



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

**Avaliação das actividades antioxidante e anti-microbiana de extractos
de resíduos florestais**

Ângelo Filipe Santos Luís

Covilhã, 2009

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

**Avaliação das actividades antioxidante e anti-microbiana de extractos
de resíduos florestais**

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica

Ângelo Filipe Santos Luís

Covilhã, 2009

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer às minhas orientadoras: à Professora Fernanda Domingues por ter acreditado em mim desde o princípio e pela sua preocupação com o meu trabalho e à Professora Ana Paula Duarte pela sua disponibilidade, dedicação e pelos seus conselhos.

Um obrigado muito especial a todas as pessoas do Departamento de Ciência e Tecnologia do Papel por me terem recebido de braços abertos, destacando particularmente a Eng.^a Cristina Gil pela sua preciosa ajuda no desenrolar do meu trabalho, por estar sempre disponível com um sorriso e pela amizade que sempre demonstrou. Ao Nuno pela compreensão, companheirismo e incansável apoio.

Uma palavra de agradecimento à Susana pela sua enorme paciência e dedicação.

À Liliana Vieira, pelas suas dicas nos meus primeiros tempos na Faculdade de Ciências da Saúde.

Agradecer também à Professora Cândida Tomaz pelo seu apoio na atribulada transição para Bolonha.

Não podia deixar de referir a minha companheira e amiga desta etapa, a Andreia Oliveira, que nos últimos anos esteve sempre presente.

À minha família, sobretudo à Tia Graça ao Avô e à Avó, pedindo desculpa pelas prolongadas ausências.

Por fim, agradecer aos meus pais, que me proporcionaram todas as condições para que tudo se tornasse realidade e sem os quais nada disto seria possível.

RESUMO

Os polifenóis, particularmente os flavonóides, são amplamente reconhecidos pelos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde, como agentes antioxidantes e anti-cancerígenos. O objectivo deste estudo foi determinar a actividade antioxidante de extractos de alguns arbustos que crescem espontaneamente em Portugal (*Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* e *Erica spp.*) de seguida, correlacioná-la com os compostos fenólicos totais e com os flavonóides. O método de Folin-Ciocalteu foi usado para determinar os fenóis totais e um método colorimétrico usando cloreto de alumínio foi utilizado para a determinação dos flavonóides totais. No que diz respeito à determinação da actividade antioxidante, foram utilizados dois métodos distintos (método do DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico). Posteriormente, foi determinada a actividade anti-microbiana dos extractos brutos e das suas fracções.

Conclui-se que todos os extractos apresentam actividade antioxidante relevante e que existe uma correlação linear positiva entre a actividade antioxidante e os fenóis totais dos extractos.

Os extractos não têm actividade anti-fúngica e os extractos etanólicos têm maior actividade anti-bacteriana do que os aquosos.

A actividade anti-bacteriana exercida pelos extractos é principalmente sobre as bactérias Gram positivas.

Palavras-chave: extractos vegetais; fenóis; flavonóides; actividade antioxidante; actividade anti-bacteriana.

ABSTRACT

Polyphenols and particularly flavonoids are widely appreciated for their potential beneficial health effects, like antioxidant and anticarcinogenic. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of extracts of some shrubs that grow spontaneously in Portugal (*Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica spp.*) and then to correlate it with total phenolic and flavonoids compounds. The Folin-Ciocalteu's method was used to determine total phenols while a colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of total flavonoids. Regarding the determination of antioxidant activity, two distinct methods (DPPH assay and β -carotene bleaching test) were used. Subsequently, it was determined the anti-microbial activity of crude extracts and fractions.

It was concluded that all the extracts presented relevant antioxidant activity and there was a positive linear correlation between antioxidant activity and total phenolic content.

The extracts do not have anti-fungal activity and the ethanolic extracts have greater anti-bacterial activity than the aqueous ones.

The anti-bacterial activity exerted by the extracts is mainly on the Gram positive bacteria.

Keywords: vegetal extracts; phenolics; flavonoids; antioxidant activity; anti-bacterial activity.

ÍNDICE

I. Introdução Geral	23
1. Objectivo do Trabalho.....	24
2. Os Arbustos.....	26
2.1. A Urze.....	27
2.1.1. Características do arbusto.....	27
2.1.2. Utilização na Medicina Popular.....	28
2.1.3. Evidências Experimentais.....	30
2.1.3.1. Actividade anti-inflamatória de diferentes espécies de <i>Erica</i>	30
2.1.3.2. Actividade hipolipidémica do extracto aquoso de flores de <i>Erica multiflora</i>	30
2.2. A Carqueja.....	31
2.2.1. Características do arbusto.....	31
2.2.2. Utilização na Medicina Popular.....	31
2.2.3. Evidências Experimentais.....	32
2.2.3.1. Actividade de protecção do endotélio, dos flavonóides presentes nos extractos de <i>Pterospartum tridentatum</i>	32
2.3. A Giesta.....	32
2.3.1. Características do arbusto.....	32
2.3.2. Utilização na Medicina Popular.....	33
2.3.3. Evidências Experimentais.....	34
2.3.3.1. <i>Cytisus scoparius</i> – Um antioxidante natural.....	34
2.3.3.2. Avaliação das actividades antioxidante e ansiolítica de <i>Cytisus scoparius</i>	35
3. Constituintes activos das plantas.....	37
3.1. Constituintes do metabolismo primário.....	38
3.1.1. Glúcidos.....	39
3.1.2. Lípidos.....	38
3.1.3. Aminoácidos.....	39
3.2. Constituintes do metabolismo secundário obtidos via acetato e via siquimato.....	39
3.2.1. Fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados.....	39
3.2.1.1. Determinação laboratorial dos fenóis totais e polifenóis.....	40
3.2.2. Flavonóides.....	41
3.2.2.1. Determinação laboratorial dos flavonóides totais.....	42

