões (APÊNDICE). Os dados foram analisados com o auxílio do software Chemstation Rev. B.02.01-SR1 [260]. O limite de detecção (LD) do método analítico foi determinado segundo Ribani *et al.* (2004) por meio dos parâmetros da curva analítica. O LD determinados para os analitos de interesse foram os seguintes: rutina= 0,00045 mg/g, miricetina= 0,0001 mg/g, quercetina= 0,0051 mg/g, kaemferol= 0,00023 mg/g, ácido gálico= 0,00001 mg/g, ácido cafeico= 0,0004 mg/g, ácido ferrúlico= 0,0007 mg/g, ácido coumárico= 0,0004 mg/g e ácido salicílico= 0,0006 mg/g. Tanto a fase móvel quanto as amostras e padrões analíticos, foram previamente filtrados através de membrana filtrante, com poro de 0,45 µm antes de sua injeção no sistema cromatográfico. Os dados apresentados são a média de três injeções ± o desvio padrão expressos em mg/g de peso seco de folhas ou flores de yacon.

#### 4.2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – DPPH E ABTS

A atividade antioxidante dos extratos obtidos, a partir de folhas ou flores de *Smallanthus sonchifolius*, foi determinada pelas metodologias da captura dos radicais ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)) e DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).

##### 4.2.7.1 CAPTURA DO RADICAL DPPH<sup>•</sup>

A determinação da atividade antioxidante, pela metodologia DPPH, foi baseada no trabalho de Brand-Williams, Culvelier e Berset (1995). Uma alíquota de 0,1mL de cada um dos extratos foi adicionada a 3,9mL de uma solução metanólica do radical DPPH<sup>•</sup> ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L), em ambiente protegido da luz. Após 15 minutos de reação foi realizada a leitura da absorvância a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> do meio reacional foi determinada por meio da equação da reta da curva de calibração (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM e 60 mM). A atividade antioxidante DPPH<sup>•</sup> foi definida como sendo, a concentração de antioxidante necessária para promover um decréscimo de 50% na concentração do radical DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>). Os resultados foram expressos como a média de três medições  $\pm$  o desvio padrão da concentração efetiva em gramas de peso seco de folhas ou flores de yacon por grama de DPPH.

##### 4.2.7.2 CAPTURA DO RADICAL ABTS<sup>•+</sup>

A avaliação da capacidade antioxidante, pela metodologia da captura do radical ABTS dos extratos metanólicos e aquosos de folhas ou flores de yacon, foi realizada por meio da metodologia descrita por Re *et al.*, (1999). A marcha analítica consistiu no preparo de uma solução de ABTS 7mM. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi produzido pela reação da solução ABTS 7mM com uma solução de persulfato de potássio 2,45mM. Esta solução foi mantida em repouso e em ambiente protegido da luz, durante um período de 12 a 16 horas antes da sua utilização. A solução do radical

ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com etanol até a obtenção de uma absorbância de 0,70 ( $\pm$  0,02) a 734nm. Após o ajuste da absorbância da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, foi adicionado 10 $\mu$ L de cada um dos extratos ou de cada um dos pontos da curva de calibração de Trolox a 1mL da solução de radical ABTS<sup>•+</sup>. Após 6 minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro na absorbância de 734 nm, utilizando como branco o etanol. A percentual de inibição da absorbância do radical ABTS<sup>•+</sup> foi calculada em função do antioxidante Trolox. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu$ M de Trolox por grama de folhas ou flores de yacon ( $\mu$ M ET/g).

#### 4.2.8 PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DAS FOLHAS DE YACON

A extração e a purificação de lactonas sesquiterpênicas foram baseadas nas metodologias descritas por Schorr e Da Costa (2003) e Genta *et al.* (2010). O procedimento consistiu na obtenção de um extrato a partir da extração de 150 gramas de folhas de yacon previamente secas, conforme descrito no item 4.1.2, com 1L de diclorometano durante 15 minutos a temperatura ambiente e em becker de vidro. O extrato obtido foi submetido à filtração através de papel filtro qualitativo, seguido da evaporação do solvente (diclorometano) em rotaevaporador a 40–45°C. O resíduo foi dissolvido em 35mL de metanol, seguido da adição de 15mL de água destilada adicionada a mistura em gotas, com o intuito de se obter a precipitação das ceras presentes no extrato. Após a precipitação das ceras foi realizado uma nova filtração para a remoção do precipitado, seguido da evaporação do solvente sob pressão reduzida, com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40 – 45°C. O resíduo desse processo foi redissolvido em 9mL de metanol e armazenado em freezer a temperatura de aproximadamente -20°C durante 4 dias. Um precipitado cristalino foi obtido, separado por decantação e lavado com éter etílico gelado (3x1 mL). O éter etílico foi evaporado e as lactonas sesquiterpênicas purificadas foram obtidas e encaminhadas para identificação e quantificação.

#### 4.2.9 IDENTIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON (RMN E GC-MS/MS)

A identificação das lactonas sesquiterpênicas foi realizada por meio da ressonância magnética nuclear. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^1\text{H}$  quantitativo e os espectros de correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-HSQC e ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-HMBC foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de campo magnético de 14,1 Tesla (600 MHz), equipado com uma sonda quadrinuclear de detecção inversa ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{31}\text{P}$ ) de 5 mm e com gradiente de campo no eixo z. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , e DEPT foram obtidos em um espectrômetro Bruker AVANCE III 400 de 9,4 Tesla (400 MHz), equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta (X-Núcleo e  $^1\text{H}$ ) de 5 mm e com gradiente de campo no eixo z. Os espectros foram obtidos e processados utilizando o software TopSpin v.3.1 da marca Bruker®.

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), sendo usado como referência o tetrametilsilano (TMS). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  quantitativo foi obtido com delay de 15 segundos.

Como método complementar de identificação foram obtidos os espectros de massa das lactonas sesquiterpênicas, como descrito no item 4.2.8. O material foi dissolvido em clorofórmio, seguido da injeção no sistema cromatográfico GC-MS/MS triplo quadrupolo. A energia de impacto de elétrons foi 70eV sob as seguintes condições: coluna CP sil 8CB (0,25 mm x 30 m e 0,25  $\mu\text{m}$  de filme), temperatura do injetor 280°C, razão de split de 1:20 e hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,2 ml/min. A programação do forno de colunas seguiu o seguinte gradiente de temperatura: temperatura inicial de 60°C, seguido do aquecimento até 250°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto; permanecendo nesta temperatura por 3 minutos, seguido do aquecimento para 300°C numa razão de 5°C/minuto, permanecendo nesta temperatura durante 5 minutos. A faixa de varredura do detector foi realizada no modo scan range, 40–600 m/z. A temperatura da fonte foi mantida a 250°C e a do transferline de 280°C.

#### 4.2.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON

A atividade antimicrobiana das lactonas sesquiterpênicas, substância descrita no item 4.2.8, foi avaliada por meio da metodologia de difusão em discos (Kirby e Bauer), que é normatizada pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2006). Com auxílio de uma alça bacteriológica esterilizada, foi tocada três colônias recentes (18 - 24 horas) do micro-organismo a ser testado e cultivado em triptona de soja (TSA) a 37°C. As colônias formadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), até a obtenção compatível ao grau 0,5 da escala Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Uma placa de ágar Miller-Hinton foi semeada, com auxílio de um swab estéril embebido na suspensão bacteriana (0,5 Mac Farland), de forma a cobrir toda a superfície da placa. Discos impregnados com os compostos a serem avaliados (lactonas sesquiterpênicas), um disco controle negativo (DMSO) e um disco controle positivo (ampicilina 10µg e ceftazidima 30µg), foram aderidos a superfície do meio de cultura pelo uso de uma pinça flambada e resfriada, com a qual se exerceu uma leve pressão com a ponta da pinça para a completa adesão. A placa com os discos foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C por um período de 24 horas. Após a incubação, os halos inibitórios foram medidos com paquímetro.

Os ensaios foram realizados em condições de ausência e incidência de luz (4000 lux), a fim de se avaliar o efeito sinérgico da luz no efeito antimicrobiano das lactonas sesquiterpênicas. As concentrações avaliadas foram de 10 e 90 µg por disco, por meio da impregnação de discos estéreis com uma solução de lactonas sesquiterpênicas (item 4.2.8) em dimetilsulfóxido (DMSO).

A atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e flores de yacon e das lactonas sesquiterpênicas foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos:

- *Escherichia coli* – ATCC 11229;
- *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 15442;
- *Staphylococcus aureus* – ATCC 6538;
- *Salmonella entérica* – ATCC 14028.

#### 4.2.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo. Ela foi determinada pelo método de micro diluição em caldo, segundo metodologia descrita pela NCCLS (2006), método M27-A7.

A partir de uma solução de lactonas sesquiterpênicas em DMSO (6000 mg/L), foi preparada uma serie de diluições em placa de 96 poços, numa faixa entre 1/2 e 1/250 (FIGURA 19). Foi preparado um inóculo, de uma cultura recente de *Staphylococcus aureus* 0,5 Mc Farland ( $1,5 \times 10^6$  UFC/ml), em caldo Mueller-Hinton. Seguida da adição de 7,5 $\mu$ L do inóculo, em cada uma das diluições do agente antimicrobiano. A placa foi incubada em estufa a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, a placa foi examinada e comparada com os poços controle. Um poço contendo apenas o caldo nutriente foi utilizado como controle negativo e um poço contendo o meio nutriente e o inóculo, sem a adição do agente antimicrobiano, foi utilizado como controle positivo.

A CIM foi expressa como a menor concentração do agente antimicrobiano (lactonas sesquiterpênicas), capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

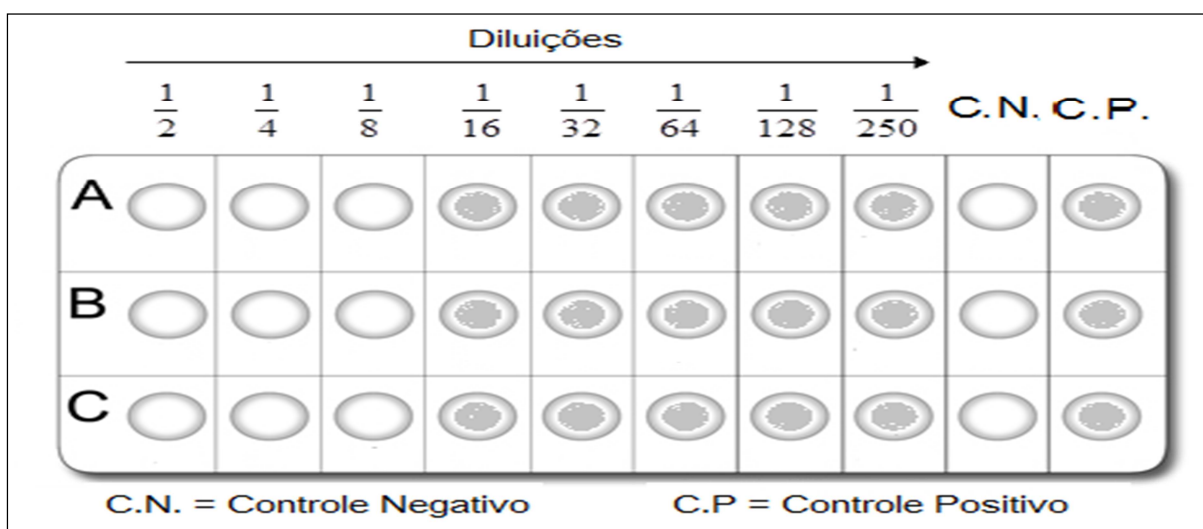


FIGURA 14 – ESQUEMA DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) – MÉTODO DE MICRO DILUIÇÃO EM CALDO MUELLER-HINTON

FONTE: O autor (2014)



#### 4.2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando o Software Origin Pro 8.5.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nesse trabalho. Primeiramente são apresentados os dados da caracterização físico-química, das folhas e flores de yacon, após o processo de secagem. Em seguida, são apresentados os resultados da pesquisa referente à concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante pelo método da captura de radical livre DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> dos extratos provenientes destas matrizes. Também são apresentados os dados referentes ao isolamento e identificação de lactonas sesquiterpênicas das folhas de yacon e resultados da atividade antimicrobiana destes compostos.*

#### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FOLHAS E FLORES DE YACON

##### 5.1.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os resultados obtidos, na determinação da composição centesimal das folhas desidratadas de yacon, foram semelhantes a aqueles descritos por Calvino (1940) e Frcek *et al.* (1995), no que diz respeito aos parâmetros de cinzas e proteína. A concentração de lipídeo totais apresentou valores aproximados com os apresentados por Frcek *et al.* (1995), o teor de fibra alimentar e carboidratos, não foram relatados por estes autores como demonstra a Tabela 7.

A variação encontrada entre os resultados deste estudo e os demais autores pode ser atribuída a variações na forma de cultivo, região de cultivo ou ainda a características inerentes a variabilidade genética.

Não foram encontrados na literatura dados a respeito da composição centesimal de flores de yacon. Estes dados estão sendo apresentados pela primeira vez neste estudo e são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON (g/100g)

Parâmetros	Folha			Flor
	A*	B**	C***	A*
Umidade	7,117 ± 0,20	-	-	7,037 ± 0,10
Cinzas	10,670 ± 0,04	15,98	12,52	6,173 ± 0,04
Proteína	17,883 ± 0,43	17,12	21,18	12,200 ± 0,16
Lipídeo	3,420 ± 0,03	7,40	4,40	6,213 ± 0,09
Fibra Alimentar	44,15	-	-	38,16
Carboidrato	16,76	-	-	30,23

\* O autor (2014), \*\*CALVINO (1940), \*\*\* FRCEK *et al.*, (1995)

### 5.1.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os ensaios de CG para a determinação do perfil de ácidos graxos das folhas desidratadas de yacon, demonstrou a presença de 19 ácidos graxos (FIGURA 15), sendo o ácido palmítico (C16:0) o principal componente da fração lipídica das folhas de yacon, representando  $29,79 \pm 0,16\%$  da concentração de lipídeos totais. O ácido linoleico (C18:2 n6) também foi identificado e quantificado, representando  $12,68 \pm 0,07\%$  dos lipídios, seguido pelo ácido linolênico (C18:3 n3)  $10,19 \pm 0,11\%$ , oleico (C18:1 n9)  $6,01 \pm 0,14$  e esteárico (C18:0)  $5,24 \pm 0,02\%$ . Os demais ácidos graxos identificados representaram 36,09% do total de lipídeos presentes nas folhas de yacon e contribuem para a composição de 49,39% ácidos graxos saturados, 15,82% de monoinsaturados e 34,81% de poli-insaturados. Na Tabela 8 são apresentados os dados referentes ao perfil de ácidos graxos da fração lipídica das folhas de yacon.

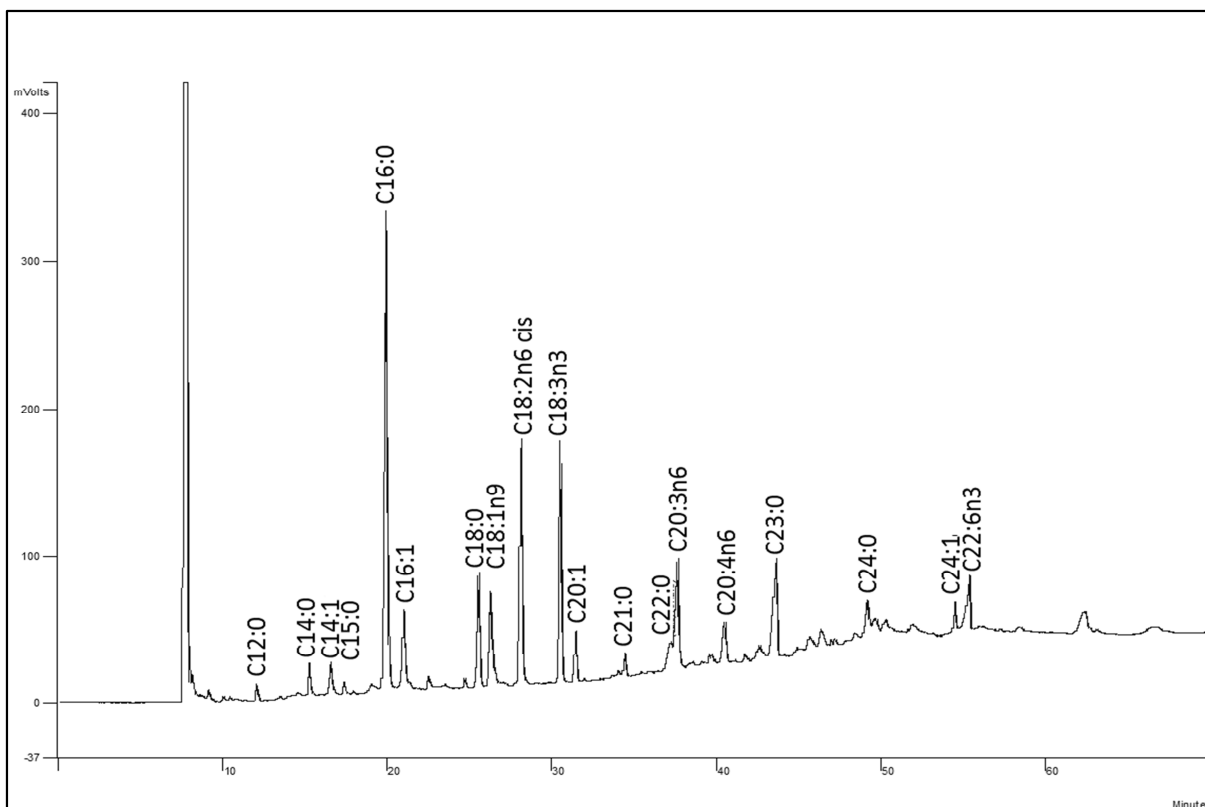


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO LÍPIDICA DE FOLHAS DE YACON

FONTE: O autor (2014)

A determinação do perfil de ácidos graxos das flores desidratadas de yacon demonstrou a presença de 16 ácidos graxos (FIGURA 16). O ácido linoleico (C18:2 n6) foi o principal representante do perfil de ácidos graxos ( $26,98 \pm 0,10\%$ ). Assim como, o observado na composição de ácidos graxos das folhas desta planta, o ácido palmítico (C16:0), linolênico (C18:3 n3), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1 n9), também representaram uma importantes fração dos lipídios encontrados nas flores de yacon; estes ácidos graxos representam  $21,64 \pm 0,07$ ,  $16,46 \pm 0,08$ ,  $8,09 \pm 0,21$  e  $5,66 \pm 0,05\%$  da fração lipídica, respectivamente. Os demais ácidos graxos representam uma menor fração da composição total de lipídeos, no entanto, participam da composição de 41,39% de ácidos graxos saturados, 9,52% de monoinsaturados e 49,09% de poli-insaturados. Na Tabela 8 são apresentados os resultados referentes ao perfil de ácidos graxos da fração lipídica das flores de yacon.

