

# I. Introdução Geral

## 1. OBJECTIVO DO TRABALHO

## 1. OBJECTIVO DO TRABALHO

---

A floresta, em Portugal, representa aproximadamente 38 % do território, o que pode traduzir-se pela produção de elevadas quantidades de resíduos florestais que são normalmente constituídos por diferentes espécies de arbustos e ramos de árvores.

No sentido de valorizar esta biomassa pretende-se, com este trabalho, determinar as eventuais actividades, antioxidante, anti-bacteriana e anti-fúngica dos extractos brutos (etanólicos e aquosos) de urze, carqueja e giesta. O estudo será completado com a caracterização dos extractos, em termos de compostos fenólicos totais e flavonóides. Posteriormente, os extractos serão fraccionados por cromatografia em coluna e a actividade anti-microbiana das fracções será também estudada.

Neste trabalho, são usados métodos colorimétricos para flavonóides (usando o cloreto de alumínio) e fenóis totais (usando o reagente de Folin-Ciocalteu); métodos do DPPH e do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico para capacidade antioxidante; e actividade anti-microbiana pelo teste de difusão em disco e posterior determinação da concentração mínima inibitória.

## 2. OS ARBUSTOS

## 2. OS ARBUSTOS

---

A floresta é parte integrante do ecossistema global, constituindo um elemento fundamental para o seu equilíbrio. A floresta é formada por árvores, arbustos, ervas e um grande número de outros seres (plantas e animais). Logo a seguir aos desertos, a floresta ocupa a maior parte da superfície da terra emersa, isto é, cerca de 30 % dessa superfície. Encontra-se, no entanto, distribuída de forma irregular, devido à diversidade climática e às características dos terrenos. A floresta é um recurso renovável, e por isso, contribui não só para o equilíbrio ecológico da Terra, como tem sido, através dos tempos, um meio fundamental para a sobrevivência do Homem: renova o ar, produzindo oxigénio e consumindo dióxido de carbono; regulariza o clima, através da produção de vapor de água; protege os solos, evitando a erosão; favorece a infiltração e conservação de água no solo; impede o avanço da areia e dos ventos marítimos; constitui uma fonte de alimentação para muitos seres vivos; é para o Homem, fonte de energia e de matérias-primas [1].

A floresta portuguesa é um ecossistema muito antigo, inicialmente com árvores de folha caduca no norte do país e árvores de folha perene a sul. Actualmente, a área florestal portuguesa ascende aos 3,3 milhões de hectares. Em Portugal, a floresta, representa cerca de 38 % do território, o que pode traduzir-se pela produção de elevadas quantidades de resíduos florestais. Estes são constituídos por diferentes espécies de arbustos e ramos de árvores [2].

Não existe uma definição exacta, contudo, considera-se arbusto, todo o vegetal do grupo das angiospérmicas dicotiledóneas lenhosas, que se ramifica desde o solo e que tem menor porte do que as árvores [3].

### 2.1. A Urze

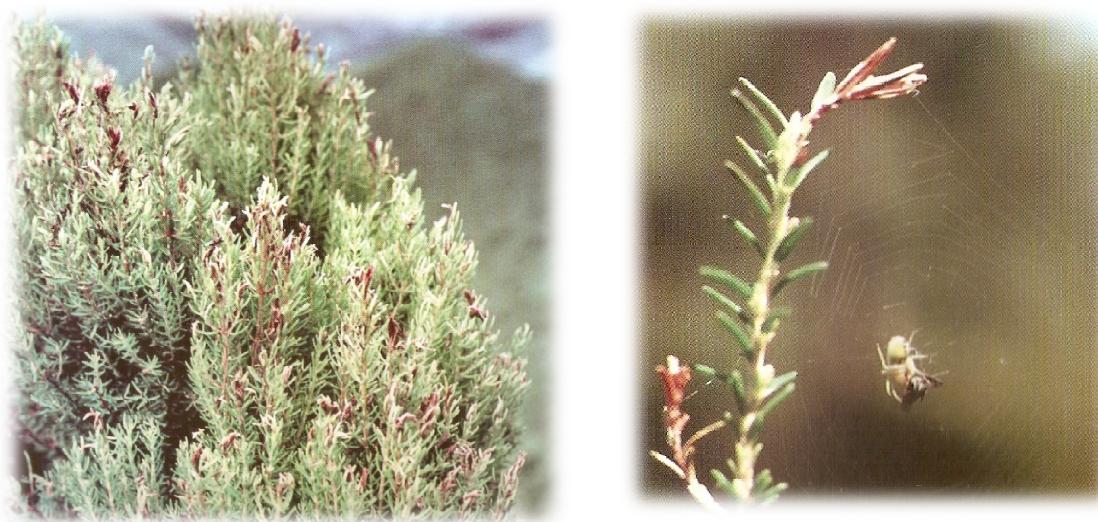
#### 2.1.1. Características do arbusto

A urze (*Erica spp.*), é o nome comum de diversas plantas da família *Ericaceae*, espontâneas em terrenos pobres em calcário e com flores de cores diversas (branco, rosa-púrpura, vermelho, esverdeado, etc.) que cobre os solos de terrenos incultos por toda a parte. É um arbusto rasteiro, que também se pode apresentar sob a forma de

pequenas árvores nas regiões montanhosas onde a água é abundante. Os membros da família *Ericaceae* são arbustos de folha perene, e a sua floração ocorre entre Fevereiro e Maio [3].

Entre as várias espécies de urze, destacam-se aquelas que são mais frequentes nas serras e florestas portuguesas, nomeadamente, *Erica scoparia azorica* (espécie endémica dos Açores), *Erica scoparia* ou Urze-das-vassouras (frequente no noroeste ocidental e no centro de Portugal), entre outras (Figura 1) [3].

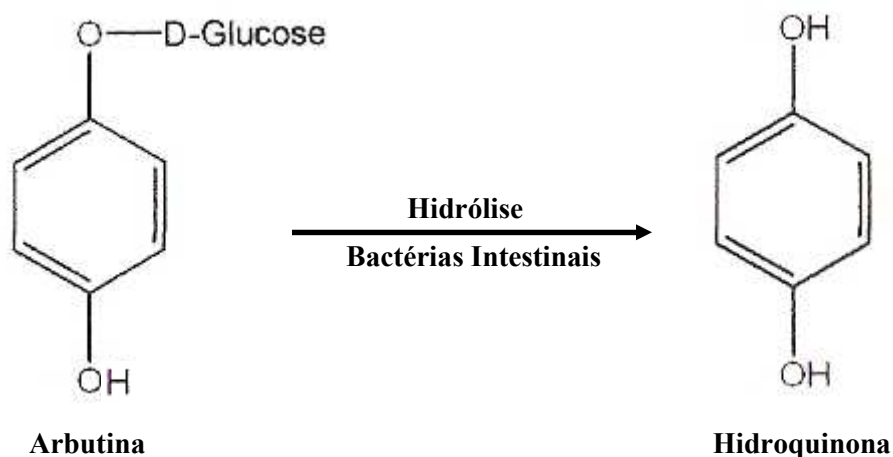
**Figura 1:** *Erica scoparia azorica* (à esquerda), *Erica scoparia* (à direita) [3].