3.2.3. Isoflavonóides.....	44
3.2.4. Taninos	44
3.2.5. Antraquinonas.....	45
3.3. Alcalóides.....	46
4. Actividade Antioxidante.....	48
4.1. Radicais Livres.....	49
4.1.1. Peroxidação Lipídica.....	50
4.1.2. Oxidação de Proteínas.....	50
4.1.3. Oxidação de DNA.....	51
4.2. Antioxidantes.....	51
4.2.1. Sistemas Antioxidantes.....	51
4.3. Relação entre stresse oxidativo e patologias	52
4.4. Métodos de determinação laboratorial da actividade antioxidante.....	53
4.4.1. Determinação da actividade antioxidante pelo método do DPPH	54
4.4.2. Determinação da actividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico	55
4.5. Relação entre compostos fenólicos, flavonóides e actividade antioxidante	56
5. Actividade Anti-Microbiana.....	59
5.1. Microrganismos procariotas	61
5.1.1. Bactérias Gram positivas	62
5.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	62
5.1.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	63
5.1.1.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	63
5.1.2. Bactérias Gram negativas	63
5.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	63
5.1.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
5.1.2.3. <i>Salmonella typhimurium</i>	64
5.1.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
5.2. Microrganismos eucariotas.....	65
5.2.1. Leveduras.....	65
5.2.1.1. <i>Candida albicans</i>	66
5.2.1.2. <i>Candida tropicalis</i>	67
5.3. Métodos de determinação laboratorial da actividade anti-microbiana.....	67
5.3.1. Teste da difusão em disco.....	67
5.3.2. Métodos de determinação da Concentração Mínima Inibitória	68
5.3.2.1. Microdiluição.....	68

5.3.2.2. Diluição em agar	69
II. Material e Métodos	70
1. Moagem	71
2. Determinação do teor de matéria seca	71
3. Extracção	72
3.1. Preparação dos extractos etanólicos	72
3.2. Preparação dos extractos aquosos	73
4. Diluição dos extractos em metanol	75
5. Determinação dos fenóis totais	76
6. Determinação dos flavonóides totais	77
7. Determinação da actividade antioxidante	78
7.1. Método do DPPH – Versão 1	78
7.2. Método do DPPH – Versão 2	80
7.3. Sistema β -caroteno/ácido linoleico	82
8. Fraccionamento cromatográfico em coluna dos extractos	83
9. Determinação da actividade anti-microbiana	85
9.1. Difusão em disco - Bactérias	85
9.2. Difusão em disco - Leveduras	87
9.3. Diluição em agar - Bactérias	87
III. Resultados e Discussão	89
1. Rendimentos das Extracções	90
2. Fenóis totais	91
3. Flavonóides totais	93
4. Actividade antioxidante	95
4.1. Método do DPPH – Versão 1	96
4.2. Método do DPPH – Versão 2	103
4.3. Relação entre fenóis totais, flavonóides e actividade antioxidante	110
4.3.1. Extractos etanólicos	110
4.3.2. Extractos aquosos	112
4.4. Sistema β -caroteno/ácido linoleico	113
4.4.1. Extractos de urze	114
4.4.2. Extractos de carqueja	115
4.4.3. Extractos de giesta	116
4.4.4. Extractos etanólicos	117
4.4.5. Extractos aquosos	117
5. Actividade anti-microbiana	118

5.1. Difusão em disco	119
5.2. Diluição em agar.....	122
IV. Conclusões Gerais	127
V. Referências	132
Anexos.....	141
1. Determinação da actividade antioxidante	142
1.1. Método do DPPH – Versão 1	142
1.1.1. Extracto aquoso de urze.....	142
1.1.2. Extracto etanólico de carqueja.....	145
1.1.3. Extracto aquoso de carqueja.....	148
1.1.4. Extracto etanólico de giesta	151
1.1.5. Extracto aquoso de giesta	154
1.1.6. Rutina.....	157
1.1.7. Trolox	160
1.1.8. Ácido Gálico.....	163
1.2. Método do DPPH – Versão 2	165
1.2.1. Extracto aquoso de urze.....	165
1.2.2. Extracto etanólico de carqueja.....	168
1.2.3. Extracto aquoso de carqueja.....	170
1.2.4. Extracto etanólico de giesta	173
1.2.5. Extracto aquoso de giesta	175
1.2.6. Rutina.....	178
1.2.7. Trolox	180
1.2.8. Ácido Gálico.....	182
1.2.9. Quercetina.....	185