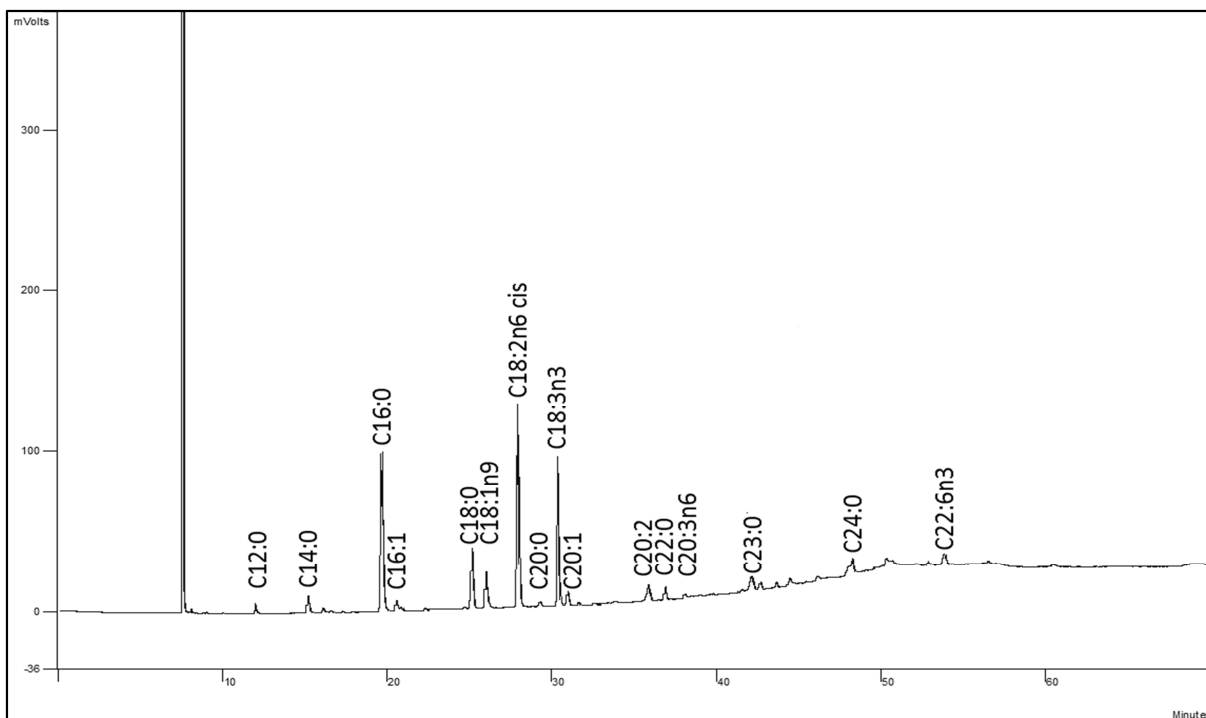


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA FRAÇÃO LIPÍDICA DE FLOR DE YACON

FONTE: O autor (2014)

TABELA 8 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON - CONTINUA

Ácido Graxo	Símbolo	Folhas* %	Flores* %
Ácido Láurico	C12:0	0,59 ± 0,15	1,17 ± 0,02
Ácido Mirístico	C14:0	1,50 ± 0,10	2,40 ± 0,12
Ácido Pentadecanoíco	C15:0	0,56 ± 0,03	-
Ácido Palmítico	C16:0	29,79 ± 0,16	21,64 ± 0,06
Ácido Esteárico	C18:0	5,21 ± 0,02	8,09 ± 0,21
Ácido Heneicosanoico	C21:0	1,34 ± 0,06	-
Ácido Lignocérico	C24:0	3,36 ± 1,08	2,50 ± 0,10
Ácido Miristoleico	C14:1	1,83 ± 0,04	-
Ácido Palmitoleico	C16:1	3,89 ± 0,10	2,03 ± 0,04
Ácido Oleico	C18:1 n9	6,01 ± 0,14	5,66 ± 0,04
Ácido Eicosadienoico	C22:2 n9	-	3,06 ± 0,26
Ácido Nervônico	C24:1 n9	1,80 ± 0,50	-
Ácido Linoleico	C18:2 n6	12,68 ± 0,07	26,88 ± 0,10

TABELA 8 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON – CONTINUAÇÃO

Ácido Graxo	Símbolo	Folhas*	Flores*
		%	%
Ácido Linolênico	C18:3 n3	10,19 ± 0,11	16,46 ± 0,08
Ácido Eicosatrienóico	C20:3 n9	6,12 ± 0,16	0,50 ± 0,01
Ácido Araquidônico	C20:0	1,99 ± 0,12	-
Ácido Eicoseinóico	C29:1 n7	2,26 ± 0,14	1,83 ± 0,06
Ácido Behênico	C22:0	2,86 ± 0,28	1,59 ± 0,02
Ácido Docosahexadienoico (DHA)	C22:6 n3	3,81 ± 0,95	2,20 ± 0,04
Ácido Tridecosanoico	C23:0	4,16 ± 0,28	3,26 ± 0,10
Ácido Araquídico	C20:0	-	0,75 ± 0,27

\* Percentual do ácido graxo presente na fração lipídica de folhas e flores de yacon

FONTE: O autor (2014)

### 5.1.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MINERAIS DAS FLORES E FLORES DE YACON

Os ensaios para o levantamento da concentração de minerais das folhas de yacon demonstraram que as folhas desidratadas de yacon apresentam uma elevada concentração do mineral cálcio. Os elementos magnésios, fósforos e ferro também foram encontrados em concentrações apreciáveis nesta matriz, como apresentado na Tabela 9. Os resultados dos ensaios para a determinação da concentração de minerais, presentes nas folhas desidratadas do yacon, estão em concordância com os apresentados por Valentová e Ulrichová (2003).

A determinação da concentração de minerais presentes nas flores desidratadas de yacon revelou que, assim como, nas folhas desta planta o cálcio é o mineral majoritário, sendo encontrado em concentrações elevadas. O magnésio e o fósforo também são importantes representantes dos minerais das flores de yacon. Os dados referentes a análises de minerais das flores de yacon são apresentado na Tabela 9.

TABELA 9 – MINERAIS PRESENTES EM FOLHAS E FLORES DESIDRATADAS DE YACON (mg/Kg)

Elemento	Folha de Yacon	Flor de Yacon
Bário	7,98	4,49
Cálcio	16833,28	6180,70
Cádmio	0,07	0,07
Chumbo	0,61	ND
Cobre	10,37	9,9
Ferro	130,31	38,05
Magnésio	9118,48	3992,74
Manganês	42,43	23,11
Fósforo	2913,32	3127,66
Estanho	0,42	ND*
Chumbo	26,67	18,58

\* Não detectado (<0,01 mg/Kg)

FONTE: O autor (2014)

Tanto nas folhas quanto nas flores desidratadas de yacon, não foram encontradas concentrações significativas de contaminantes metálicos como: arsênio, cobre, chumbo e estanho; estando todos os valores dentro dos limites admitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em seu decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965 e pela Portaria nº 685 de 27 de março de 1998 (Legislação Normativa de Produtos Destinados ao Consumo Humano).

## 5.2 RENDIMENTOS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Foram avaliados três processos de extração, infusão, decocção e extração com metanol. Segundo Simonovska *et al.*, (2003); Tura e Robards (2002), a seleção das condições de extração é um fator importante na investigação da concentração de compostos fenólicos totais. A avaliação do rendimento dos extratos foi realizada por meio da quantificação da concentração de sólidos totais presentes nos extratos.

Os processos de extração das folhas de yacon, por meio da infusão e decocção, apresentaram os resultados mais expressivos quando comparado ao processo de extração com metanol, possivelmente devido a uma maior afinidade dos componentes extraídos com água em relação ao metanol. Os dados referentes aos processos de extração são apresentados na tabela 10. Não foi observada diferença significativa entre os resultados de rendimento dos processos de extração de infusão e decocção, ao nível de significância de  $p < 0,05$ . O mesmo comportamento não foi observado nos resultados dos extratos obtidos a partir da extração com metanol, quando comparados com demais dos extratos, neste caso, os dados apresentaram diferença significativa ao nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Simonovska *et al.* (2003).

TABELA 10 – RENDIMENTOS DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Tipo de Extração Flores	Rendimento (%)	Tipo de Extração Folhas	Rendimento (%)
FLR INF	35,45 ± 0,48 <sup>a</sup>	FL INF	32,74 ± 0,26 <sup>a</sup>
FLR DC	35,04 ± 0,68 <sup>a</sup>	FL DC	32,91 ± 0,51 <sup>a</sup>
FLR MTN	44,77 ± 1,96 <sup>b</sup>	FL MTN	25,13 ± 1,11 <sup>b</sup>

Médias com a mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 95% de probabilidade

Os extratos das flores de *Smallanthus sonchifolius* obtidos a partir da extração com metanol apresentaram rendimento superior aos demais processos de extração. A extração com metanol apresentou diferença significativa, ao nível de  $p < 0,05$  em relação aos resultados das extrações por infusão e decocção. Este comportamento pode ser explicado uma vez que ambos os processos de extração possuem algumas características em comum como temperatura e solvente empregado (água) na extração, promovendo desta forma, um poder de extração semelhante.

Não foi observada diferença significativa entre a extração por meio de infusão e decocção ao nível de  $p < 0,05$  entre folhas e flores de yacon. Os dados

referentes aos resultados de rendimento dos processos de extração de folhas e flores de yacon são demonstrados na Tabela 10.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Os ensaios para a determinação da concentração dos compostos fenólicos totais, presentes nos extratos das folhas de yacon, realizados pelo método de Follin-Ciocateu, demonstraram uma maior eficiência de extração destes compostos nos extratos obtidos pelos processos de extração por infusão e decocção e estão apresentados na Tabela 11. A concentração de compostos fenólicos observada nos extratos obtidos por decocção foi superior a observada na extração por infusão e extração metanólica. O que pode ser explicado por uma maior afinidade destes compostos a solventes com maior polaridade, assim como, pelas condições de extração em que estes extratos foram obtidos, uma vez que neste processo (decocção), a amostra é mantida a temperatura constante durante todo o período da extração, promovendo desta forma, uma maior eficiência de extração destes compostos.

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Tipo de Extração Flores	Compostos Fenólicos Totais*	Tipo de Extração Folhas	Compostos Fenólicos Totais*
FLR INF	21,05 ± 0,37 <sup>a</sup>	FL INF	39,9 ± 2,62 <sup>a</sup>
FLR DC	21,75 ± 1,36 <sup>a</sup>	FL DC	42,2 ± 4,58 <sup>a</sup>
FLR MTN	13,44 ± 2,19 <sup>b</sup>	FL MTN	3,60 ± 0,40 <sup>b</sup>

\* Compostos fenólicos em mg de equivalente a ácidos gálico por grama de flores ou flores desidratadas de yacon, média ± desvio padrão das triplicatas  
Médias com a mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 95% de probabilidade

Os resultados de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos a partir das folhas de yacon apresentaram diferença significativa, ao nível de  $p < 0,05$  entre os



extratos metanólicos e aquosos. No entanto, nos processos de extração por decocção e infusão esta diferença não pode ser observada. Este comportamento corroboram os resultados apresentados por Barcellona *et al.* (2012).

Os ensaios para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais, presentes nos extratos aquosos e metanólicos de flores de yacon, revelaram um comportamento semelhantes aos observados nos extratos das folhas desta planta. O extrato obtido por decocção apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais dentre os demais extratos.

Os extratos obtidos a partir dos processos de extração por infusão apresentou concentração de compostos fenólicos totais, estatisticamente iguais aos obtidos por decocção. No entanto, os extratos metanólicos das flores de yacon apresentaram concentrações inferiores daquelas observadas nos demais extratos, com diferença significativa ao nível de  $p < 0,05$ . A Tabela 11 apresenta os dados de compostos fenólicos totais dos extratos das flores de yacon.

Dados a respeito da concentração de compostos fenólicos, em extratos obtidos a partir das flores de yacon, não são encontrados na literatura. No entanto, diversos estudos veem sendo reportados, comprovando o potencial de flores de plantas pertencentes a diversas famílias como fonte de compostos fenólicos. Como exemplo, podemos citar o estudo conduzido por Zhang *et al.* (2010), que avaliou a concentração de compostos fenólicos presentes em flores de romã, demonstrando desta forma, o potencial desta matéria prima como fonte de compostos fenólicos.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Os flavonoides são um dos principais responsáveis pela propriedade antioxidante de grande parte dos produtos de origem vegetal. A presença destes compostos, em extratos provenientes de vegetais, sugere um grande poder antioxidante a estes extratos segundo Lotito e Frei (2004); Sun *et al.* (2011).

Os ensaios espectrofotométricos demonstraram a presença de concentrações consideráveis de flavonoides totais, nos extratos obtidos a partir das folhas de yacon. A Tabela 12 apresenta dos dados referentes à determinação de flavonoides presentes nos extratos das folhas e flores de yacon.

TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Tipo de Extração Flores	Flavonoides Totais*	Tipo de Extração Folhas	Flavonoides Totais*
FLR INF	18,33 ± 1,24 <sup>a</sup>	FL INF	35,91 ± 1,88 <sup>a</sup>
FLR DC	15,03 ± 2,15 <sup>a</sup>	FL DC	39,72 ± 1,37 <sup>b</sup>
FLR MTN	11,05 ± 0,64 <sup>b</sup>	FL MTN	1,59 ± 0,34 <sup>c</sup>

\* Flavonoides Totais em mg de equivalente a Rutina por grama de flores ou flores desidratadas de yacon, média ± desvio padrão das triplicatas  
Médias com a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de 95% de probabilidade

O extrato obtido pela decocção das folhas de yacon apresentou os valores mais expressivos de flavonoides totais, seguido pela infusão das folhas desta planta. O extrato obtido a partir da extração com metanol apresentou a menor concentração de flavonoides totais dentre os demais extratos de folha desidratada.

Este comportamento pode ser explicado devido ao fato de que alguns flavonoides como as flavonas não possuem uma boa solubilidade neste solvente ou ainda por uma possível degradação dessas moléculas durante o processo de extração, uma vez que na extração em sistema soxleht os compostos extraídos são mantidos a temperatura de ebulição durante o todo o tempo de extração, o que pode acarretar na degradação destes flavonoides.

Os ensaios com os extratos obtidos a partir das flores de *Smallanthus sonchifolius*, revelaram uma maior concentração de flavonoides do que a observada nas flores desta planta. A infusão foi mais eficiente na remoção destes compostos, no entanto, a decocção das flores apresentou resultados semelhantes. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações destes compostos, encontradas nos extratos obtidos por infusão e decocção ao nível de  $p < 0,05$ . O mesmo não foi observado no extrato metanólico, o qual apresentou concentração inferior de flavonoides totais em comparação com os extratos aquosos.

No trabalho realizado por Lima *et al.*, (2004), sobre a avaliação da extração de compostos fenólicos de brotos de feijão-mungo com a utilização de água e metanol, os autores observaram comportamento semelhante aos encontrados neste

estudo, em que a extração destes compostos com água demonstrou ser mais eficiente daquela observada na extração com metanol. Isto demonstra uma maior afinidade dos flavonoides presentes nas amostras com solventes com maior polaridade, além de evidenciarem que os processos de extração conduzidos em condições experimentais mais brandas possivelmente contribuem para uma menor degradação destes compostos.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON POR HPLC-DAD

### 5.5.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

Foi realizada a comparação dos tempos de retenção (TR) e dos espectros de absorção dos picos, nos cromatogramas das amostras com o tempo de retenção e os espectros de absorção dos padrões de referência. Foram pesquisados os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico (Pico 1: TR= 3,83 min.), ácido cafeico (Pico 2: TR= 8,60 min.), ácido *p*-coumárico (Pico 3: TR= 14,38 min.) e ácido ferrúlico (Pico 4: TR= 17,11 min.).

O ácido gálico foi o ácido fenólico mais abundante nos extratos de folhas de yacon, sendo o extrato metanólico o que apresentou as concentrações mais elevadas deste analito. O ácido cafeico também foi detectado neste extrato, no entanto, em baixas concentrações, como pode ser observado na Tabela 13.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON

Composto	Concentração de Ácidos Fenólicos*		
	FL INF	FL DEC	FL MTN
Ácido Gálico	0,67 ± 0,00	0,69 ± 0,00	1,97 ± 0,01
Ácido Cafeico	0,15 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,47 ± 0,00
Ácido Coumárico	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,00	Nd
Ácido Ferrúlico	0,85 ± 0,00	0,37 ± 0,00	Nd
Ácido Salicílico	n.d <sup>a</sup>	n.d	Nd

\* mg/g de folhas desidratadas ± desvio-padrão das triplicatas

<sup>a</sup> composto não detectado (<LD)

FONTE: O autor (2014)

Os extratos obtidos pela infusão das folhas de yacon apresentaram composição de ácidos fenólicos semelhantes aos extratos obtidos por decocção, no entanto, em menores concentrações, sugerindo uma menor eficiência na remoção deste composto neste processo de extração. Os ácidos ferrúlico, *p*-coumárico. A Figura 17 apresenta cromatogramas típicos obtidos na determinação de ácidos fenólicos dos extratos de folhas e de yacon.

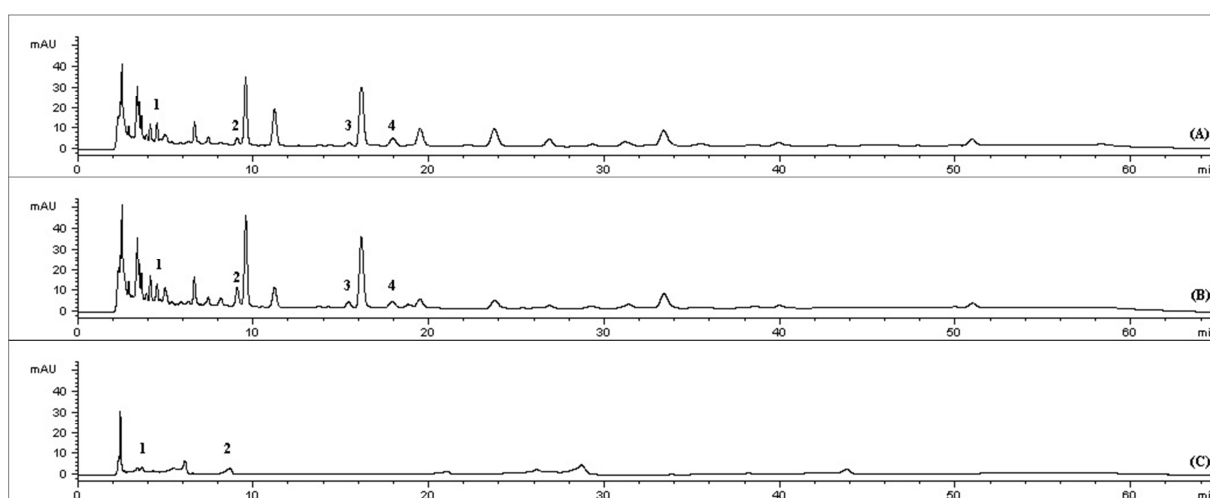


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS: (A) FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) ÁCIDO GÁLICO, (2) ÁCIDO CAFEICO, (3) ÁCIDO *P*-COUMARICO E (4) ÁCIDO FERRÚLICO

FONTE: O autor (2014)

Os extratos obtidos a partir das flores de yacon, apresentaram composição semelhante a observada nos extratos provenientes das folhas desta planta, entretanto, em concentrações menores, como apresentado na Tabela 14.

TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON

Composto	Concentração de Ácidos Fenólicos*		
	FLR INF	FLR DEC	FLR MTN
Ácido Gálico	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	1,36 ± 0,01
Ácido Cafeico	nd <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00	0,48 ± 0,00
Ácido Coumárico	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,00	Nd
Ácido Ferrúlico	0,16 ± 0,00	0,26 ± 0,00	Nd
Ácido Salicílico	nd	nd	Nd

\* mg/g de flores desidratadas ± desvio-padrão das triplicatas

<sup>a</sup> composto não detectado (<LD)

FONTE: O autor (2014)

Assim como, nos extratos das folhas, os extratos obtidos pela extração das flores de yacon com metanol, apresentaram concentrações mais elevadas de ácidos fenólicos. Sendo o ácido gálico, o ácido fenólico encontrado em maior concentração nestes extratos. Baydar e Baydar (2013), também relataram a presença deste ácido fenólico em extrato de flores de *Rose damascene*. Os extratos das flores de yacon também apresentaram concentrações menos significantes dos ácidos cafeico, *p*-coumárico e ferrúlico. A Figura 18 apresenta os cromatogramas obtidos na determinação de ácidos fenólicos dos extratos das flores de yacon.

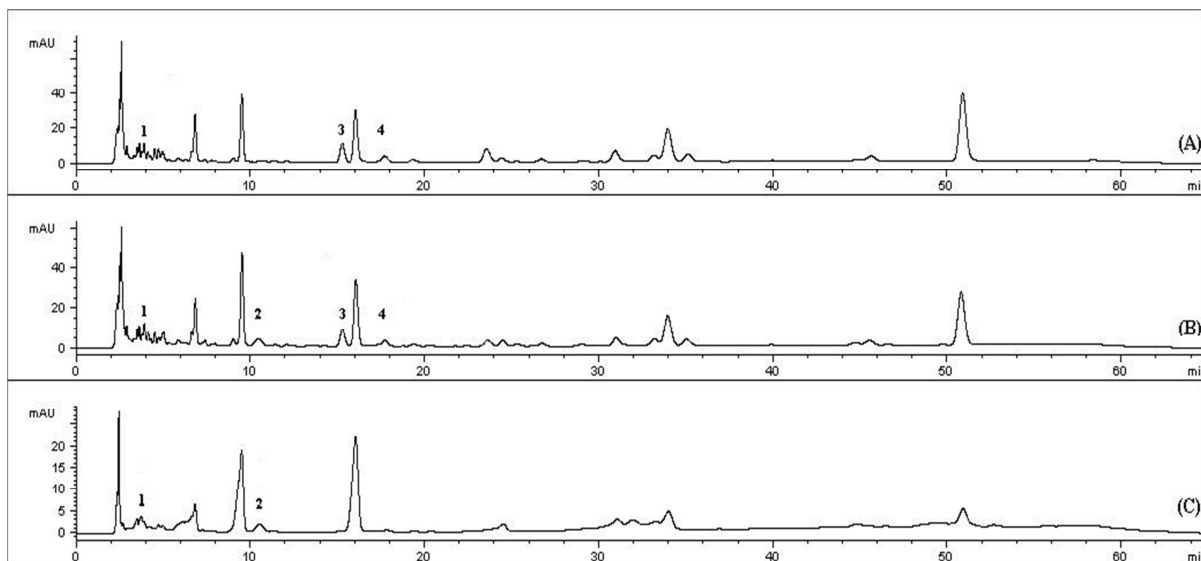


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA REFENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS: (A) FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) ÁCIDO GÁLICO, (2) ÁCIDO CAFEICO, (3) ÁCIDO *P*-COUMARICO E (4) ÁCIDO FERRÚLICO

FONTE: O autor (2014)

### 5.5.2 FLAVONOIDES

A identificação dos flavonoides das amostras, foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção dos picos, nos cromatogramas das amostras com o tempo de retenção e os espectros de absorção dos padrões de referência. Foi realizada a pesquisa dos seguintes flavonoides: rutina (Pico 1: TR= 13,37), miricetina (Pico 2: TR= 16,91), kaempferol (Pico 3: RT= 26,48) e quercetina (Pico 4: RT= 33,95).

A rutina foi o flavonoide encontrado em maior concentração nos extratos das folhas de yacon. O extrato obtido por infusão apresentou a concentração mais significativa deste composto. Os flavonoides quercetina e kaempferol não foram detectados nestes extratos (FIGURA 19). A miricetina também foi identificada e quantificada na extração por infusão e decocção, no entanto, em menor concentração em relação a rutina. Os extratos obtidos, pela extração das folhas de yacon com o solvente metanol, apresentaram maior diversidade destes compostos quando comparado com a infusão e decocção. Os flavonoides rutina, miricetina,

quercetina e kaempferol, foram identificados e quantificados nos extratos metanólicos, no entanto, em menores concentrações, como pode ser observado na Tabela 15. A presença destes flavonoides vem sendo relatada em diversas frutas vegetais como, tomate, brócolis e uvas e estão relacionados a processos antioxidativos, antitumorais e preventivos de diversas doenças degenerativas (HEIM *et al.*, 2002; RICE-EVANS *et al.*, 1995, 1996).

TABELA 15 - CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON

Composto	Concentração de Flavonoides*		
	FL INF	FL DEC	FL MTN
Rutina	2,81 ± 0,00	2,15 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Miricetina	1,34 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Quercetina	nd <sup>a</sup>	nd	0,01 ± 0,00
Kaempferol	nd	nd	0,03 ± 0,00

\* mg/g de folhas desidratadas ± desvio-padrão das triplicatas

<sup>a</sup> composto não detectado (<LD)

FONTE: O autor

A diferença na composição e no teor de flavonoides, nos extratos das folhas de yacon, pode ser explicada pela influência do solvente utilizado na extração, uma vez que, a eficiência de extração destes compostos estão diretamente relacionadas com características químicas das moléculas, solvente utilizado na extração pH e a temperatura de extração. Keinänem (1993) demonstrou que, solventes aquosos foram mais eficientes na extração de fenólicos em comparação com solvente orgânicos. Kalt *et al.* (2000) observou que, a extração destes compostos com água a 60°C foi mais eficiente nas extração destes compostos que a extração com água a temperatura ambiente.

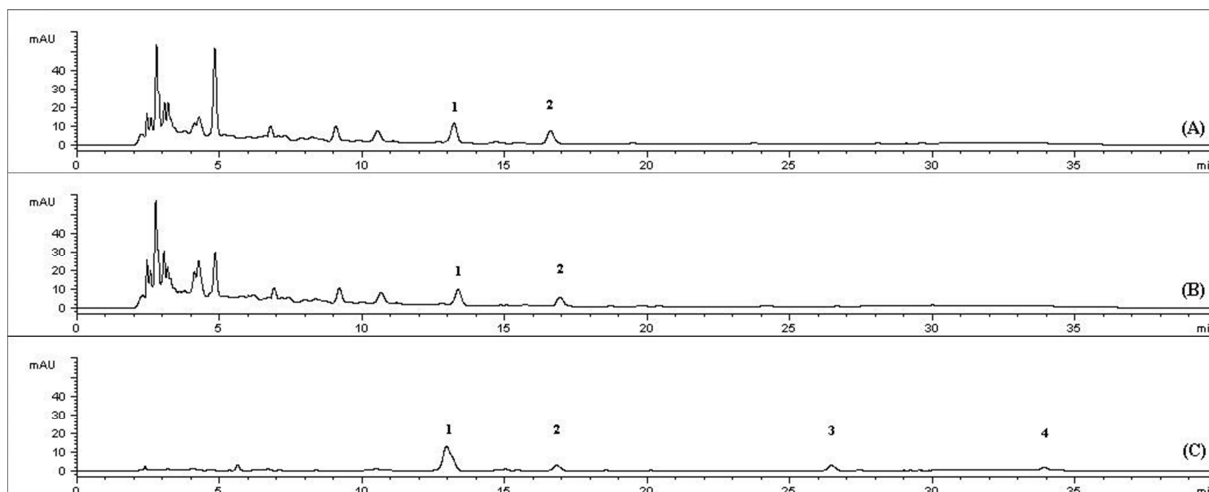


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA REFENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE YACON PARA A DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES: (A) FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) RUTINA, (2) MIRICETINA E (3) QUERCITINA

FONTE: O autor (2014)

Os extratos obtidos a partir das flores do yacon demonstraram concentração apreciáveis do flavonoide miricetina (TABELA 16).

TABELA 16 - CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON

Composto	Concentração de Flavonoides*		
	FLR INF	FLR DEC	FLR MTN
Rutina	0,90 ± 0,00	0,99 ± 0,00	0,54 ± 0,00
Miricetina	16,09 ± 0,04	11,61 ± 0,01	nd
Quercetina	nd <sup>a</sup>	nd	0,15 ± 0,00
Kaempferol	nd	nd	nd

\* mg/g de flores desidratadas ± desvio-padrão das triplicatas

<sup>a</sup> composto não detectado (<LD)

FONTE: O autor (2014)

O extrato FLR-INF apresentou os valores mais elevados deste flavonoide. O extrato FLR-DEC, também apresentou uma significativa concentração deste flavonoide. Sankara e Nair (1971) demonstraram que, a miricetina também é o flavonoide em maior concentração em flores de *Colophyllum inophyllum* L.. A rutina



também foi identificada e quantificada nos extratos aquosos, no entanto, em concentrações inferiores às de miricetina. O flavonoide miricetina não foi detectado nos extratos metanólicos das flores de yacon, sugerindo que o metanol é menos eficiente que a água na remoção deste composto das matrizes em questão. Isto pode ser explicado devido à baixa solubilidade das flavononas em etanol, metanol e misturas hidro alcólicas (MARSTON e HOSTETTMANN, 2006). O extrato FLR-MTN apresentou concentrações de quercetina, flavonoides não observados nos extratos aquosos.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas referentes a análise cromatográfica dos extratos de flores de yacon, obtidos nos ensaios de HPLC para a determinação da concentração dos flavonoides presentes nestes extratos.

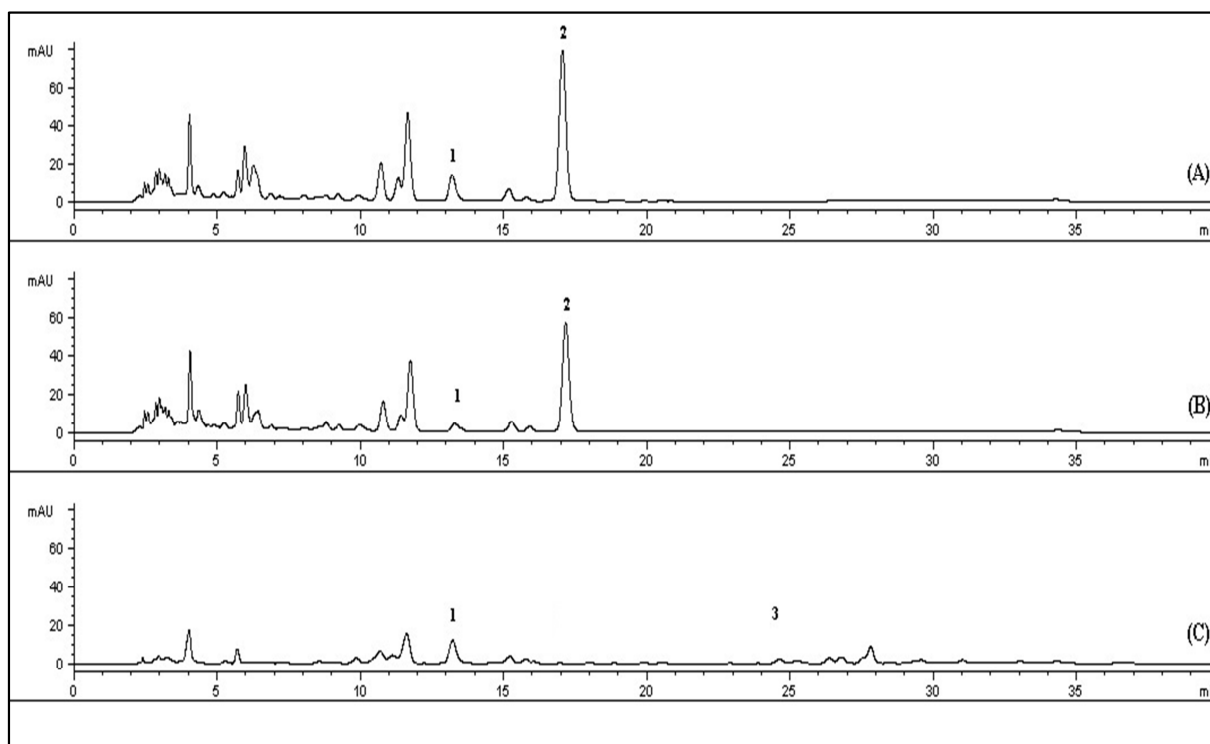


FIGURA 20 – CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS FLORES DE YACON PARA A DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES: (A) FL-INF, (B) FL-DEC E (C) FL-MTN; (1) RUTINA, (2) MIRICETINA, (3) QUERCITINA E (4) KAEMPFEROL

FONTE: O autor (2014)

## 5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON – MÉTODO DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método da captura do radical DPPH<sup>•</sup>, dos extratos das folhas e flores de yacon, foi realizada por meio da reação de uma alíquota dos extratos com a solução de radical *2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH<sup>•</sup>). A diminuição dos grupos hidroxilas presentes na solução, seguido do decréscimo da absorvância no comprimento de onda de 515 nm, pode ser correlacionada com capacidade destes extratos em capturar radicais livres do meio reacional, expresso como atividade antioxidante (EC<sub>50</sub> g DPPH/g) (BRAND-WILLIAMS; CULVELIER; BERSET, 1995).

Os extratos obtidos pelos processos de infusão e decocção de ambas as matrizes (folhas e flores de yacon), apresentaram resultados mais expressivos em relação àqueles observados nos extratos obtidos pela extração com metanol. Os resultados mais significativos foram observados nos extratos obtidos por decocção tanto das folhas quanto das flores os quais são apresentados na Tabela 17.

A correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos das folhas de yacon, apresentou fator de correção de  $r^2 = 0,998$ , sugerindo forte correlação entre os dois parâmetros. Os extratos das flores de yacon também demonstraram correlação positiva para esses mesmos parâmetros, apresentando um fator de correlação de  $r^2 = 0,937$ .

Uma forte correlação entre os resultados da determinação da concentração de flavonoides totais e a atividade antioxidante (DPPH), dos extratos das flores de yacon, pode ser observada com fator de correlação de  $r^2 = 0,998$ . O mesmo não foi observado na correlação entre os dados dos ensaios de flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH), dos extratos das folhas de yacon, que apresentou uma fraca correlação  $r^2 = 0,259$ . O que pode ser atribuída à reduzida concentração de compostos fenólicos apresentada por estes extratos, ou ainda a uma dificuldade do método analítico em demonstrar a atividade antioxidante dos extratos.

Baydar e Baydar (2013) observaram comportamento semelhante em estudo com extratos de *Rosa damascene Mill.* (Rosa de Damasco), em que foi observada uma forte correlação entre as concentrações de compostos fenólicos e a atividade antioxidante destes extratos.

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E ABTS DOS EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

Material	Tipo de Extração	DPPH	ABTS
Flores	FLR – INF	504,67 ± 34,13 <sup>a</sup>	209,37 ± 23,61 <sup>a</sup>
	FLR – DEC	282,09 ± 25,63 <sup>b</sup>	213,18 ± 21,73 <sup>a</sup>
	FLR – MTN	1014,29 ± 22,89 <sup>c</sup>	65,40 ± 0,65 <sup>b</sup>
Folhas	FL – INF	495,26 ± 39,94 <sup>a</sup>	422,13 ± 12,59 <sup>a</sup>
	FL – DEC	220,50 ± 2,63 <sup>b</sup>	391,55 ± 22,32 <sup>b</sup>
	FL – MTN	3571,85 ± 50,93 <sup>c</sup>	44,59 ± 2,26 <sup>c</sup>

\* EC<sub>50</sub> g de folhas ou flores desidratadas /g DPPH, média ± desvio padrão da triplicata

\*\* μMol equivalente Trolox / g de folhas ou flores desidratadas, média ± desvio padrão da triplicata  
Valores seguidos de letras diferentes na coluna são considerados significativamente diferentes ao teste de Tukey ( $P < 0.05$ )

FONTE: O autor (2014)

## 5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - ABTS DE EXTRATOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

Os dados obtidos nos ensaios de ABTS são apresentados na tabela 17 e revelaram que os extratos aquosos, obtidos por infusão e decocção, demonstraram maior eficiência na redução do cátion ABTS<sup>•+</sup>, sugerindo uma maior atividade antioxidante. Isto pode ser explicado pelos resultados obtidos nos ensaios para a determinação da concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais, uma vez que, estes compostos estão presentes em maior concentração nestes extratos.

A atividade antioxidante dos extratos, determinada pelo método ABTS, apresentou resultados que tiveram uma grande variação entre os diferentes processos de extração: entre 65,40 a 209,37 μM Trolox/g nos extratos das flores e 44,59 a 422,13 μM Trolox/g nos extratos das folhas de yacon. Em relação aos extratos provenientes das folhas de yacon, o extrato FL-INF foi o que apresentou os resultados mais expressivos (422,13 ± 12,59 μM Trolox/g). Nos extratos das flores, o extrato FLR-DEC apresentou maior capacidade antioxidante, no entanto, não foi

observada diferença significativa entre os resultados de atividade antioxidante deste extrato com o extrato FLR-INF, ao nível de significância de  $p < 0,05$ .