### 2.1.2. Utilização na Medicina Popular

A urze é tradicionalmente usada como anti-inflamatório das vias urinárias. A sua principal acção é combater cistites, inflamações da próstata e as restantes infecções urinárias. É diurética, o que permite aumentar o volume de urina, indispensável para eliminar as toxinas e infecções existentes nas vias urinárias; também actua nas diarreias [4].

Os princípios activos encontrados na urze, principalmente na flor, são os flavonóides (de acção diurética) e os taninos (que servem para acalmar a inflamação dolorosa da parede da bexiga e todas as infecções urinárias). Todas as partes da planta contêm arbutina ou arbutósido (um glucósido da hidroquinona –  $\beta$ -D-glucopiranósido da hidroquinona) que as bactérias intestinais transformam em hidroquinona, anti-séptico urinário (Figura 2) [4,5].



**Figura 2:** Estruturas químicas da Arbutina e Hidroquinona [6].

Sabe-se que as espécies pertencentes à família *Ericaceae*, são fontes ricas de fenóis, nomeadamente, flavonóides, antocianinas, proantocianidinas (designação alternativa à de taninos condensados pelo facto destes compostos originarem antocianidinas após tratamento, a quente, com um ácido mineral). Compostos que estão identificados como antioxidantes, com potencial para prevenir os danos oxidativos causados pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS) [7]. As antocianinas diminuem a permeabilidade capilar, particularmente dos capilares venosos, aumentando a sua resistência, daí a sua acção antiedematosa [6].

Preparações de ervas, utilizando as partes aéreas de *Erica arborea* e *Erica manipuliflora* são popularmente utilizadas como diuréticos, adstringentes, e no tratamento de infecções urinárias. Particularmente, um copo de infusão ou decocção das folhas de *Erica arborea* tem sido recomendado para a redução do edema corporal [8].

Uma receita antiga, descoberta num livro de Dioscorides (autor do primeiro grande Tratado sobre plantas e medicina), descreve que um cataplasma preparado com folhas de várias espécies de *Erica* “*faria cicatrizar as mordeduras de serpentes*” [8].

Existem comercialmente à venda, cápsulas de urze para o tratamento de problemas urinários [5].

### **2.1.3. Evidências Experimentais**

#### **2.1.3.1. Actividade anti-inflamatória de diferentes espécies de *Erica***

Um estudo desenvolvido por Akool e colaboradores [8] avaliou a actividade anti-inflamatória de extractos de *Erica arborea*, *Erica bacquetii*, *Erica manipulifera* e *Erica sicula* em ratos aos quais tinham sido induzidos diferentes estados de inflamação e edema. Foi possível concluir que estes extractos apresentam uma actividade anti-inflamatória significativa, o que se pode dever ao facto de possuírem flavonóides, entre outros, que sequestram os radicais de oxigénio e que podem por isso interferir na produção dos metabolitos do ácido araquidónico através da inibição da enzima lipoxigenase e pela redução da concentração de leucotrienos [8].

#### **2.1.3.2. Actividade hipolipidémica do extracto aquoso de flores de *Erica multiflora***

As doenças cardiovasculares são a causa de morte mais comum nos países industrializados. Sabe-se que a hiperlipidémia representa o maior factor de risco para o desenvolvimento prematuro de aterosclerose e de complicações cardiovasculares. Assim sendo, uma estratégia lógica para prevenir e tratar a aterosclerose e reduzir a incidência de doenças cardiovasculares é resolver o problema da hiperlipidémia pela dieta e/ou utilizando drogas hipolipemiantes [9].

Em Marrocos, assim como em outros países, a maioria dos doentes hiperlipidémicos, utiliza plantas medicinais para tratar a hiperlipidémia e a aterosclerose. Existe um grande interesse em descobrir substâncias hipolipemiantes naturais que derivam das plantas medicinais normalmente utilizadas, nomeadamente a *Erica multiflora*. Esta planta, tem sido largamente utilizada no leste de Marrocos por indivíduos hiperlipidémicos como uma alternativa à terapêutica convencional e o estudo fitoquímico, permitiu descobrir que os maiores constituintes das flores são os taninos, as proantocianidinas e os flavonóides [9].

O estudo desenvolvido por Arfani e colaboradores [9], permitiu concluir que a administração intra-gástrica de extracto aquoso de *Erica multiflora* em ratos aos quais tinha sido induzida hiperlipidémia, provoca uma diminuição significativa dos níveis plasmáticos de lípidos. Após 7 horas de tratamento, o colesterol plasmático total, os

triglicéridos e o colesterol-LDL, sofreram uma redução de 47 %, 95 % e 67 %, respectivamente, no entanto, o colesterol-HDL não sofreu alteração. Estas observações indicam que o extracto aquoso desta erva contém produtos que diminuem as concentrações plasmáticas de lípidos e que podem ter efeitos benéficos no tratamento da hiperlipidémia [9].

## **2.2. A Carqueja**

### **2.2.1. Características do arbusto**

A carqueja, também conhecida por carqueija ou por carqueijeira, pertence à família *Leguminosae* e à subfamília *Papilionaceae*, e tem como nome científico *Pterospartum tridentatum*. É um arbusto de folha perene, com flor em fascículo de cor amarela e cuja época de floração vai de Março a Maio. É um arbusto inerme, erecto ou prostrado, muito ramoso, em que os ramos novos se posicionam distintamente alados e comprimidos. Uma das características mais evidentes deste arbusto é o facto de as suas folhas parecerem umas asas onduladas, formando três dentes ou três lobos em cada nó. A carqueja cresce espontaneamente e encontra-se facilmente em solos ácidos em todo o oeste da Península Ibérica, particularmente em Portugal (Figura 3) [3].



**Figura 3:** *Pterospartum tridentatum* [4].

### **2.2.2. Utilização na Medicina Popular**

A carqueja, é uma planta que possui acção digestiva, diurética e acção estimulante do fígado. Está indicada como auxiliar no tratamento de diversas doenças gástricas, intestinais e das vias urinárias. Emprega-se também em forma de infusões para o tratamento da anemia, cálculos biliares, diarreia, má circulação de sangue,

icterícia, diabetes e parasitas intestinais. Devido ao efeito diurético e depurativo, está indicada na gota e no reumatismo [4,10].

É utilizada toda a planta, na forma de decocção. Existem também cápsulas nas ervanárias e estabelecimentos dietéticos. Para o emagrecimento e anemia existem cápsulas de carqueja e algas marinhas. Em cataplasma usa-se no tratamento de feridas. Sob a forma de infusão, pode ainda ser utilizada no tratamento de gripes, bronquites e pneumonias. As flores podem ser usadas no tratamento de irritações da garganta e em misturas de ervas para o tratamento de diabetes [4,10].