Uma boa correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante ABTS, foi observada tanto nos extratos das folhas como nos extratos das flores de yacon ( $r^2 = 0,999$  e  $r^2 = 0,992$ , respectivamente  $p < 0,05$ ). Uma forte correlação também pode ser observada entre os resultados de flavonoides totais e atividade antioxidante ABTS, para ambos os extratos de flores e folhas ( $r^2 = 0,986$  e  $r^2 = 0,933$ , respectivamente  $p < 0,05$ ).

A correlação favorável entre a concentração de compostos fenólicos dos extratos com a sua capacidade antioxidante, contribuem para explicar a hipótese de que, com o aumento da concentração destes compostos há um aumento na capacidade antioxidante destes extratos. Este comportamento também pode ser observado por Chirinos *et al.* (2013), na avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas medicinais da região dos Andes.

## 5.8 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS (LTS) DAS FOLHAS DE YACON

O procedimento de extração, isolamento e purificação das lactonas sesquiterpênicas presentes nas folhas do yacon foi baseada na metodologia descrita por Schorr e Da Costa (2003) e Genta *et al.* (2010). A extração de 150g de folhas secas de *Smallanthus sonchifolius* com 1L de diclorometano proporcionou a obtenção de 4,49g de extrato cru. O processo de retirada das ceras presentes no extrato ocasionou uma diminuição no rendimento para 1,84g.

Após a realização dos procedimentos de isolamento e purificação, 20mg de um precipitado cristalino (lactonas sesquiterpênicas) foi obtido (FIGURA 21), o qual foi encaminhado para identificação e quantificação por meio da cromatografia, em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). O rendimento de extração das lactonas sesquiterpênicas foi inferior ao reportado por Genta *et al.* (2010), que foi de 94mg a partir de 200g de folhas de yacon in natura, o menor rendimento pode ser atribuído ao processo de

secagem das folhas o qual contribui para uma grande perda dos tricomas e consequente diminuição da concentração destes compostos.

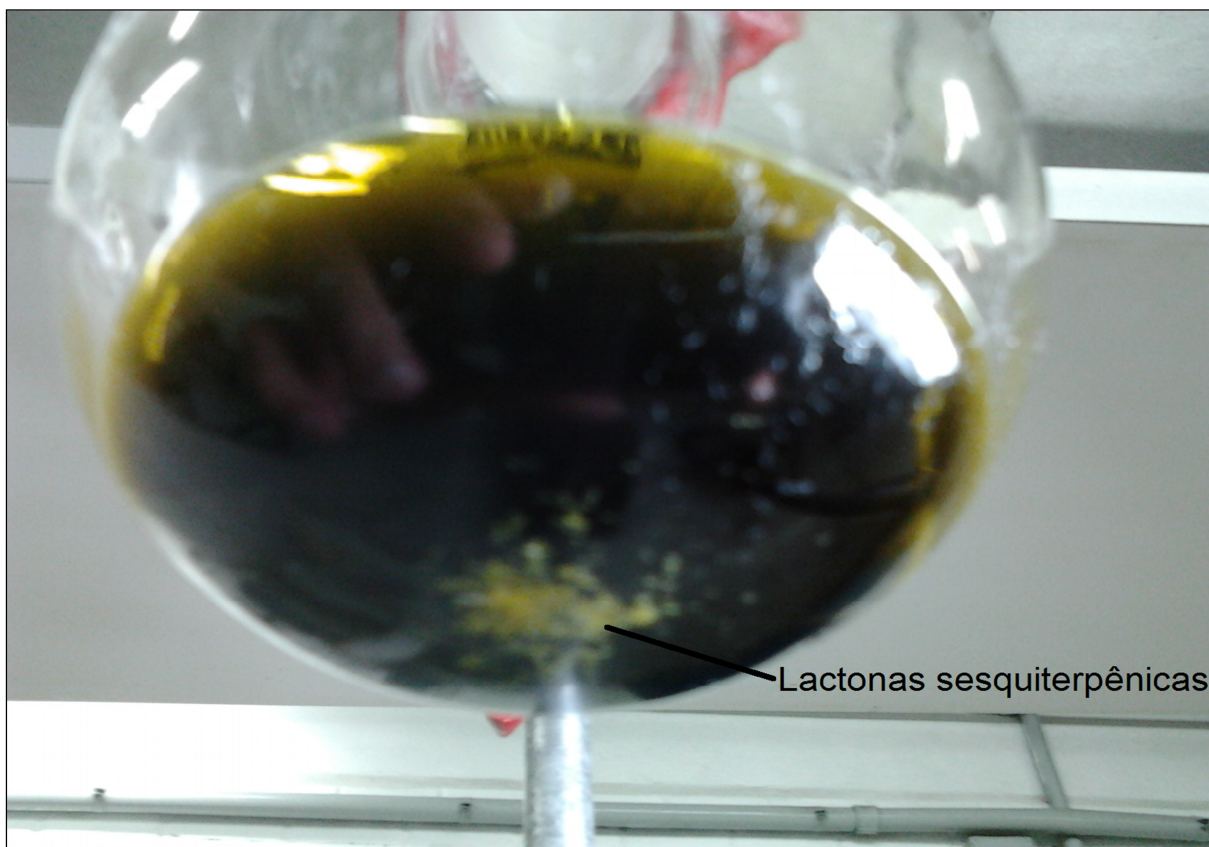


FIGURA 21 - LACTONAS SESQUITERPÊNICAS PRECIPITADAS DURANTE O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

## 5.9 ENSAIOS DE CG – EM

Após os procedimentos de isolamento das lactonas sesquiterpênicas das folhas de yacon, conforme descritos no item 5.9.1, foi realizada a identificação preliminar dos compostos presentes no produto de extração por meio da cromatografia gasosa, acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS). A identificação foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas com a biblioteca espectros de massas (NIST) do equipamento e também pela comparação com dados da literatura. Foram identificados os compostos enidrina e uvedalina, por meio da identificação de íons característicos provenientes da fragmentação das moléculas. Os íons  $m/z$  229, 256 e 348, característicos ao composto enidrina e os

íons  $m/z$  213 e 272, característico ao composto uvedalina também foram identificados. Estes íons foram anteriormente observados no trabalho de identificação de lactonas sesquiterpênicas, realizado por Lin; Hasegawa; Kodama (2003). As Figuras 22 e 23 apresentam os espectros de massa, obtido a partir da análise das lactonas sesquiterpênicas extraídas de folhas de *Smallanthus sonchifolius*.

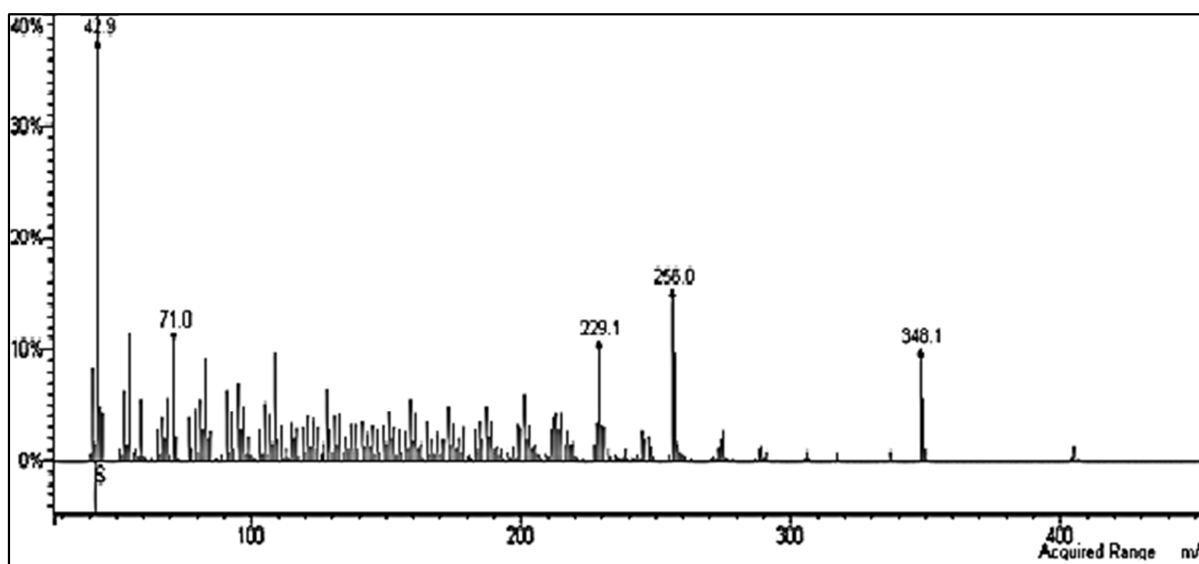


FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE À SUBSTÂNCIA ENIDRINA

FONTE: O autor (2014)

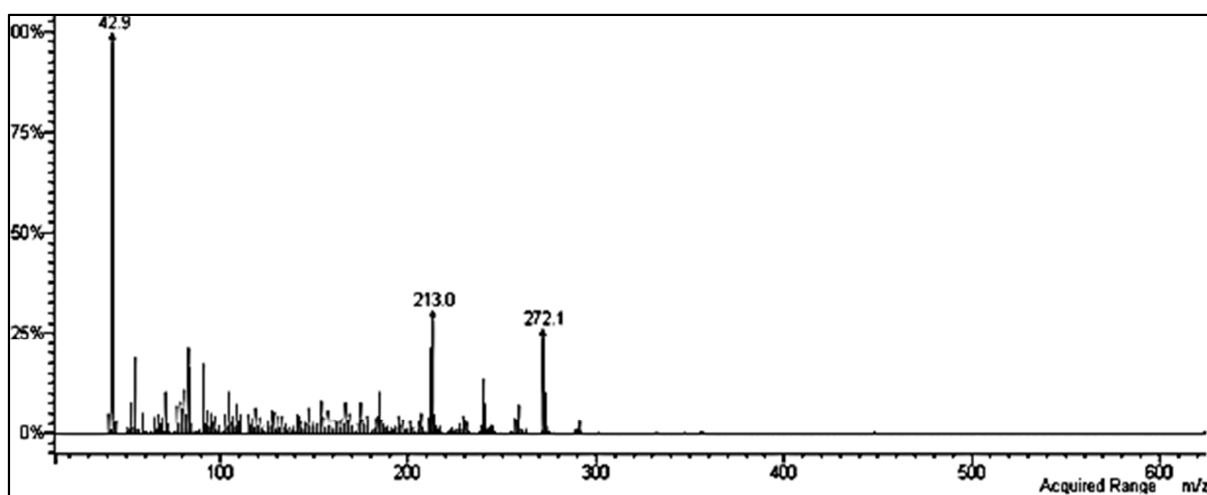


FIGURA 23 – ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE À SUBSTÂNCIA UVEDALINA

FONTE: O autor (2014)

## 5.10 IDENTIFICAÇÃO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON POR MEIO DA RMN

Partindo do pressuposto que, a amostra se tratava de uma mistura binária de enidrina ( $_{enh}$ ) e uvedalina ( $_{uve}$ ) (FIGURA 22 e 23), como observado previamente na análise de CG-MS, foi possível atribuir os sinais para cada uma das substâncias.

Na análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , oito simpletos de hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_3$ ) foram observados nos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em  $\delta$  1,45 ( $\text{H-5}'_{enh}$ ); 1,47 ( $\text{H-5}'_{uve}$ ); 1,71 ( $\text{H-15}_{enh}$ ); 2,00 ( $\text{H-2}''_{uve}$ ); 2,01 ( $\text{H-15}_{uve}$ ); 2,05 ( $\text{H-2}''_{enh}$ ); 3,80 ( $\text{H-1}'''_{uve}$ ); e 3,83 ( $\text{H-1}'''_{enh}$ ). Os sinais em  $\delta$  1,17 (d,  $J= 5,5\text{Hz}$ ) e 1,20 (d,  $J= 4,8\text{Hz}$ ), foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos  $\text{H-4}'$  de enidrina e uvedalina, respectivamente.

Os hidrogênios metínicos ( $\text{CH}$ ) da enidrina foram observados nos  $\delta$  2,67 (d,  $J= 9,7\text{Hz}$ ,  $\text{H-5}$ ); 4,28 (dd,  $J= 9,7 \times 2 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-6}$ ); 5,87 (d,  $J= 8,6\text{Hz}$ ,  $\text{H-9}$ ); 6,71 (dd,  $J= 8,4, 1,05 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-8}$ ); 7,14 (d,  $J= 7,6\text{Hz}$ ,  $\text{H-1}$ ). Os sinais de hidrogênio estão de acordo com o observado para esta substância, segundo Hertz e Bhat (1973).

Para a uvedalina, os hidrogênios metínicos foram observados nos  $\delta$  2,79 (dtd,  $J= 9,7, 3,3 \times 2 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-7}$ ); 4,96 (dd,  $J= 10,4; 0,7 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-5}$ ); 5,11 (dd,  $J= 10,1 \times 2 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-6}$ ); 5,41 (d,  $J= 8,4\text{Hz}$ ,  $\text{H-9}$ ); 6,66 (dd,  $J= 8,3, 1,4 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-8}$ ); 7,01 (dd,  $J= 10,3, 7,6 \text{ Hz}$ ,  $\text{H-1}$ ). Os sinais de hidrogênio estão de acordo com o observado para esta substância, segundo Hertz e Bhat (1970).

A confirmação das estruturas de enidrina e uvedalina (FIGURA 24) foi realizada por meio dos  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$ , observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 27) e DEPT e nos espectros de correlação ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ )-HSQC (FIGURA 28) e ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ )-HMBC (FIGURA 29).

A proporção entre os dois triterpenos presentes na mistura foi determinada pela relação entre as integrais dos hidrogênios  $\text{H-1}$  em  $\delta$  7,15 (enidrina) e 7,01 (uvedalina), dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  quantitativo. A relação mostrou que, a amostra se encontra em uma mistura de relação 1:3,5 de uvedalina e enidrina, respectivamente (FIGURA 25).

Os  $\delta$  de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , as correlações ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ )-HSQC e ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ )-HMBC estão apresentados na Tabela 18 (enidrina) e Tabela 19 (uvedalina), que demonstram os valores de  $\delta_c$  apresentados na literatura.

TABELA 18 - SINAIS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO NOS EXPERIMENTOS DE RMN 1D E 2D DA ENIDRINA

C	$\delta_c$ (ppm)	HSQC $\delta_H$ [m, J, J]	HMBC C n°	$\delta_c^a$ (ppm)
1	149,4	7,15 [dd, $J= 10,5; 7,6$ Hz, 1H]	C-2; C-10; C-14	147,4
2	24,7	2,46 [m, 1H] 2,99 [m]	- -	24,7
3	35,4	1,19 - 1,26 [m, 1H] 2,35 [m, 1H]	- -	39,4
4	59,3	-	-	58,9
5	62,8	2,68 [d, $J= 9,7$ Hz, 1H]	C-3; C-4; C-6; C-7	62,7
6	75,9	4,28 [dd, $J= 9,7$ Hz x 2, 1H]	C-4; C-5; C-7; C-8	75,8
7	45,5	2,99 [m]	-	45,5
8	71,2	6,71 [dd, $J= 8,4; 1,1$ Hz]	C-6; C-7; C-9; C-11; C-1'; OOC-CH3	71,3
9	70,4	5,87 [d, $J= 8,6$ Hz, 1H]	C-1; C-8; C-10; C-14; OOC-CH3	70,7
10	130,1	-	-	130,3
11	133,3	-	-	134,4
12	167,9	-	-	168,5
13	122,9	5,84 [d, $J= 3,2$ Hz, $H_{trans}$ , 1H] 6,33 [d, $J= 3,6$ , $H_{cis}$ , 1H]	C-7; C-11; C-12 C-7; C-11; C-12	121,7
14	165,5	-	-	165,5
15	17,5	17,5 [s, 3H]	C-3; C-4; C-5	17,4
1'	168,3	-	-	167,9
2'	59,4	-	-	59,1
3'	59,9	2,99 [m]	-	59,5
4'	13,6	1,17 [d, $J= 5,5$ Hz, 3H]	C-2'; C-3'	13,6
5'	19,0	1,45 [s, 3H]	C-1'; C-2'; C-3'; C-4'	19,1
OOC-CH3	170,3	-	-	170,2
OOC-CH3	20,8	2,05 [s, 3H]	C-9; OOC-CH3	20,2
CH3-O	52,5	3,83 [s, 3H]	C-14	51,8

<sup>a</sup> INOUE *et al.*, (1995)

FONTE: O autor (2014)



TABELA 19 - SINAIS DE DESLOCAMENTO QUÍMICO NOS EXPERIMENTOS DE RMN 1D E 2D DA UVEDALINA

C	$\delta_c$ (ppm)	HSQC $\delta_H$ [m, J, J]	HMBC C n°	$\delta_c^a$ (ppm)
1	148,3	7,01 (dd, $J= 10,3, 7,6$ Hz, 1 H)	C-2; C-9; C-14	148,1
2	26,1	2,65 - 2,71 (m)	-	26,1
		2,43 - 2,50 (m)	-	
3	36,9	2,40 (ddd, $J= 12,0, 6,1, 2,1$ Hz, 1 H)	C-2; C-4; C-5; C-15	36,8
		1,94 - 2,08 (m)	-	
4	138,6	-	-	131,1
5	126,1	4.96 (dd, $J= 10,40, 0,74$ Hz, 1 H)	C-3; C-6; C-7; C-15	126,9
6	75,2	5.11 (dd, $J= 10,10$ Hz, 1 H)	C-4; C-5; C-7; C-8	74,9
7	50,9	2.79 (dtd, $J= 9,75, 3,27, 3,27, 1,58$ Hz, 1 H)		51,1
8	71	6.66 (dd, $J= 8,30, 1,37$ Hz, 1 H)	C-6; C-7; C-9; C-10; C-1'	71,3
9	71,03	5.41 (d, $J= 8,41$ Hz, 1 H)	C-a; C-8; C-10; C-14; C-1'	71,1
10	130,8	-	-	135,5
11	134,5	-	-	137,9
12	169	-	-	168,6
13	121,5	5.73 (d, $J= 2,94$ Hz, 1H)	C-7	120,6
		6.26 (d, $J= 3,36$ Hz, 1 H)	C-11	
14	165,8	-	-	165,7
15	17,5	2,01 [s, 3H]	C-2; C-3; C-4	16,5
1'	168,5	-	-	168,7
2'	59,7	-	-	59,2
3'	59,9	2,99 [m, 10H]	-	59,6
4'	13,6	1,19 (d, $J= 5,25$ Hz, 1 H)	-	13,7
5'	19,1	1,47 [s, 3 H]	C-2'; C-3'	19,3
<u>OO</u> C-CH3	170,1	-	-	170
<u>OO</u> C-CH3	20,8	2,00 [s, 3 H]	C-9; C-1''	20,3
CH3-O	52,5	3,80 [s, 3 H]	C-14	51,8

<sup>a</sup>INOUE *et al.* (1995)

FONTE: O autor (2014)

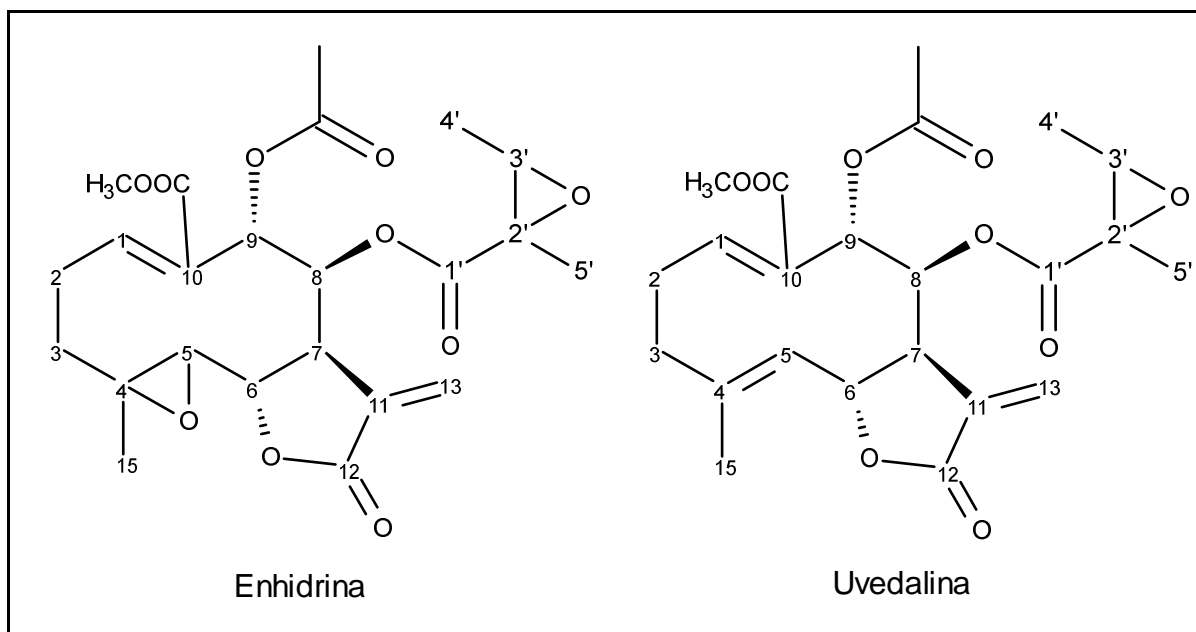


FIGURA 24 - ESTRUTURA DA ENIDRINA E DA UVEDALINA. CARBONOS NUMERADOS CONFORME IUPAC

FONTE: IUPAC

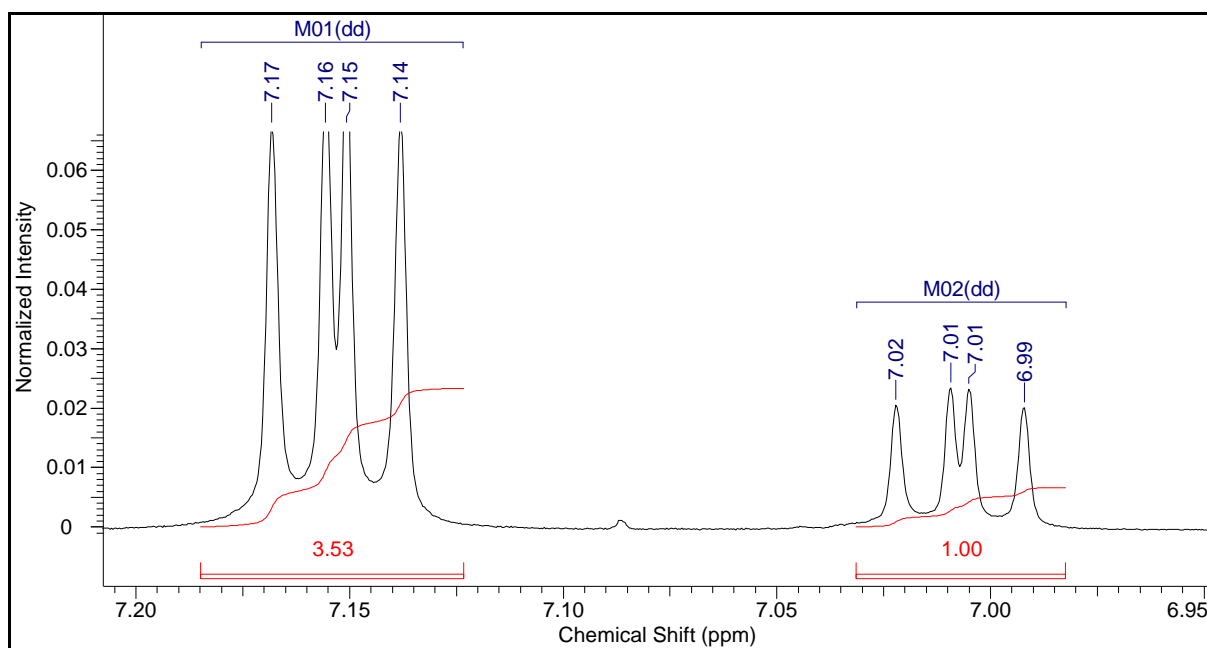


FIGURA 25 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE  $\delta$  6,9 E 7,2 DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  QUANTITATIVO DA FRAÇÃO ENIDRINA, MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE ENIDRINA ( $\delta$  7,15) E UVEDALINA ( $\delta$  7,01) (600 MHz, SOLVENTE/REFERÊNCIA:  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ )

FONTE: O autor (2014)

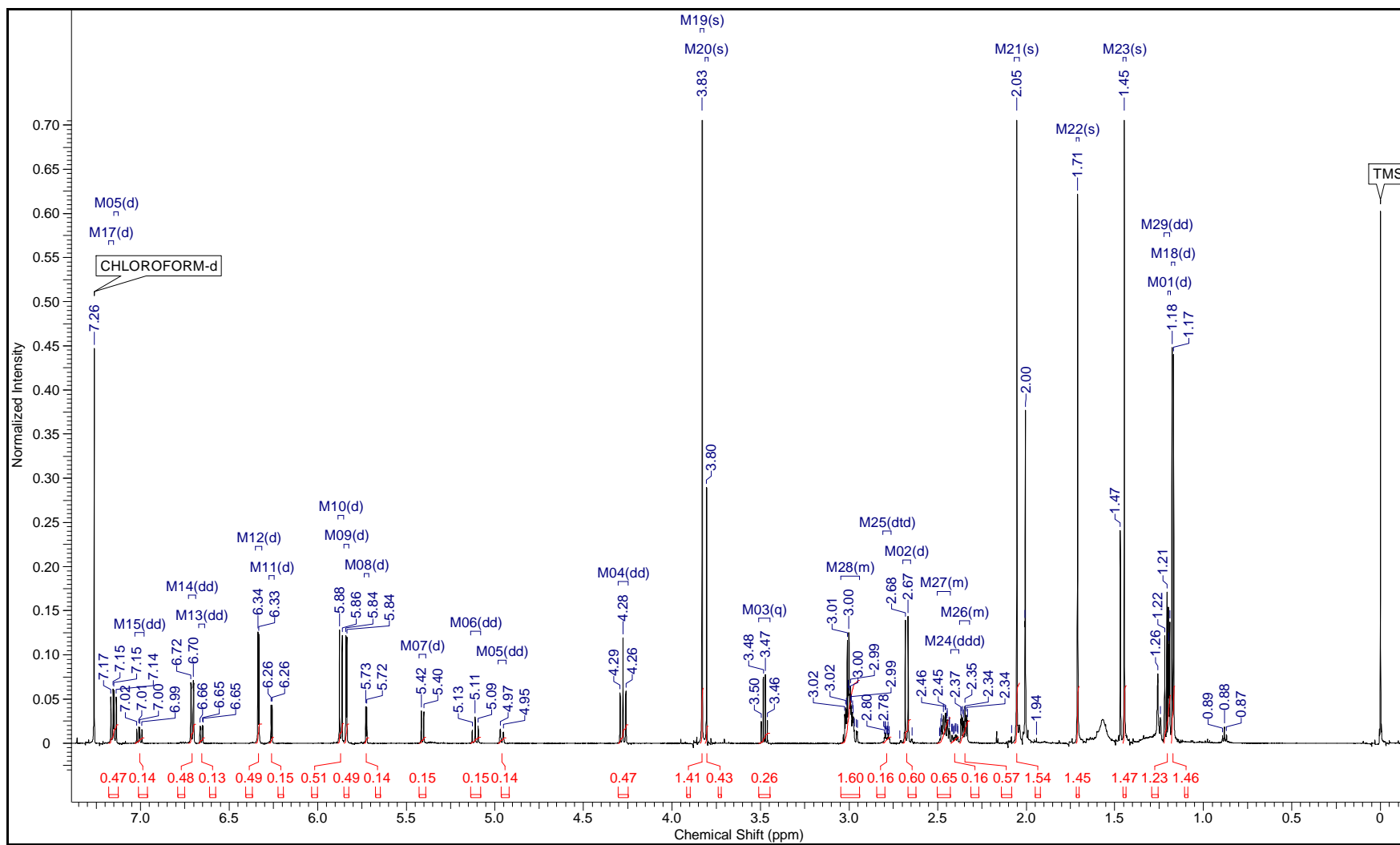


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO ENIDRINA (600MHz, SOLVENTE/REFERÊNCIA:  $\text{CDCl}_3$ /TMS)

FONTE: O autor (2014)

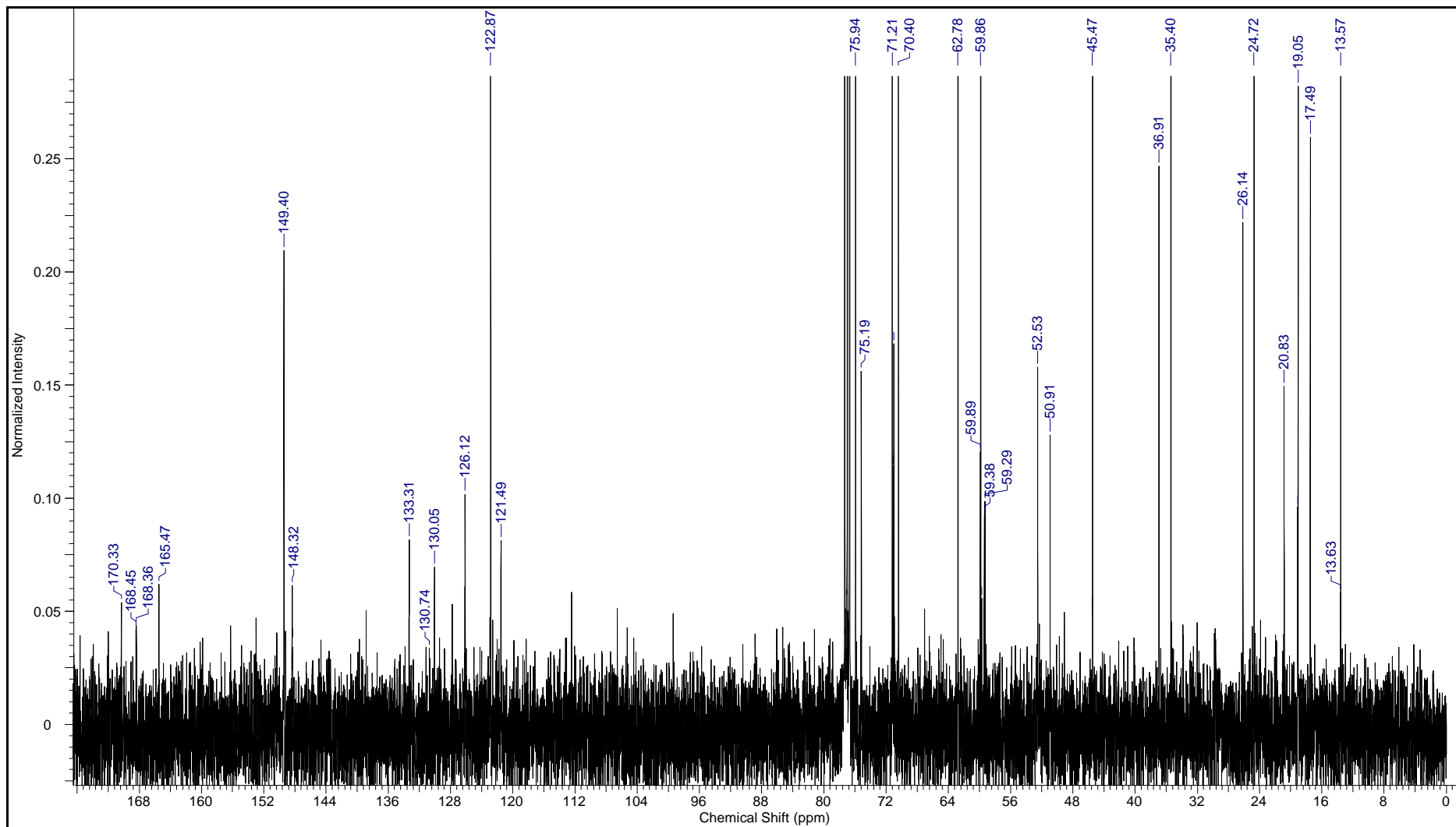


FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO ENIDRINA (150MHZ, SOLVENTE/REFERÊNCIA:  $\text{CDCl}_3/\text{CDCl}_3$ )

FONTE: O autor (2014)

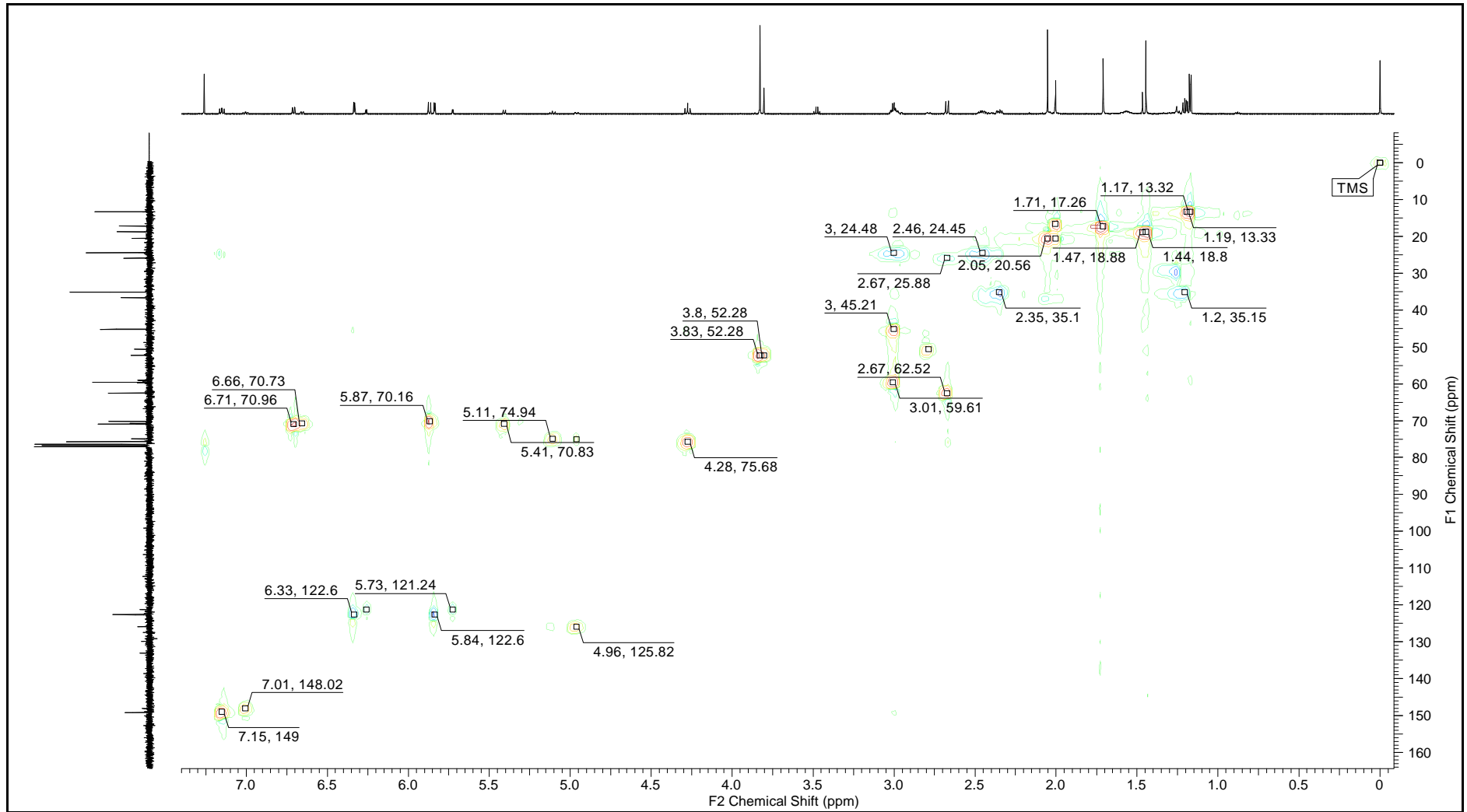


FIGURA 28 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) - HSQC (EDITADO) DA FRAÇÃO ENIDRINA (SOLVENTE/REFERÊNCIA:  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ )

FONTE: O autor (2014)