### **2.2.3. Evidências Experimentais**

#### **2.2.3.1. Actividade de protecção do endotélio, dos flavonóides presentes nos extractos de *Pterospartum tridentatum***

O trabalho desenvolvido por Vitor e colaboradores [10] teve como objectivo avaliar a capacidade dos extractos aquosos tradicionalmente preparados, de protecção do endotélio contra os danos oxidativos produzidos por ROS em doentes diabéticos tipo II, uma vez que o stresse oxidativo parece ter um papel preponderante no desenvolvimento de complicações vasculares associadas aos diabéticos tipo II. Este estudo permitiu concluir que o extracto aquoso da carqueja protege uma cultura de células endoteliais humanas dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogénio; e que a isoquercetina é um dos compostos responsáveis pela actividade antioxidante do extracto [10].

Pode então dizer-se que o extracto aquoso desta erva pode prevenir ou reduzir o desenvolvimento de complicações vasculares nos diabéticos [10].

### **2.3. A Giesta**

#### **2.3.1. Características do arbusto**

A giesta, também designada por giesteira-das-vassouras (porque se utilizam os caules deste arbusto no fabrico de vassouras), é um arbusto de folha caduca, que pertence à família *Leguminosae* e à subfamília *Papilionaceae* e que tem como designação científica *Cytisus scoparius*. É um arbusto que pode atingir os dois metros de altura e que possui ramos angulosos, erectos ou ascendentes e delgados. As folhas

são usualmente 3-folioladas. As flores são abundantes e de cor amarelo-claro, que formam cachos axilares de corola amarela (Figura 4). As suas folhas são diminutas e o fruto é uma vagem. Este arbusto encontra-se principalmente em solos arenosos ou com rocha abundante e em locais soalheiros e quentes, nos quais se adapta facilmente, devido à presença de bactérias nitrificantes. É muito frequente no oeste Europeu, comum em Portugal nas bermas de caminhos, nas zonas de Sintra, na Serra de Monchique e nos Açores [3,4,11].



**Figura 4:** *Cytisus scoparius* [3,4].

### **2.3.2. Utilização na Medicina Popular**

As flores (em botão) contêm flavonóides (escoparina) com propriedades diuréticas, sendo indicadas para tratar cálculos renais, a gota, nefrose, nefrite, doentes com insuficiência cardíaca e constipações. Os ramos jovens são ricos em esparteína, um alcalóide que faz aumentar a força contráctil do coração, e aminas estimulantes do sistema nervoso vegetativo, que são a tiramina e a dopamina, de efeito vasoconstritor e hipertensor semelhante ao da *Digitalis (Digitalis lanata)* [4].

As propriedades vasoconstritoras da giesta devem-se, principalmente, à tiramina e à oxitiramina. Admite-se a fenilalanina, um aminoácido fundamental, como o precursor destes compostos azotados. Formam-se à custa de reacções enzimáticas sucessivas: uma oxidase transforma a fenilalanina em tirosina, depois uma descarboxilase origina a tiramina e, por fim, uma tiramina-oxidase determina o aparecimento da oxitiramina [11]. Esta planta é ainda utilizada devido aos seus efeitos

hipnóticos e sedativos, e no tratamento de diabetes e doenças hepáticas. Estudos farmacológicos confirmaram o seu efeito de estimulação uterina e a sua actividade espasmódica. Também é referida a sua actividade hipotensiva e o seu efeito estrogénico [12].

A giesta contém flavonas, como a 6''-*O*-acetil-escoparina, flavonóides, nomeadamente: rutina, quercetina, quercitrina, isoharmetina e campferol; e ainda algumas isoflavonas como a genisteína e o sarotamnósido. A maioria das actividades biológicas relacionadas com esta planta devem-se à presença destes inúmeros constituintes activos de natureza antioxidante [12].

### **2.3.3. Evidências Experimentais**

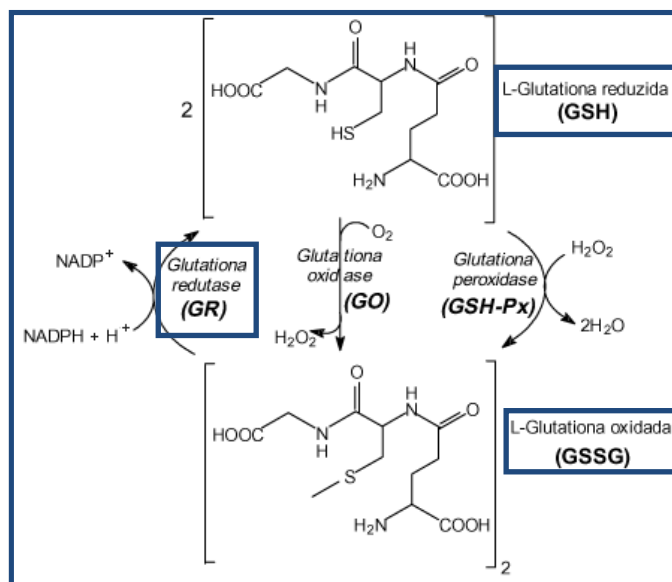
#### **2.3.3.1. *Cytisus scoparius* – Um antioxidante natural**

Os compostos fenólicos presentes nos extractos das partes aéreas da giesta contribuem directamente para a sua acção antioxidante e são os responsáveis pela sua acção biológica benéfica. Esta actividade antioxidante pode ser importante na prevenção ou abrandamento do progresso de várias doenças relacionadas com o stresse oxidativo [12].

Foi provado que a administração de extracto de giesta promove a conversão da glutathiona oxidada (GSSH) em glutathiona reduzida (GSH) pela reactivação da glutathiona redutase hepática (Figura 5), em ratos com danos hepáticos significativos e apresentando stresse oxidativo. Foi também verificada uma redução nos níveis das transaminases glutâmicas oxaloacética e pirúvica séricas e da desidrogenase do lactato, após a administração de extracto de giesta, o que indica uma estabilização das membranas plasmáticas, assim como uma reparação dos danos nos tecidos, causados pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Por outro lado, as actividades da superóxido dismutase e da catalase, ficaram próximo do normal, após a administração do extracto de giesta aos ratos pré-tratados com CCl<sub>4</sub>, o que indica a acção antioxidante do extracto contra os radicais livres de oxigénio [13].

Concluí-se que o extracto de giesta tem um efeito significativo nos danos hepáticos, assim como no stresse oxidativo, resultando numa redução da peroxidação lipídica e numa melhoria dos parâmetros bioquímicos do soro (transaminases

glutâmicas oxaloacética e pirúvica, desidrogenase do lactato) assim como num aumento dos valores de superóxido dismutase e de catalase, que se encontravam diminuídos nos ratos tratados com  $\text{CCl}_4$  [13].



**Figura 5:** Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSH), pela acção de várias enzimas [14].

### 2.3.3.2. Avaliação das actividades antioxidante e ansiolítica de *Cytisus scoparius*

Foi desenvolvido um estudo para determinar as eventuais actividades antioxidante e ansiolítica de extracto de giesta, administrando-se a ratos que tinham sido sujeitos a condições de stresse crónico, esse mesmo extracto. Foi possível observar, que a administração deste extracto durante os períodos em que os ratos se encontravam em stresse, proporcionava alterações metabólicas, indicando alguma influência nos sistemas neurológico e endócrino. Conclui-se também, que este extracto possui actividade ansiolítica mas não apresenta propriedades anti-depressivas [15].

Por outro lado, este estudo verificou que a administração de extracto de giesta diminui os valores da superóxido dismutase e da catalase, que se encontravam alteradas devido às condições de stresse a que os ratos foram sujeitos e que leva a uma diminuição do conteúdo das substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico – medida

indirecta da peroxidação lipídica – em vários tecidos, o que permite uma atenuação dos efeitos adversos resultantes do stresse crónico e que leva à formação de ROS [15].

O conteúdo fenólico da giesta pode contribuir para o efeito antioxidante observado e princípios activos como a flavona 6''-*O*-acetil-escoparina, contribuem para as propriedades antioxidantes deste arbusto [15].

### 3. CONSTITUINTES ACTIVOS DAS PLANTAS

### **3. CONSTITUENTES ACTIVOS DAS PLANTAS**

---

As plantas, como todos os organismos vivos, possuem numerosos constituintes de natureza química bem definida, uns, normalmente presentes em todas as plantas, outros, sobretudo os do metabolismo secundário, muitas vezes em pequenas quantidades, podem pela sua presença particular, caracterizar uma dada espécie ou género. Uma planta adquire o estatuto de “medicinal” quando possui constituintes farmacologicamente activos que conferem a essa planta a possibilidade de ser usada directa ou indirectamente na terapêutica com benefícios para o tratamento ou prevenção de uma dada patologia. Para além do ou dos constituintes activos, existem nas plantas “medicinais” outros compostos que podem influenciar a acção destes. Estes compostos em muitos casos protegem os constituintes activos de alterações, nomeadamente oxidações, hidrólises, isomerizações, etc., ao inibirem sistemas enzimáticos, ou podem até permitir uma melhor absorção pelo organismo, ao facilitarem a passagem através das membranas. Isto explica o facto de a acção da planta ou de um extracto dessa tenha muitas vezes maior actividade do que a mesma quantidade de um dado constituinte activo isolado [6,16].

#### **3.1. Constituintes do metabolismo primário**

##### **3.1.1. Glúcidos**

Fazem parte dos glúcidos as oses (monossacáridos), os di-holósidos (dissacáridos), os oligo-holósidos (moléculas com 3 a 10 oses), poli-holósidos homogéneos (sacáridos com mais de 10 oses, dando por hidrólise a mesma ose) e os poli-holósidos heterogéneos (por hidrólise dão duas ou mais oses diferentes, podendo estar associados a ácidos urónicos, também denominados poliurónidos). Deste grupo de compostos fazem parte as gomas clássicas, mais usadas em tecnologia farmacêutica, as mucilagens e as substâncias pépticas, estas já com interesse na terapêutica [6,16].

##### **3.1.2. Lípidos**

Na base dos lípidos está a existência de ácidos gordos (ácidos carboxílicos de cadeia linear ou ramificada com quatro ou mais átomos de carbono geralmente em

número par, podendo ser saturados ou insaturados com 1, 2, 3 ou mais ligações duplas) que se podem encontrar livres ou esterificando um álcool ou poliol, caso do glicerol. Consideram-se provenientes do metabolismo primário, embora na formação dos ácidos gordos haja condensação de moléculas de acetil-coenzima A [6,16].

### **3.1.3. Aminoácidos**

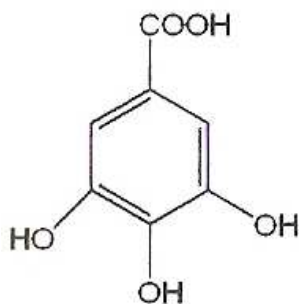
Os aminoácidos, são moléculas que contêm um grupo amina e um grupo carboxílico. Conhecem-se mais de 300 aminoácidos vegetais, embora só cerca de 20 entrem na constituição das proteínas, polímeros compostos de dezenas a centenas de aminoácidos [6,16].

## **3.2. Constituintes do metabolismo secundário obtidos via acetato e via siquimato**

### **3.2.1. Fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados**

Os fenóis simples são bastante raros nas plantas, com excepção dos derivados da hidroquinona que existem em várias famílias (nomeadamente na família *Ericaceae*), geralmente sob a forma de glucósido de um difenol (arbutina ou arbutósido) ou do seu monometiléter (metilarbutina). Estes compostos estão presentes nas folhas da urze [4,5] e da uva-ursina [4-6,16], os quais por hidrólise originam hidroquinona, de actividade anti-séptica, justificativa do seu emprego em infecções urinárias [4-6,16].

São relativamente abundantes no reino vegetal os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, em especial os compostos hidroxilados, alguns deles ligados a oses. Um ácido fenólico derivado do ácido salicílico, muito vulgar, é o ácido gálico (Figura 6), um dos constituintes dos taninos que tem propriedades adstringentes, por isso, usado por via externa em queimaduras e dermatoses, para além de hemostático. Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, geralmente sob a forma de heterósidos fenilpropanóicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), mais difundidos na natureza, são o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sináptico e outros ácidos que sob a forma de ésteres, vão ser encontrados em diversas plantas “medicinais” [6,16].



**Figura 6:** Estrutura química do Ácido Gálico [6].

Tradicionalmente, as plantas contendo estes compostos, são empregues como coleréticas e hipocolesteromiantes. Mais recentemente, estes compostos têm sido estudados em relação à actividade antioxidante. Nos últimos anos tem-se verificado que muitos ésteres heterosídicos de fenilpropanóicos são inibidores enzimáticos, particularmente da fosfodiesterase do AMP cíclico e da aldo-redutase, originando uma certa inibição sobre a formação de hidroperóxidos e leucotrienos, o que justifica a acção benéfica de certos fármacos no caso das doenças inflamatórias [6,16].

#### **3.2.1.1. Determinação laboratorial dos fenóis totais e polifenóis**

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos é realizada através de diversas técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. Este reagente consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico (designados em conjunto por ácido fosfomolibdico-túngstico) [17,18], no qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação +6 (com a cor amarela), porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, e em meio alcalino, formam-se os chamados molibdénio azul e tungsténio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a medição colorimétrica e a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam necessariamente de possuir natureza fenólica [19,20]. Estes pigmentos azuis têm uma absorção máxima que depende da qualidade e/ou composição quantitativa das misturas de fenóis e do pH das soluções, usualmente obtido adicionando carbonato de sódio [20].

Apesar do método do reagente de Folin-Ciocalteu ser amplamente utilizado na determinação dos fenóis totais em diferentes tipos de amostras, apresenta algumas

limitações, visto que mede a capacidade redutora total de uma amostra. Esta determinação correlaciona-se com a capacidade redutora e antioxidante dos compostos fenólicos. A dissociação do próton dos fenóis leva à formação do anião fenolato, que é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu. Assim sendo, este método não é específico para compostos fenólicos. Muitos compostos não-fenólicos, presentes em frutas e plantas, principalmente o ácido ascórbico e os sacáridos, podem reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu [17,19,20].