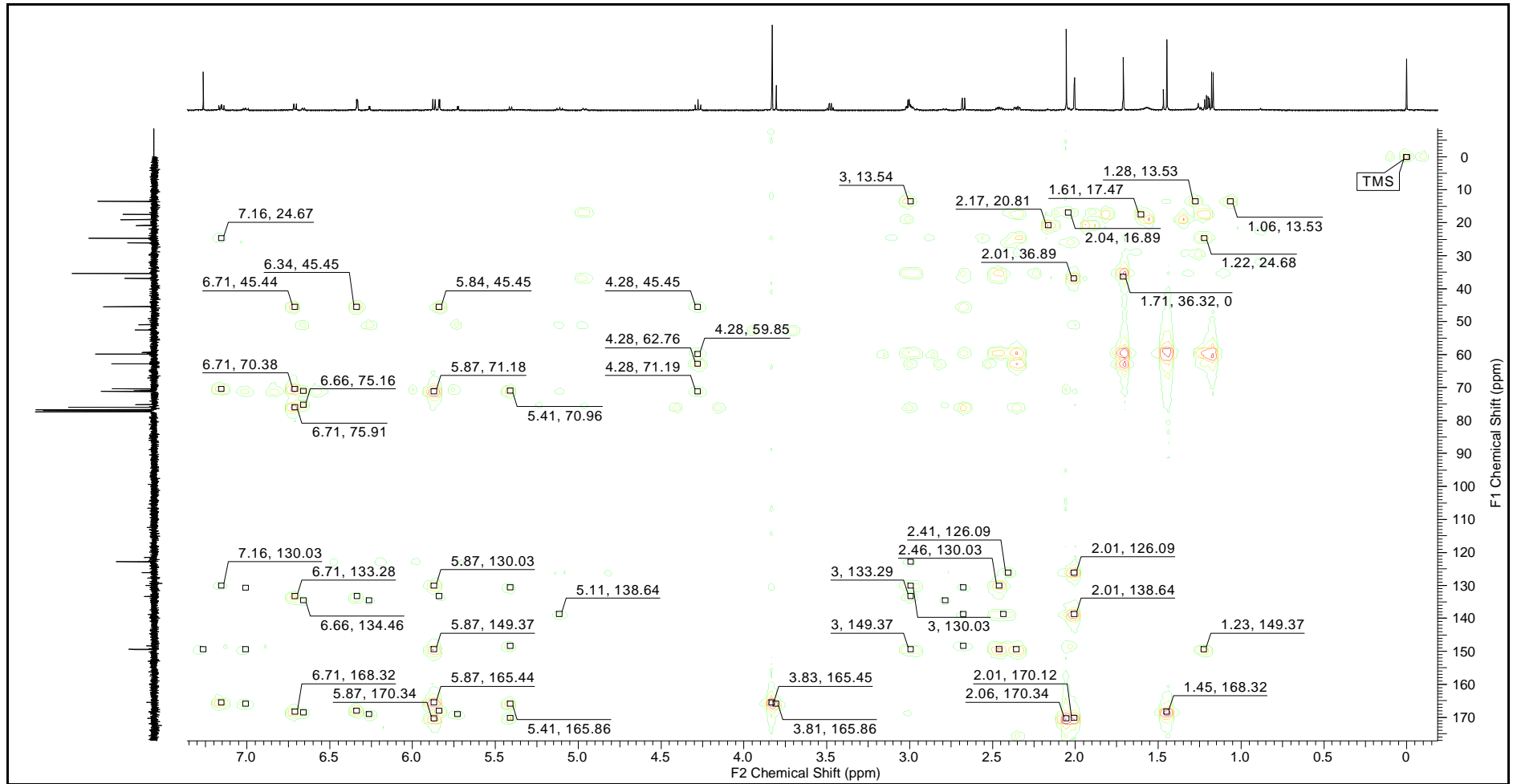


FIGURA 29 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) - HMBC DA FRAÇÃO ENIDRINA (SOLVENTE/REFERÊNCIA:  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ )

FONTE: O autor (2014)

### 5.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS E FLORES DE YACON E LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON

Avaliação da atividade antimicrobiana por meio da técnica de difusão em discos (Kirby & Bauer), dos extratos aquosos e metanólicos de folhas e flores de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) obtidos conforme item 4.2.2 não apresentaram resultados positivos frente nenhum dos organismos estudados tanto gram-negativos; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 11220 e *Salmonella entérica* ATCC 14028, quanto ao micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 conforme demonstrado pela Tabela 20. Joung *et al.*, (2010) obtiveram resultados semelhantes na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de folhas de yacon por meio da extração com diversos solventes como n-hexano, acetato de etila, n-butano e água contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). A Figura 30 apresenta a imagem das placas de ágar Mueller-Hinton utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana demonstrando a inatividade dos extratos frente aos organismos avaliados, uma vez que, não foram observados halos de inibição frente aos micro-organismos testados.

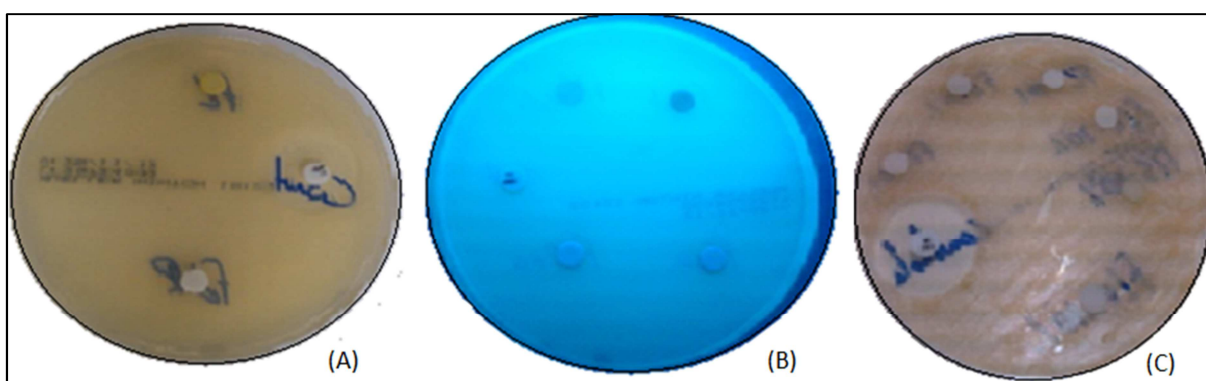


FIGURA 30 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS AQUOSOS E METANÓLICOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON: (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli* E (C) *Pseudomonas aeruginosa*

FONTE: O autor (2014)

## 5.12 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON

TABELA 20 - LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS AQUOSOS E METANÓLICOS DE FOLHAS E FLORES DE YACON

	Leitura dos halos Inibitórios (mm)						Ampicilina 10µg
	FL INF	FL DEC	FL INF	FLR DEC	FL MTN	FLR MTN	
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	23,0±0,0
<i>Staphylococcus Aureus</i>	-	-	-	-	-	-	26,0±0,0
<i>Salmonella entérica</i>	-	-	-	-	-	-	26,0±0,0

FONTE: (O Autor)

Haja vista que, inúmeros trabalhos demonstram a presença destes compostos (enidrina e uvedalina) em concentrações consideráveis nesta matriz, além de atribuírem a eles propriedade antifúngica e antibacteriana a estas substâncias (LIN *et al.*, 2013; GENTA *et al.*, 2010; JOUNG *et al.*, 2010). Avaliamos a atividade antimicrobiana das lactonas sesquiterpênicas das folhas de yacon. Esta atividade vem sendo reportada em diversos estudos durante os últimos anos, como o de Lin *et al.* (2003), em que foram identificadas 6 lactonas sesquiterpênicas em extratos metanólicos de folhas de yacon, sonchifolina, uvedalina, enidrina, fluctuanina, 8β-Tigloyloxymelampolid-14-0-oic acido metil éster e 8β-Methacryloyloxymelampolid-14-0-oic acido metil éster, as quais apresentaram atividade antibacteriana contra o *Bacillus subtilis* e atividade antifúngica contra *Pyricularia oryzae*.

Os ensaios de atividade antimicrobiana das lactonas sesquiterpênicas (uvedalina / enidrina) não apresentaram resultados positivos frente aos organismos gram-negativos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 11220 e *Salmonella entérica* ATCC 14028, em ambas as condições experimentais na ausência e sob a presença de luz artificial (4000 Lux), nas concentrações avaliadas



de 10 e 90 µg por disco de LT(s) (FIGURA 31), como apresentado nas Tabelas 20 e 21.

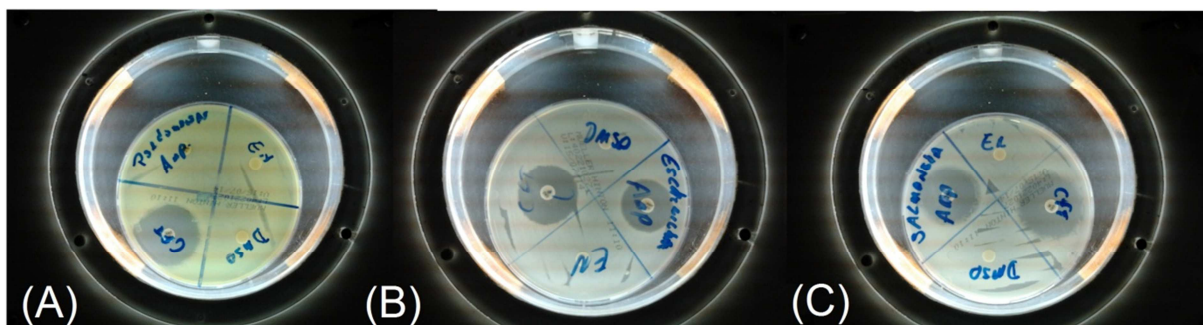


FIGURA 31 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON: (A) *Pseudomonas aeruginosa*; (B) *Escherichia coli*; (C) *Salmonella enterica*.

FONTE: O autor (2014)

A exposição das LT(s) não resultaram na potencialização do efeito antimicrobiano das lactonas sesquiterpênicas, desta maneira, não foi possível confirmar os resultados obtidos por Joung *et al.* (2010), em que o efeito antibacteriano dos extratos das folhas de yacon contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA) apresentaram um aumento considerável, quando os experimentos foram conduzidos nesta condição.

TABELA 21 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/DISCO NA AUSÊNCIA DE LUZ

Antimicrobiano	Leitura dos Halos de Inibição (mm) – Ausência de Luz			
	DMSO	Enidrina/Uvedalina 10 µg	Ampicilina 10 µg	Ceftazidima 30 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	23,9 ± 1,4
<i>Escherichia coli</i>	-	-	23,0 ± 0,0	26,5 ± 2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	45,2 ± 1,5	23,0 ± 0,0
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	28,5 ± 2,1	27,0 ± 1,4

FONTE: O autor (2014)

TABELA 22 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS E FLORES DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 10 µg/DISCO NA PRESENÇA DE LUZ

Leitura dos Halos de Inibição (mm) – Presença de Luz (4000 lux)				
Antimicrobiano	DMSO	Enidrina/Uvedalina 10µg	Ampicilina 10 µg	Ceftazidima 30 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	23,9 ± 1,4
<i>Escherichia coli</i>	-	-	23,0 ± 0,0	26,5 ± 2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	45,2 ± 1,5	23,0 ± 0,0
<i>Salmonella entérica</i>	-	-	28,5 ± 2,1	27,0 ± 1,4

FONTE: O autor (2014)

Os ensaios para a determinação da atividade antimicrobiana revelaram o potencial das lactonas sesquiterpênicas isoladas (enidrina / uvedalina), em inibir o crescimento do micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus* na concentração testada de 90 µg de LT(s) / disco. Os halos de inibição foram observados em ambas as condições experimentais, na presença e ausência de luz (TABELA 23 e 24). A mistura de LT(s) demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* com halos de inibição com diâmetros de  $8,67 \pm 0,57$  mm (FIGURA 32).

TABELA 23 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 90 µg/DISCO NA AUSÊNCIA DE LUZ

Leitura dos Halos de Inibição (mm) – Ausência de Luz				
Antimicrobiano	DMSO	Enidrina/Uvedalina 90 µg	Ampicilina 10 µg	Ceftazidima 30 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	25,0 ± 0,0
<i>Escherichia coli</i>	-	-	23,0 ± 0,0	28,0 ± 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	8,67 ± 0,57	46,3 ± 0,0	23,0 ± 0,0
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	27,0 ± 0,0	28,0 ± 0,0

FONTE: O Autor (2014)

Nos ensaios realizados com concentração de 10 µg LT(s) / disco não foi possível observar a inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*, fato que

pode ser atribuído a baixa concentração das lactonas utilizadas no experimento, a qual não foi suficiente para promover uma inibição efetiva do crescimento do micro-organismo.

A partir deste estudo é possível inferir que a exposição das LT(s) enidrina e uvedalina à luz (4000 Lux), não é capaz de promover um aumento na capacidade antimicrobiana destes compostos contra o *Staphylococcus aureus*. Os resultados também sugerem que a potencialização da inibição do crescimento, promovida por extratos obtidos pela extração com solventes apolares de folhas de yacon contra *Staphylococcus aureus* (MRSA), descrita por Joung *et al.* (2010), não está relacionada com a presença destes compostos uma vez que, este comportamento não foi observado quando estas substâncias foram testadas isoladamente.

TABELA 24 – LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DE FOLHAS DE YACON NA CONCENTRAÇÃO DE 90 µg/DISCO NA PRESENÇA DE LUZ

Leitura dos Halos de Inibição (mm) – Presença de Luz (4000 lux)				
Antimicrobiano	DMSO	Enidrina/Uvedalina 90 µg	Ampicilina 10 µg	Ceftazidima 30 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	24,5 ± 3,5
<i>Escherichia coli</i>	-	-	23,5 ± 0,7	26,0 ± 1,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	8,67 ± 0,57	48,0 ± 1,4	22,5 ± 0,7
<i>Salmonella entérica</i>	-	-	26,5 ± 0,7	28,0 ± 1,4

FONTE: O autor (2014)

A partir dados obtidos nos ensaios de determinação da atividade antimicrobiana das LTs (enidrina / uvedalina), extraídas das folhas de *Smallanthus sonchifolius*, podemos observar que estes compostos são capazes de promover a inibição do crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 na concentração de 90ug por disco. (9,0 mg/mL), atestando desta forma a atividade antimicrobiana da mistura binária de enidrina / uvedalina (75:25). O mesmo não foi observado para os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 11220.

Não foi observado efeito sinérgico das LTs com a luz. Os halos inibitórios observados nos experimentos contra *Staphylococcus aureus* em condições de presença e ausência de luz (4000 lux), não apresentaram diferença estatística, demonstrando desta forma, que não houve sinergia da luz com as lactonas sesquiterpênicas estudadas.

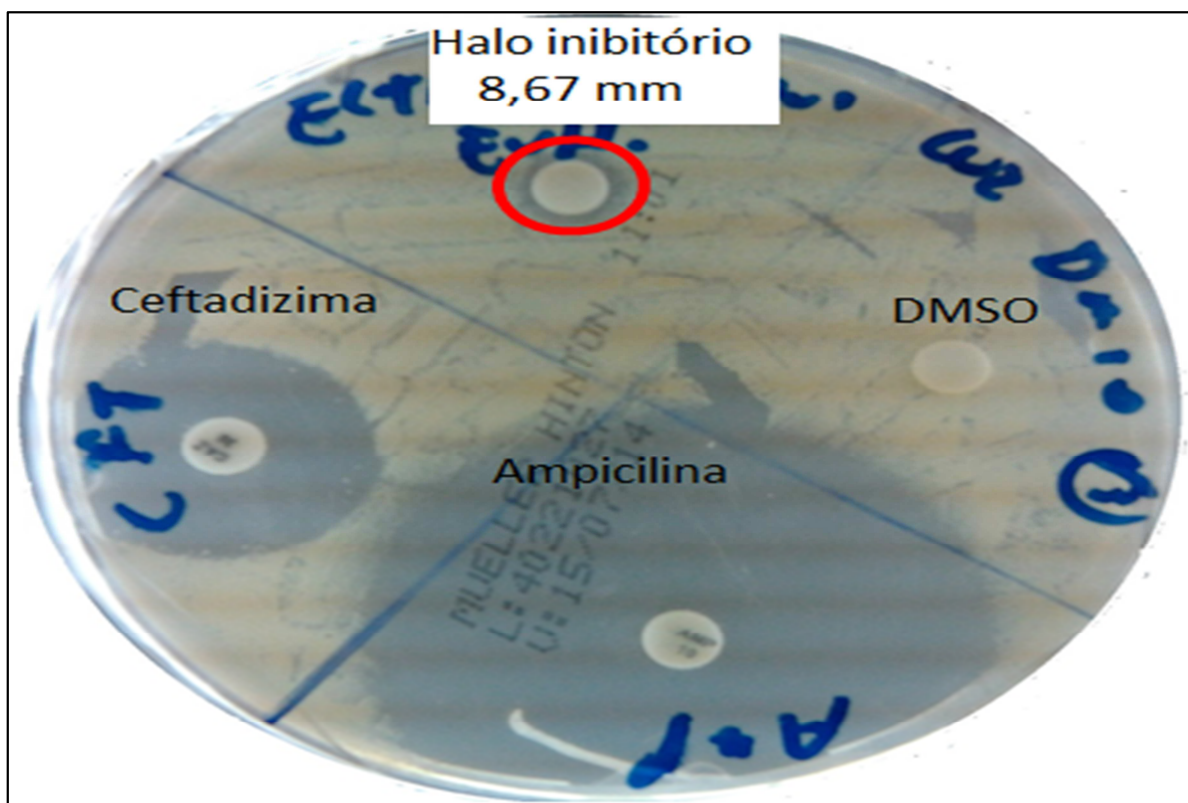


FIGURA 32 – PLACAS DE ÁGAR MUELLER-HINTON UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM RESULTADO POSITIVO CONTRA *Staphylococcus aureus*

FONTE: O autor (2014)

### 5.13 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) IN VITRO DE LACTONAS SESQUITERPÊNICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE YACON FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Com base nos resultados obtidos nos ensaios, para a determinação da atividade antimicrobiana, foram realizados ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra o micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, uma vez que, este apresentou susceptibilidade às LT(s) provenientes de folhas de yacon, como descrito anteriormente.

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo. A CIM *in vitro* das LT(s) (enidrina / uvedalina) contra *Staphylococcus aureus* foi determinada segundo a metodologia descrita pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (2006) método M27-A7 (micro diluição em caldo Muller-Hinton).

Estes resultados corroboram os obtidos nos ensaios para a determinação da atividade antimicrobiana das LT(s) (enidrina / uvedalina), obtidas a partir das folhas de *Smallanthus sonchifolius* (yacon), demonstrando desta forma que, a bactéria mais susceptível a estes compostos, dentre os micro-organismos testados, foi o *Staphylococcus aureus*. Este fato demonstra a relevância dos resultados obtidos, uma vez que, este micro-organismo apresenta resistência a diversos antibióticos, além de ser considerado responsável pela produção de enterotoxinas causadoras de inúmeros tipos de septicemias (ZARAI *et al.*, 2013).