### 3.2.2. Flavonóides

Neste grupo de constituintes poder-se-ão referir os compostos com uma origem biogénica comum e com o mesmo elemento estrutural de base, o 2-fenilcromano, isto é, um dos pigmentos dos vegetais mais vulgares, os flavonóides amarelos (chalconas, auronas e flavonóis amarelos) e as antocianinas vermelhas, azuis ou violetas. Cerca de 80 % dos flavonóides incluem as flavonas, os flavonóis e as flavononas encontrando-se normalmente sob uma forma osídica. São exemplos de flavonas a apigenina e a luteolina; dos flavonóis, o campferol e a quercetina; e das flavononas, a naringerina [6,16].

De um modo geral, os flavonóides são compostos capazes de diminuir a permeabilidade capilar e reforçar a sua resistência, com marcada acção anti-inflamatória e actividade antioxidante relacionada com a inibição de vários sistemas enzimáticos (hialuronidase, catecol-*O*-metiltransferase, fosfodiesterase do AMP cíclico, aldose reductase), facto comprovado *in vitro* [6,16].

Um aspecto toxicológico a destacar diz respeito à acção mutagénica que os flavonóides livres manifestam, mas não os glucósidos, sendo referido que a quercetina é provavelmente o flavonóide de maiores propriedades mutagénicas, embora a existência de grupos “metoxi” origine uma marcada redução dessas propriedades. No sentido de se poderem conhecer os possíveis efeitos carcinogénicos da quercetina, os ensaios realizados têm sido controversos: ensaios em ratos foram positivos; outros ensaios, que incluíram ratinhos e hamsters, foram negativos [6,16].

Os antocianósidos, os heterósidos das antocianinas, coram habitualmente as flores e frutos. Em meio ácido, estão sob a forma catiónica, possuindo sempre um

hidroxilo em C<sub>3</sub> para além de outros hidroxilos que podem estar livres, eterificados com metanol ou ligados a uma ose, com um hidroxilo em C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub> ou C<sub>4</sub>, livre, o que permite a formação de estruturas quinónicas coradas. Os antocianósidos diminuem a permeabilidade capilar, particularmente dos capilares venosos, aumentando a sua resistência. Daí a sua acção antiedematosa e o aumento da regeneração da púrpura retiniana [6,11].

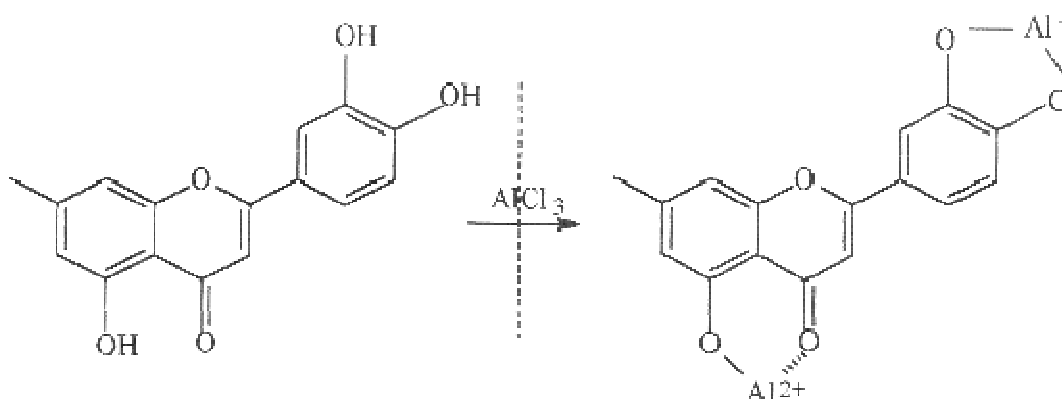
Os flavonóides absorvem radiação electromagnética na faixa do ultravioleta e do visível e desta maneira desempenham um papel fundamental de defesa das plantas das radiações ultravioletas da luz solar. Estes compostos desempenham também um papel importante na saúde humana. Como estão presentes em todas as plantas, acabam por fazer parte da dieta do Homem. Os flavonóides têm acção antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres [21].

#### **3.2.2.1. Determinação laboratorial dos flavonóides totais**

A dosagem dos flavonóides é difícil de efectuar devido ao diferente comportamento dos heterósidos e dos constituintes aglicónicos; além disso não existe um método eficaz na eliminação de outras substâncias de natureza química diferente, que em geral acompanham os flavonóides, e que podem interferir nos métodos de dosagem. Não se conhecem técnicas capazes de dosear em conjunto os diversos flavonóides contidos na mesma planta; muitas vezes adaptam-se a grupos mais ou menos amplos de constituintes que revelam igual comportamento. Os métodos físico-químicos utilizados são colorimétricos, fluorimétricos, espectrofotométricos, cromatográficos e polarográficos. O problema inicial provém da dificuldade de isolar os derivados flavónicos das matérias-primas vegetais na sua totalidade e num estado de pureza conveniente para tal efeito [11].

Um processo usado nos métodos quantitativos consiste em precipitar os flavonóides com cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) em meio alcalinizado. Este precipitado, adquire cor, sendo assim possível, à dosagem colorimétrica. Os compostos flavónicos em presença do cloreto de alumínio possuem uma fluorescência amarela intensa, quando observados no ultravioleta [11,17]. A utilização de cloreto de alumínio na análise da presença de alguns compostos químicos foi pela primeira vez empregue para as antocianinas. Actualmente é um método amplamente aceite e utilizado para a

determinação de flavonóides. Neste método, o catião alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides (em solução metanólica) (Figura 7), ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Assim, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se as interferências de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. O complexo flavonóide-alumínio formado, absorve num comprimento de onda superior ao do flavonóide sem a presença do agente complexante ( $\text{AlCl}_3$ ). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com o cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se deste modo, interferências nas leituras das absorvâncias [21].



**Figura 7:** Formação do complexo flavonóide-alumínio, em solução metanólica, com cloreto de alumínio [21].

A utilização do cloreto de alumínio na determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, é um método reprodutível, fornecendo desvios muito pequenos ou quase nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, pode ser pouco exacto, ou seja, o valor que fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presentes na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isto porque, o comprimento de onda seleccionado (415 nm – 425 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. Os complexos de outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo da banda 415 nm – 425 nm, mas os complexos

derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma sub-estimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas [21].

### **3.2.3. Isoflavonóides**

Os isoflavonóides ao contrário dos flavonóides, têm na natureza uma distribuição muito restrita, aparecendo praticamente apenas na família das Fabáceas. Das diferentes estruturas existentes nos isoflavonóides, interessam à terapêutica as isoflavonas e os cumestanos, pelas propriedades estrogénicas que manifestam ao se ligarem aos receptores estrogénicos [6,16].

### **3.2.4. Taninos**

Os taninos são substâncias de natureza fenólica, hidrossolúveis, mas capazes de formarem complexos insolúveis com os alcalóides e com as proteínas. As propriedades adstringentes e de inibição do desenvolvimento de fungos e de bactérias está na base do seu emprego na terapêutica. Distinguem-se habitualmente dois grandes grupos: o dos taninos hidrolisáveis (taninos gálicos, dando por hidrólise para além da ose, ácido gálico e taninos elágicos que, por hidrólise dão ácido elágico) e o dos taninos condensados, também designados proantocianidinas. Proantocianidinas é uma designação alternativa à de taninos condensados pelo facto de estes compostos darem origem a antocianidinas após tratamento, a quente, com um ácido mineral. Estruturalmente, as proantocianidinas caracterizam-se como oligómeros ou polímeros de catequinas monoméricas (3-flavonóis) e de leucoantocianidinas (3,4-flavonodióis) que são biossintetizadas pela via mista do siquimato-acetato/malonato [6,16].

As procianidinas na maior parte dos casos são formadas por moléculas de catequina e de epicatequina unidas por ligação carbono-carbono [6,16].

Em medicina, os taninos são usados no tratamento de diarreias, como anti-inflamatórios, anti-sépticos e hemostáticos. Visto terem a propriedade de precipitarem alcalóides (excepto a morfina) e metais pesados, podem ser empregues como antídoto nos envenenamentos com estes compostos. Supõe-se que os taninos actuem segundo mecanismos relacionados, pelo menos em parte, com as características comuns aos taninos hidrolisáveis e condensados: actividade antioxidante e sequestradora de radicais

livres e capacidade de complexar macromoléculas de natureza proteica (enzimas digestivas, proteínas fúngicas ou virais) ou polissacárida e iões metálicos. Alguns ensaios *in vitro* sugerem que estes compostos intervêm na modulação de processos envolvidos na divisão e proliferação celular, na coagulação, na inflamação e na resposta imunológica. Por via externa, os taninos, através da complexação tanino-proteína e/ou polissacárido, impermeabilizam as camadas mais externas da pele e das mucosas. Desta forma, limitam a perda de fluidos e impedem as agressões externas, favorecendo a regeneração dos tecidos e, conseqüentemente, a cura de feridas, queimaduras e inflamações. Por via interna, admite-se que um mecanismo idêntico contribua para a acção anti-ulcerosa sobre a mucosa gástrica [6,16]

Quanto à actividade anti-microbiana dos taninos, ela tem sido fundamentada em três hipóteses [6]:

- Modificação do metabolismo microbiano por acção dos taninos sobre as membranas celulares de bactérias e de fungos;
- Inibição das enzimas microbianas e/ou complexação com os substratos dessas enzimas;
- Decréscimo de iões essenciais ao metabolismo das bactérias e fungos devido à complexação desses iões com os taninos.

Estudos recentes têm demonstrado que os taninos actuam como captadores de radicais livres e como antioxidantes, facto que tem atraído o interesse científico quanto ao desenvolvimento e à verificação da eficácia de novos produtos farmacêuticos à base de extractos de plantas contendo particularmente proantocianidinas [6,16].

### **3.2.5. Antraquinonas**

O nome antraquinona deriva da presença de um grupo carbonilo no anel central do esqueleto do antraceno (composto com três anéis benzénicos). Embora nem todos os compostos antraquinónicos sejam quinonas. Pois os senósidos são diantronas, isto é, formados por duas unidades quinónicas reunidas, cada, com o seu grupo carbonilo. Em linhas gerais, os derivados antraquinónicos exercem uma acção laxativa ou purgativa, conforme a dose, que se faz sentir entre 10 a 12 horas após a ingestão. Os heterósidos, ao atingirem o cólon, são hidrolisados pelas enzimas da flora bacteriana, indo as geninas

actuar sobre as terminações nervosas da parede intestinal, com o que diminui a reabsorção da água e se dá uma estimulação do peristaltismo intestinal [6,16].

### 3.3. Alcalóides

Os alcalóides são compostos existentes nos materiais vegetais, dotados de actividade farmacológica importante, mas também, de um modo geral, de elevada toxicidade. Têm na sua estrutura, para além dos elementos básicos das substâncias orgânicas, carbono e oxigénio, também, na maioria dos casos, oxigénio e, sempre, um ou mais átomos de azoto que conferem à molécula propriedades básicas. A basicidade é explicada pelo carácter insaturado do átomo de azoto, pois, dos cinco electrões planetários desse átomo, três estão ligados a átomos de hidrogénio e a radicais, estando os outros dois em condições de captar protões, pelo que formam sais com ácidos. Os alcalóides raramente apresentam massas moleculares elevadas. Possuem um carácter lipófilo muito acentuado, pelo que são solúveis nos solventes orgânicos e no álcool de elevada graduação. Quando reagem com os ácidos originam sais que passam a ser solúveis na água ou nas soluções hidroalcoólicas. A presença de oxigénio na maioria dos alcalóides confere-lhes propriedades particulares. Os oxigenados cristalizam facilmente, são inodoros e não voláteis, sendo normalmente incolores, com excepção de um pequeno número que são corados. Já os que não possuem oxigénio são líquidos, odoríferos e voláteis (por exemplo a esparteína). Aqueles que possuem massas moleculares pequenas e percentagem de oxigénio baixa são líquidos ou cristalizam dificilmente [6,16].

Quanto à sua origem biogenética, os precursores mais importantes são os aminoácidos; no entanto, conhecem-se numerosos alcalóides que derivam de terpenos e de esteróis. Frequentemente, a biossíntese resulta da combinação de produtos provenientes de duas ou mais vias anabólicas [6,16].

Os alcalóides têm numerosas acções farmacológicas [6]:

→ A nível do sistema nervoso autónomo: como simpaticomimética (efedrina de *Efedra spp.*), simpaticolítica (ioimbina de *Pausinystalia yohimbe* e alguns alcalóides da cravagem do centeio), anticolinérgica (atropina e hiosciamina de Solanáceas midriáticas), ganglioplégica (nicotina do tabaco) e

- parassimpaticomimética (eserina da fava do Calabar, o *Physostigma venenosum*, pilocarpina de *Pilocarpus spp.*);
- A nível do sistema nervoso central: como depressor (morfina do ópio, a escopolamina das Solanáceas midriáticas), como estimulante (estricnina de espécies do género *Strychnos*, a cafeína do café, do chá, do guaraná e do mate);
  - Amebicida (emetina da ipecacuanha – *Cephaelis ipecacuanha*);
  - Analgésica e ansiolítica (alcalóides da papoila da Califórnia – *Eschscholtzia californica*);
  - Anestésica local (cocaína da coca – *Eritroxylon coca*);
  - Antiarrítmica (esparteína da giesta – *Cytisus scoparius*);
  - Antifibrilante (quinidina da quina – *Cinchona sps.*);
  - Antipalúdica (quinina da quina);
  - Antitússica (codeína do ópio);
  - Antitumoral (vinblastina da vinca – *Catharanthus roseus*);
  - Diurética (teotrombina do cacau – *Theobroma cacao*);
  - Hipotensora (reserpina da rauvólfia – *Rauwolfia serpentina*).