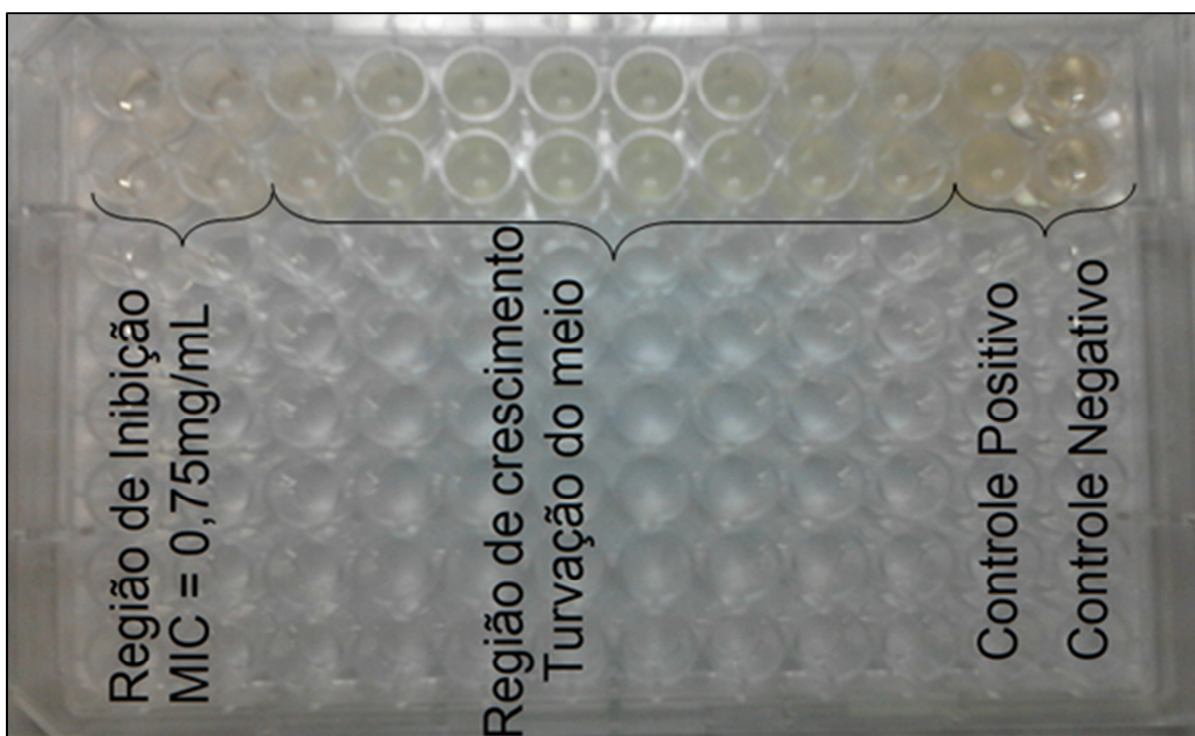


FIGURA 33 – ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA CONTRA *Staphylococcus aureus*

FONTE: O autor (2014)

## 6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos na determinação da composição físico-química das folhas desidratadas de yacon demonstraram estar em concordância com aqueles encontrados na literatura, reafirmando o potencial desta matriz como fonte dos minerais cálcio e fósforo. Também foi revelada a presença de 19 ácidos graxos, sendo os saturados em maior concentração, tendo como principal componente da fração lipídica o ácido palmítico (C16:0).

Em relação à caracterização das flores desidratadas de yacon, foi constatado que, assim como, o observado nas folhas desta planta, o cálcio é o mineral em maior concentração (6180,70 mg/kg), seguido por magnésio e fósforo (3992,74 e 3127,66 mg/Kg, respectivamente). Em relação ao perfil de ácidos graxos, o ácido linoleico (C18:2) foi o ácido graxo em maior concentração dentre os 16 ácidos graxos identificados e os ácidos graxos poli-insaturados são majoritários na fração lipídica destas flores.

Os experimentos para avaliação do rendimento dos processos de extração das folhas de yacon demonstraram que, os processos de infusão e decocção apresentaram o maior rendimento com relação à concentração de sólidos totais (32,74%, e 32,91%). Em relação à extração das flores de yacon, o processo de extração por soxleht (metanol) apresentou o melhor rendimento (44,77%) em relação aos demais processos de extração.

A partir da determinação da concentração de compostos fenólicos totais, dos extratos das folhas e das flores de yacon foi possível inferir que, estas matrizes são promissoras fontes destes compostos, os processos de extração por infusão e decocção são estatisticamente iguais com relação à capacidade de extração destes compostos e que ambos os processos são mais eficientes na remoção destes compostos do que a extração por soxleht (metanol).

Os ensaios para a quantificação de flavonoides totais revelaram a presença de concentrações apreciáveis destes compostos nos extratos das folhas de yacon. A decocção apresentou os resultado mais relevantes (39,71 ER mg/g), em contrapartida, a extração com a utilização de metanol foi a menos eficiente na remoção destes componentes desta matriz.

Os flavonoides totais dos extratos das flores de yacon, a infusão e a decocção apresentaram os resultados mais relevantes (18,33 e 15,03 ER mg/g, respectivamente), não sendo possível verificar diferença estatística entre os dois processos. A extração com metanol apresentou boa concentração de flavonoides (11,05 ER mg/g), no entanto, inferior aos demais métodos utilizados.

O ácido gálico é o ácido fenólico estão em maior concentração nos extratos das folhas e flores de yacon dentre os compostos pesquisados (1,97 e 1,36 mg/g) A rutina foi o flavonoide encontrado em maior concentração nos extratos das folhas de yacon, sendo a infusão o método de extração que apresentou os valores mais expressivos.

As flores de yacon são uma promissora fonte de flavonoides, em especial a miricetina que esteve presente em concentrações apreciáveis nestes extratos, sendo a extração por infusão a técnica de extração que mais se destacou na remoção destes compostos (16,00 mg/g).

Os processos de extração por infusão e decocção apresentaram maior capacidade antioxidativa, que a observada nos extratos metanólicos. Houve forte correlação entre a concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais com a atividade antioxidante destes extratos.

A extração das lactonas sesquiterpênicas das folhas de yacon revelou, a presença de enidrina e uvedalina em uma proporção de 3:1.

Estas lactonas sesquiterpênicas apresentaram atividade antimicrobiana ao micro-organismo gram-positivo *Staphylococcus aureus*, apresentando concentração inibitória mínima de 750 µg/ml.

Não foi observado potencialização da atividade antimicrobiana das lactonas sesquiterpênicas enidrina e uvedalina nos ensaios conduzidos na presença de luz (4000 LUX).

Desta maneira, os resultados obtidos neste estudo demonstram que, tanto os extratos das folhas quanto das flores de yacon, são promissoras fontes de compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante e que as lactonas sesquiterpênicas, isoladas das folhas de yacon, podem a vir se torna alternativas no desenvolvimento de produtos com capacidade antimicrobiana de interesse a indústria de alimentos.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação dos efeitos toxicológicos dos extratos aquosos obtidos a partir das flores de yacon;

Avaliação da utilização das folhas e flores de yacon como matéria-prima no desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais;

Isolamento e purificação do flavonoide miricetina dos extratos das flores de yacon para o desenvolvimento de produtos de alto valor biológico;

Avaliação da utilização das lactonas enidrina / uvedalina em combinação com antimicrobianos comerciais com intuito de observar efeitos sinérgicos destas substâncias na inibição do crescimento de micro-organismos de interesse a indústria de alimentos.



## REFERÊNCIAS

ACOSTA-ESTRADA, B.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.; SERNA-SALDÍVAR, S. Bound phenolics in food, a review. **Food Chem**, v. 152, p. 46 – 55, 2014.

ADAM, M.; JUKLOVÁ, A.; BAJER, T.; EISNER, K.; VENTURA, K. Comparison of three different solid-phase microextraction fibers analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **J Chromatogr A**. v. 1084, p. 2 – 6, 2005.

AYBAR, J. M.; RIERA, A. N. S.; GRAU, A.; SANCHEZ, S. A. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **J Entomol Sci**, v.74, p. 125-132, 2001.

BARCELONA, C.S.; CABRERA, W. M.; HONORÉ, S. M.; MERCADO, M. I.; SÁNCHEZ, S. S.; GENTA, S. B. Safety assessment of aqueous extracts from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactones, enhydrin. **J Entomol Sci**, v.144, p. 362-370, 2012.

BAYDAR, N. G.; BAYDAR, H. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascene Mill*) extracts. **Ind. Crop. Prod.** 41, 375 – 380, 2013.

BAYER, H.; WALTER, W. **Manual de química orgânica**. Editora Reverté S.A., 19<sup>o</sup> ed., p. 724-726, Barcelona, 1987.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta; Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev. Nutrição**. V. 12, n.2, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CURVELIER M.E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**. 28, 25 – 30, 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **DECRETO 55871**, DE 26 MARÇO DE 1965. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução Nº 360**, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional em alimentos embalados.

CALVINO, M. A new plant *Polymnia endulis* for forrage or alcohol **Industria Sacharifera Italiana**. v.33, p. 95-98, 1940.

CAPELL, T.; CHRISTOU, P. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. **Arch Biochem Biophys**. v. 504, p. 132-141, 2010.

CHEMLER, J. A. **Flavonoids biotransformation in microorganisms: Anthocyanin, Biosynthesis, Functions and Applications**. Springer, N.Y., 2009.

CHIRINOS, R.; PEDRESCHI, R.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y.; CAMPOS, D.; Phenolic compound content and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. **Ind. Crop. Prod.** v. 47, p. 145 – 152, 2013.

CROCHEMORE, M.L.; MOLINARI, H.,B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização agro-morfológica do maracujazeiro (*Passiflora sp.*) **RBF**. v. 25, n1, p. 5-10, 2003.

DAHER, F. *et al.* Seleção de caracteres morfológicos discriminativos em capim-elefante (*Penisetum purpureum SCHUM*). **Rev. Bras. Zool.** V.20, n2, p. 247-254, 1997.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V. SANTARÉM, E. R.; Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento, **Acta Bot. Bras.**, v. 21 n. 2, p. 443 – 445, 2007.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P.L.O. **Quim. Nova**, 22 (5), 1999.

FRCEK J.; MICHZ, J.; PAVLAS, J. SUPICHOVÁ, J. Yacon (*Polymnia sonchifolius* Poepp & Endll.) – A new perspective tuber and forrage crop. **Genet. Zdr. Rastl.** p. 73 – 77.

GENTA, S. B. *et al.* Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food Chem Toxicol.** v.43, p. 1657-1665 – 2005.

GENTA, S. B *et al.* Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*; Constituents of most active fractions. **Chemico-Biological Interactions**. v. 185, p. 143-152, 2010.

GENTA, S. B. *et al.* Safety assessment of aqueous extracts from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. **J. Ethnopharmacol.** v.144, p. 362-370, 2012.

GRAEFE, S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S.; BUERKERT, A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of Yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crop Res**, v.86, 2004.

GRAU, A.; REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: HERMANN, M.; HELLER, J. **Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** Rome: IPK, Gatersleben / IPGRI, p. 199-242, 1997.

HASLAM, E.; **Plant polyphenols.** Cambridge University Press, UK, 1989.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nut. Biochem.** v. p.13, 572 – 584, 2002.

HENRY, B.S.; **Natural food colorants.** Chapman & Hall, UK, 1996.

HERMANN, K.; Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Food Sci Nutr.**, v. 28, p.315-347.

HERTZ, W.; BHAT, V. Isolation and structure of two new germacranolides from *Polymnia uvedalia* (L.) L. **J. Org Chem**, v. 35, p. 2605 - 2611, 1970.

HERTZ, W.; BHAT, V. Maculatin: an isomer of uvedalin epoxide from *Polymnia maculata*. **Phytochemistry**, v.39, p. 1737-1740, 1973.

HOFMANN, D. Medical Herbalism, The practice of herbal medicine. **Healing Art Press**, 2003, p. 69-72.

INOUE, A., TAMOGAMI, S., KATO, Y. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**. v. 30, p. 845 – 848, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ; Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4ª ed. Brasília, Anvisa **2008 (item 018/IV).**

JOUNG H.; KWON, D.Y.; CHOI, J.; SHIN, D.; CHUN S.; YU, Y.; SHIN, D. Antibacterial and synergistic effects of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* under light intensity. **JNM**. v.64, p.212-215, 2010.

KALT W.; MCDONALD J. E.; DONNER, H.; Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. **J Food Sc.** 2000; 65(3):390-393.

KEINÄNEN, M. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. **J Agricultural Food Chem** 1993; 41(11):1986-1990.

LACHMAN, J.; ORSÁK F.M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review. **Plant Soil Environ.** V. 49, n.6, p. 283-290, 2003.

LIM, D-H.; CHOI, D.; CHOI, O.; CHO, K.; KIM, H.C.; CHO, H. Effect of *Astragalus sinicus* L. seed extract on antioxidant activity. **J. Ind. Eng. Chem.** v. 17, p. 510 – 516, 2011.

LIMA, V.,L.,A. et al. Total phenolic and antioxidant activity of the aqueous extracts of mung bean sprout (*Vigna radiata* L.). **Rev. Nutr.** v. 17, n.1, p. 53-57, 2004.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA O. Purification and identification of Antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** V.67, n.10, p. 2154-2159, 2013.

LOTITO, S.B., FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vivo and vitro effects. **Free Radical Biol.** v.36, p. 201 – 211, 2004.

MACHEIX, J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. Fruit Phenolics. **CRC Press**, USA, 1990.

MAGGI, F.; BRAMUCCI, M.; CECCHINI, C.; COMAN, M. M.; CRESCI, A.; CRISTALLI, G.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; QUASSINTI, L.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* all. (*asteraceae*) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. **Fitoterapia**, v. 80, p. 313 - 319, 2009.

MARAIS, P. J.; DEAVOUSRS, B; DIXON, R; FERREIRA, D. **Science of Flavonoids**. Springer, N; Y., 2007.

MARGARETH, M.; NAVES, V. Caroteno e Câncer. **Rev. Nutr.** v. 11, n.11, p. 99 - 115, 1998.

MARIQUE, I.; PÁRRAGA, A.;HERMANN, M. **Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos Andinos: Uma década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Jarabe de yacón: principios y procesamiento**, Lima, Centro Internacional de La Papa, p. 40, 2003.

MARSTON, A; HOSTETTMANN, K. Extraction. In: ANDERSSEN, O.M., MARKHAN, k. **Flavonoids: Chemistry biochemistry and applications**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2006. 1 – 33.

NATIONAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method M27-A7**: Methods for dilution Antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard, West Valley Road, 2006.

NOVÁKOVÁ, L.; VILDOVÁ A.; MATEUS P. J.; GONCALVES, T.; SOLICHA P. Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. **Talanta**, V.82, p. 1271 – 1280, 2010.

OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Método Ce 1F-96.**, Champaign, USA, 1998.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Method 920.104**, Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Method 963.15**, Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Method 968.11**, Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Method 985.29**. Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Method 991.20**. Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. **Método 996.06**. Gaithersburg, MD, USA, 2011.

OJANSIVUA, I.; FERREIRAB, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Food Sci Technol Int.** v. 22, 2011.

OLIVEIRA, M.A.; NISHIMOTO, E.K. Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reserva em HPLC. **Brazilian Journal of food Technology**, v. 7, n. 2, 2004.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. **J Ethnopharmacol.** v. 133, p. 434 - 441, 2011.

OLIVEIRA, R.B. *et al.* Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.23, n.3, p. 497 - 505, 2013.

PADAYACHEE, A. *et al.* Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 2: Phenolic acids. **Food Chem.** v. 135, p. 2287 - 2292, 2012.

PARK, J.S.; HAN, K. The spermatogenic effect of yacon extract and its constituents and their inhibition effect of testosterone metabolism. **Biomol Ther.** v. 21, p. 153 – 160, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Int.** v. 39, n. 7, p. 791 - 800, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J.; Flavonoids: Occurrence and biochemical activity. **Nutr Res**, v. 18, n 12, 1995.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P., 1999. Dietary Flavonoids and Interaction with Physiologic Antioxidants, in: Lester, P., Midori, H., Yoshikawa, T. (ed.), *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. **Academic Press**., Massachusetts, p. 283 - 308.

POLYA, G. M. Biochemical targets of plants bioactive compounds: a pharmacologic reference guide to sites of action and biological effects. **CRS Press**, 2003 p 37 - 39.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med.** v. 26, p. 1231 - 1237, 1999.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**. V.27, N.5, p771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. **Antioxidant food supplements in human health**. Academic Press, California, 1999. p. 239.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWEL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.** v.22, p. 375 – 383, 1995.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** v. 20, p. 933 – 956, 1996.

RICE-EVANS, C.; PACKER, I., Flavonoids in health and disease, 2<sup>a</sup>ed. **Marcel Dekker**, USA, 2003.

ROCKENBACH, *et al.*, Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alim. Nutr.**, v. 19, p. 271-276, 2008.

SANKARA, S.; NAIR, A.G.R. Myricetin-7-glucoside from the androecium of the flowers of *Calophyllum inophyllum*. **Phytochemistry**. v. 10, p. 1679 – 1680, 1971.

SANTANA, I.; CARDOSO, M.H. **Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.3, p.898 - 905, 2008.

SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. A proposal for chemical characterisation and quality evaluation of botanical raw materials using glandular trichome microsampling of yacón (*Polymnia sonchifolia*, Asteraceae), an Andean medicinal plant. **Rev. Bras. Farmacogn.**, V13, p. 01 - 03, 2003.

SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by Reverse-phase High-performance liquid Chromatography. **Phytochem. Anal.**, v.16, p. 161 - 165, 2005.

SIMONETTI, P.; PIETTA, P. G., TESTOLIN, G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected italian wines. **J Agr Food Chem.** v. 45, p. 1153 - 1155, 1997.

SIMONOVSKA, B.; VOVK I.; ANDRENESEK S.; VALENTOVÁ K.; ULRICHOVÁ J. Investigation of phenolic acids in Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **J Chromatogr A.** v.1016, p. 89 – 98, 2003.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. **Food Chem. Toxicol.** v. 49, p. 2689 – 2696, 2011.

TAI Z.; CAI L.; DAI L.; DONG L.; WANG M.; YANG Y.; CAO Q.; DING Z.; Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia*. **Food chemistry.** v. 126. p. 1640 - 1654, 2011.

TEKENAKA, M.; YAN, X.; ONO, H.; YOSHIDA, M.; NAGATA, T.; NAKANISHI, T. Caffeic acid derivatives in roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **J. Agricult. Food Chem.** v. 51, p. 793 – 796, 2003.

TOBIAS, A. V.; ARNOLD, F. H. Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: A model for diversification of natural product pathways. **Biochim. Biophys.** v. 1761, p. 235-246, 2006.

VALENTOVÁ, K.; STEJSKAL, D.; BARTEK, J.; DVORÁKOVÁ, S.; KREN, V.; ULRIKOVÁ, J.; SIMÁNEK, V. Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: In vivo safety assessment. **Food Chem Toxicol.** v..46, p. 1006 - 1013, 2008.

VALENTOVÁ, K.; URICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomed Papers**, v.147 n.2, p. 119 – 130, 2003.

XU, Z.; HOWARD, L. R., Analysis of antioxidant rich photochemical. **Wiley-Blackwell**, USA, 2012.



YILDIZ, F.(ed.), *Advances in Food Biochemistry*. **CRS Press**, USA, 2010

ZARAI, Z., *et al.* Antioxidant and Antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Food Sci Technol**. v.50, p. 634 – 641, 2013.