## 4. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

## 4. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

---

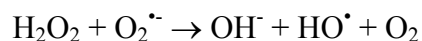
Enquanto as reacções ácido-base podem ser caracterizadas como processos de transferência de prótons, as reacções designadas por oxidação-redução (ou redox) são consideradas reacções de transferência de electrões. Uma reacção que envolva a perda de electrões é denominada reacção de oxidação. O termo “oxidação” foi originalmente utilizado pelos químicos para representar combinações de elementos com o oxigénio. No entanto, tem agora um significado mais amplo que inclui reacções que não envolvem o oxigénio. Uma reacção que envolva ganho de electrões é denominada por reacção de redução. Quando um elemento é oxidado, diz-se que actua como agente redutor, visto que doa electrões a uma outra substância, causando a sua redução. Quando, pelo contrário, um elemento é reduzido, actua como agente oxidante porque aceita electrões, causando a sua oxidação [22].

### 4.1. Radicais Livres

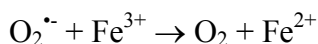
O termo ROS inclui radicais de oxigénio e um número de espécies relacionadas com a produção de radicais livres. Os radicais livres podem ser produzidos enzimaticamente (em reacções redox de cadeia de transporte de electrões – mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana celular e plasmática – e como intermediário durante a desintoxicação de drogas, na síntese de prostaglandinas e durante a activação de leucócitos e plaquetas), por causas ambientais (como a luz ou radiação ultravioleta ou ionizante) e por processos não enzimáticos (através da auto-oxidação de muitas substâncias – ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), hemoglobina, mioglobina, catecolaminas – que pode ser estimulada por iões metálicos com capacidade redox – ferro e cobre – radiação ionizante ou ultravioleta e por corantes fotoactivados ou pigmentos) [23-25].

A iniciação do processo oxidativo por radicais livres não está ainda clarificada, sendo o radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) e o radical peroxinitrilo ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) os radicais iniciadores. É também atribuído um papel importante ao radical anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) devido à

possibilidade de gerar o radical hidroxilo, muito reactivo através da reacção de Haber-Weiss:



Esta reacção ocorre apenas na presença de um metal de transição (normalmente o ferro) que é reduzido pelo  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e reage com o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) numa reacção tipo Fenton:



Uma vez formadas, as ROS passam para a microcirculação, e devido à sua alta reactividade, vão actuar a nível das diferentes estruturas celulares (proteínas e DNA) e também a nível da membrana celular (lípidos polinsaturados) [23-25].

Quando se verifica um desequilíbrio entre a formação de espécies reactivas de oxigénio/radicais livres e as defesas antioxidantes/mecanismos de reparação do organismo existe stresse oxidativo, que pode estar associado a doença [23].

#### **4.1.1. Peroxidação Lipídica**

A peroxidação lipídica tem uma importância relevante por constituir um processo em cadeia, isto é, em que a formação de um radical lipídico desencadeia a propagação do processo peroxidativo. Na peroxidação lipídica formam-se diversos produtos reactivos nomeadamente radicais lipídicos e aldeído malónico. Estes produtos finais, para além de actuarem directamente sobre outros componentes da membrana celular, podem infiltrar-se na corrente sanguínea aumentando os níveis no sangue e no plasma. Este aumento é indicador da ocorrência de danos nas membranas celulares de órgãos ou tecidos, que podem ser responsáveis pelo desencadear de diversos processos patológicos [23-25].

#### **4.1.2. Oxidação de Proteínas**

A alteração das propriedades das proteínas, e a formação de peróxidos de aminoácidos podem levar à degradação das proteínas, por fragmentação e formação de

ligações cruzadas (*cross-linking*), o que pode resultar na sua polimerização e inativação, especificamente em proteínas que contêm grupos sulfídricos (-SH) e grupos aromáticos. A oxidação de proteínas provoca ainda alteração da sua estrutura terciária que leva a agregação proteica e formação de amilóide. A oxidação de aminoácidos por radicais livres induz alteração na actividade enzimática, havendo também um comprometimento do potencial antioxidante de células e tecidos [23-25].

#### **4.1.3. Oxidação de DNA**

Os danos no DNA são dos processos mais importantes resultantes da ocorrência do processo peroxidativo *in vivo*. A alteração do DNA por danos oxidativos é uma das principais causas responsáveis pelo desencadear da carcinogénese, quer por activação de proto-oncogenes, quer por inactivação de genes supressores de tumores [23-25].

A inibição da programação da morte celular, a apoptose, poderá também estar associada com a oncogénese e com alterações ao nível do DNA e poderá surgir em consequência da acção de radicais livres que levam ao aumento da concentração de cálcio citoplasmático [23-25].

### **4.2. Antioxidantes**

Definem-se “antioxidantes” como quaisquer substâncias que, presentes em concentrações relativamente baixas (comparadas com as dos substratos), impedem ou retardam significativamente a oxidação de substratos oxidáveis [23-25].

#### **4.2.1. Sistemas Antioxidantes**

O organismo possui mecanismos de controlo de produção de ROS e mecanismos para limitar e reparar os danos tecidulares. O sistema antioxidante integrado compreende vários componentes [23-25]:

→ Antioxidantes que previnem a formação de ROS (ceruloplasmina - Cu, metalotionina - Cu, albumina - Cu, transferrina - Fe, ferritina - Fe e mioglobina - Fe);

- Antioxidantes que removem ROS, prevenindo assim reacções em cadeia: enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, metaloenzimas), moléculas pequenas (glutathione, ascorbato ou vitamina C, tocoferol ou vitamina E, bilirrubina, ácido úrico, carotenóides e flavonóides);
- Enzimas de reparação (reparam e removem biomoléculas). Estas incluem enzimas reparadoras de DNA, metionina sulfóxido reductase.

Contudo, a maior defesa antioxidante primária intracelular é atribuída a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase [23-25].

### **4.3. Relação entre stresse oxidativo e patologias**

Sabe-se que o stresse oxidativo está directamente relacionado com um grande número de patologias, nomeadamente o cancro (uma vez que os radicais livres têm actividade de iniciação e promoção – as duas fases fundamentais de desenvolvimento do cancro), as doenças cardiovasculares (o excesso de radicais livres pode iniciar a aterosclerose por danos nas paredes dos vasos sanguíneos), a diabetes *mellitus* (os radicais livres contribuem para a destruição das células dos ilhéus pancreáticos na diabetes *mellitus* dependente de insulina), as doenças inflamatórias (os radicais livres podem actuar indirectamente como mensageiros celulares e desencadear uma resposta inflamatória), a infertilidade (os radicais livres iniciam a peroxidação lipídica e a acumulação de peróxidos nas membranas dos espermatozóides, causando uma redução na mobilidade e viabilidade dos mesmos), as cataratas (os radicais superóxido e hidroxilo lesam as proteínas e os lípidos das membranas celulares, que se depositam na superfície do cristalino causando opacidade), o envelhecimento (que se deve à produção de reacções de radicais livres na mitocôndria que se acumulam com a idade), as doenças neurológicas (o cérebro, rico em ácidos gordos polinsaturados e ferro e pobre em antioxidantes, rodeado pelo fluido cerebrospinal, tem pouca ou nenhuma capacidade de quelar o ferro), doenças hepáticas (níveis elevados de ácidos gordos de cadeia curta aumentam a captação de ferro pelos hepatócitos, aumentando a produção de peróxido de hidrogénio e radicais livre), as doenças pulmonares (os radicais livres de oxigénio e outros produtos tóxicos formados pelas próprias células pulmonares e pela actividade neutrofílica, que se acumulam nos pulmões quando o oxigénio puro é respirado, podem

contribuir possivelmente para o dano oxidativo), entre muitas outras condições patológicas [23-25].