ZHANG, L.; YANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, R.. In vitro antioxidant properties of different parts of pomegranate flowers. **Food Bioprod. Process** .v. 89, p. 234 – 240, 2011.

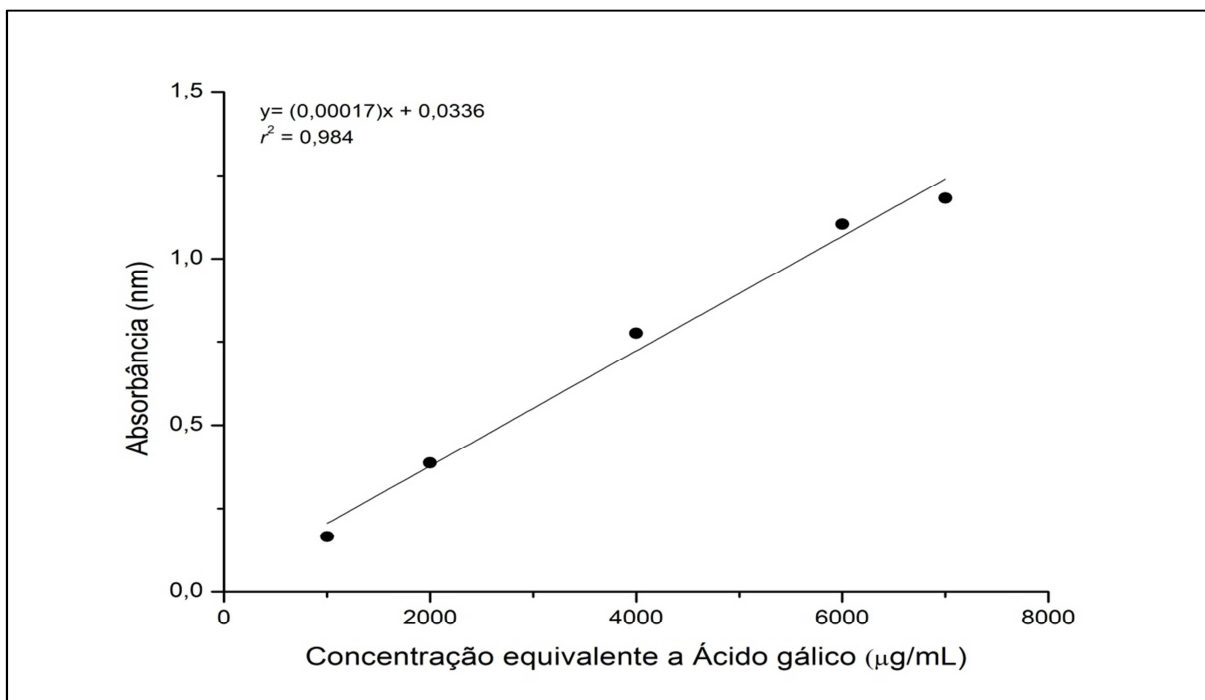
ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxyde radicals. **Food Chem**. v. 64. p. 555 - 559, 1999.

ZIELINSKI, A. A., *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Res Int**. v. 60, p. 246 – 254, 2014.

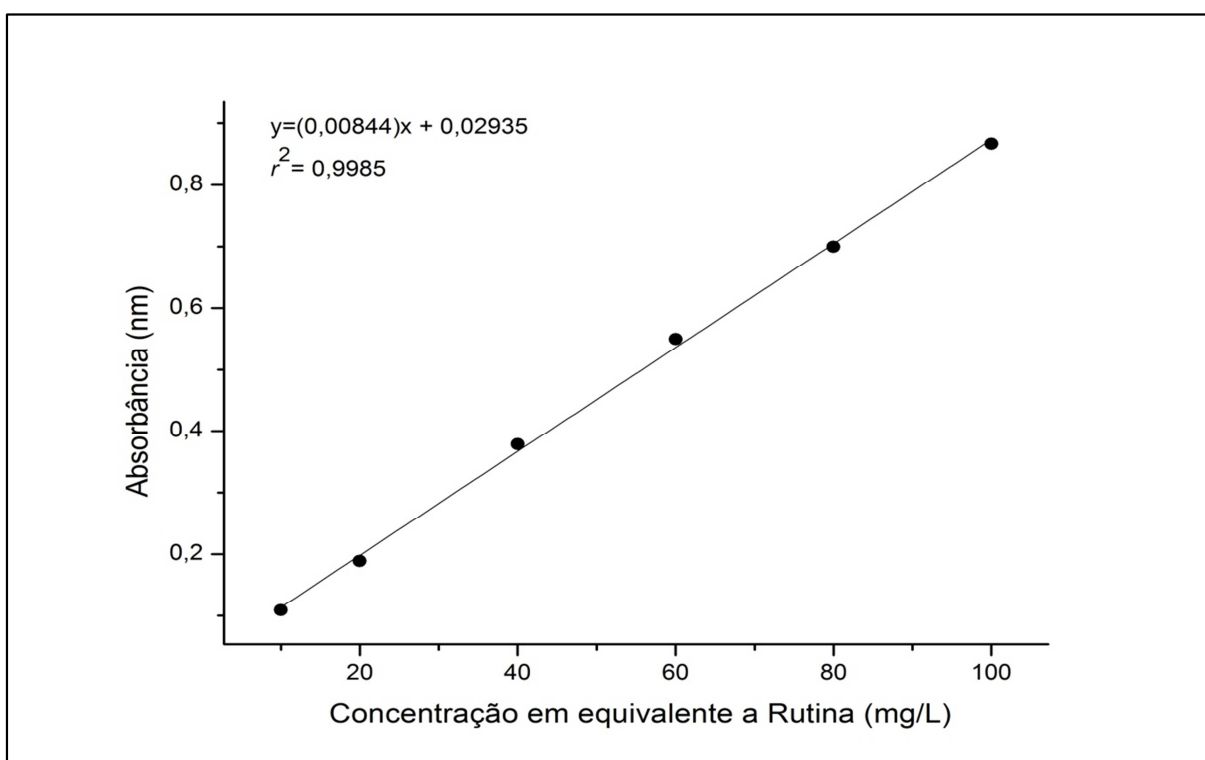
ZULETA, A.; SAMBUCETTI, M. E., Inulin determination for food labeling. **J. Agric. Food Chem**. v. 49, n. 10, p. 4570 – 4572, 2001.

## APÊNDICE

CURVA ANALÍTICA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

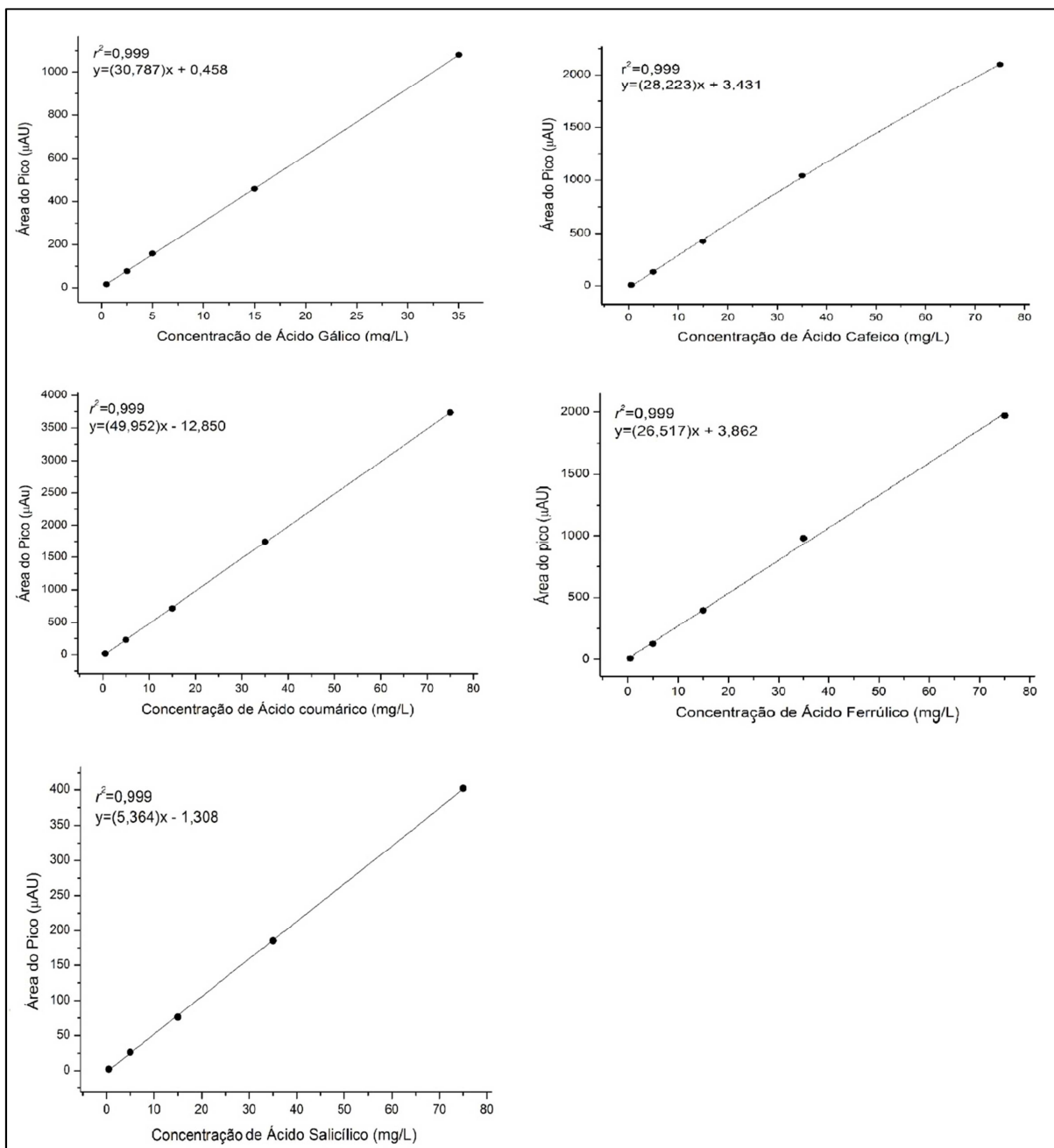


CURVA ANALÍTICA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS



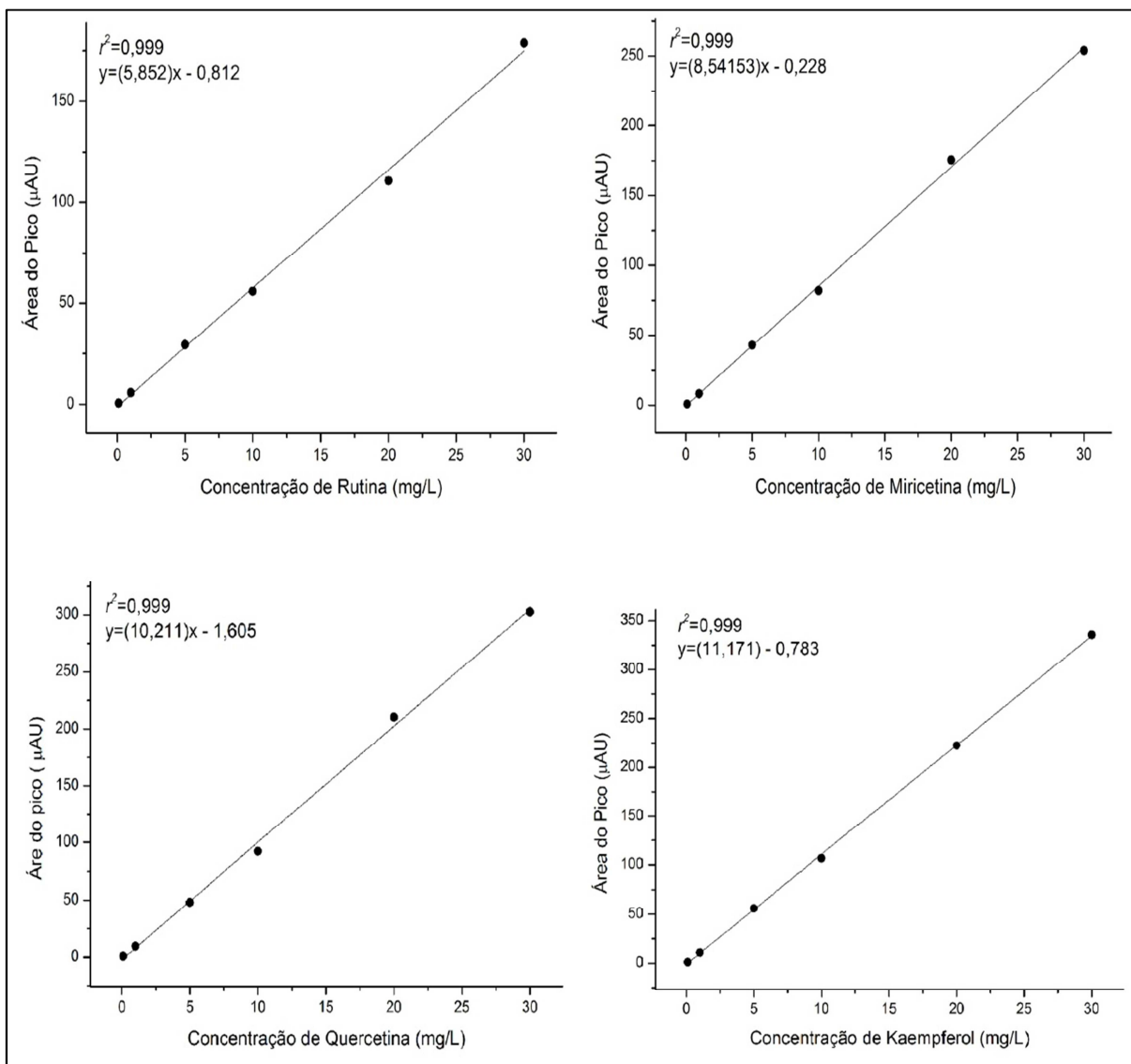
## APÊNDICE

CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS: ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO CAFEICO, ÁCIDO FERRÚLICO, ÁCIDO COUMÁRICO E ÁCIDO SALICÍLICO POR HPLC.



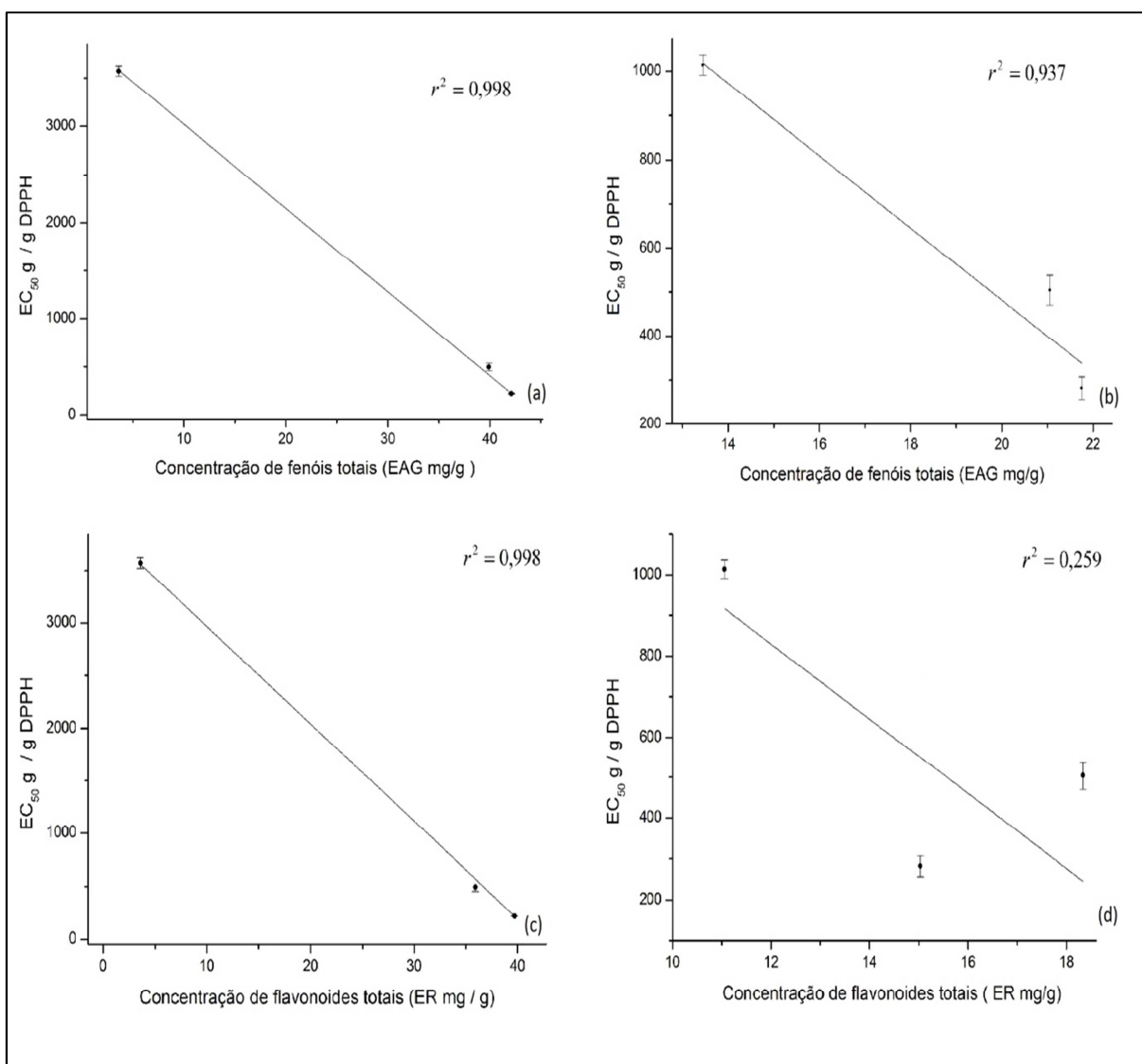
## APÊNDICE

CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS FLAVONOIDES: RUTINA, MIRICETINA, QUERCETINA E KAEMPFEROL POR HPLC.



## APÊNDICE

GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO: (a) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FOLHAS DE YACON, (b) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FLORES DE YACON, (c) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E FLAVONOIDES TOTAIS DE FOLHAS DE YACON, E (d) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH E FLAVONOIDES TOTAIS DE FLORES DE YACON



## APÊNDICE

GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO: (a) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ABTS E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FOLHAS DE YACON, (b) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ABTS E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FLORES DE YACON, (c) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ABTS E FLAVONOIDES TOTAIS DE FOLHAS DE YACON, E (d) CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ABTS E FLAVONOIDES TOTAIS DE FLORES DE YACON.