#### **4.4. Métodos de determinação laboratorial da actividade antioxidante**

Os métodos para avaliar o comportamento antioxidante podem ser agrupados em duas categorias, que reflectem a importância da actividade antioxidante nos alimentos ou a bioactividade em humanos. No caso dos sistemas alimentares, a necessidade consiste em avaliar a eficácia dos antioxidantes em fornecer uma protecção para os alimentos contra a deterioração oxidativa. Uma subcategoria envolve a medição da actividade antioxidante em alimentos, particularmente frutas, vegetais e bebidas, mas com o objectivo de determinar a carga de antioxidantes na dieta e a sua actividade antioxidante *in vivo* [26].

Os antioxidantes podem actuar por vários mecanismos, como sequestrando os radicais livres, decompondo os peróxidos e quelando os iões metálicos. Assim sendo, a actividade antioxidante deve ser medida e avaliada por vários métodos que contemplem diferentes mecanismos químicos de actividade antioxidante [27].

De acordo com as reacções químicas usadas, os métodos de determinação da actividade antioxidante podem ser agrupados em duas classes: transferência de átomos de hidrogénio (HAT) e transferência de electrões (ET). Os métodos HAT medem a capacidade de um antioxidante em inactivar os radicais livres por doação de átomos de hidrogénio. Os métodos ET medem a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um electrão para os radicais reduzidos, metais ou carbonilos [27].

Um dos problemas na determinação da actividade antioxidante é que esta é variável em função do método utilizado. Mas sabe-se que um mecanismo antioxidante nas diversas matrizes biológicas é muito complexo e muitos outros factores podem intervir nesse mecanismo. Perante esta complexidade, apenas um método de determinação da actividade antioxidante não é suficiente para se chegar a uma conclusão, logo, são aplicados diferentes métodos e são determinadas diferentes propriedades e características [27].

#### 4.4.1. Determinação da actividade antioxidante pelo método do DPPH

O método do DPPH baseia-se no estudo da actividade sequestradora do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Figura 8), de coloração púrpura que absorve a um determinado comprimento de onda (515 nm – 517 nm). Por acção de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ( $R^\bullet$ ), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina (Figura 9), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos determina-se a percentagem de actividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a percentagem de DPPH remanescente no meio reaccional [19,26].

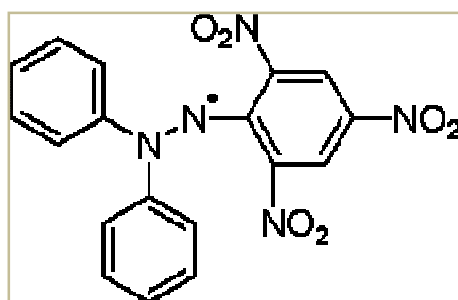


Figura 8: Estrutura química do radical livre DPPH [28].

A percentagem de actividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 % denomina-se por concentração eficiente ( $EC_{50}$ ), também chamada por concentração inibitória ( $IC_{50}$ ). O tempo necessário para atingir o estado estacionário à concentração eficiente ( $EC_{50}$ ), isto é, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % é designado por tempo eficiente ( $T_{EC50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $EC_{50}$  e maior a sua actividade antioxidante [19,26].

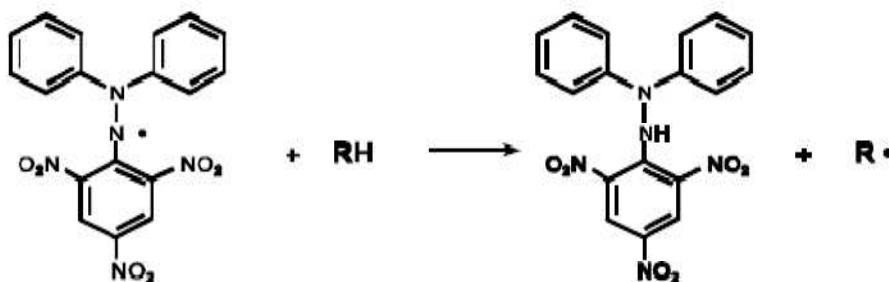
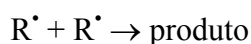
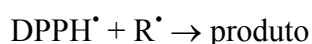
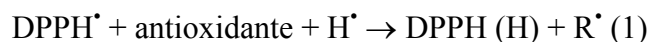


Figura 9: Reacção entre o DPPH e a substância antioxidante dadora de um átomo de hidrogénio [29].

Este método baseia-se, no fundo, na capacidade do DPPH reagir com substâncias dadoras de hidrogénio, incluindo compostos fenólicos [30].

A estequiometria da reacção do DPPH com um composto antioxidante pode ser descrita pelas seguintes equações [18,31]:



- (1) Envolve a abstracção de hidrogénio do antioxidante presente na sua forma protonada, ou transferência electrónica entre o DPPH e o antioxidante, ligada à captura de um protão, sendo esta hipótese a mais provável;
- (2) Tem em conta a reversibilidade do passo inicial (1).

#### **4.4.2. Determinação da actividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, que consiste na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, estima a habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes em extractos de plantas de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ), que oxida o  $\beta$ -caroteno presente na emulsão. Este método tem sido amplamente utilizado, com diferentes meios de extracção dos antioxidantes, para avaliação da actividade antioxidante de matrizes alimentares. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extractos vegetais [32].

O mecanismo do branqueamento do  $\beta$ -caroteno é um fenómeno mediado por radicais hidroperóxido resultantes da oxidação, pelo ar, do ácido linoleico. A actividade antioxidante dos carotenóides é baseada na formação de aductos radicalares de carotenóides com os radicais livres formados pelo ácido linoleico. O radical livre do

ácido linoleico, formado após a abstracção de um átomo de hidrogénio de um dos seus grupos metileno-dialílicos, ataca as moléculas do  $\beta$ -caroteno altamente insaturadas. Assim que as moléculas do  $\beta$ -caroteno perdem as suas ligações duplas pela oxidação, neste sistema modelo, na ausência de antioxidantes, o composto perde o seu cromóforo e a sua cor-de-laranja característica, que pode ser monitorizada espectrofotometricamente [33].

A comparação da actividade antioxidante tem que ter em consideração o solvente utilizado para a extracção dos compostos, a concentração do extracto e as condições do método analítico escolhido. A eficácia dos vários compostos na protecção dos sistemas lipídicos deve ser comparada na mesma concentração molar a padrões puros, como o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o tocoferol, entre outros. Além do aspecto comparativo, a medida do padrão para cada ensaio realizado é importante para assegurar a repetibilidade do teste [32].

#### **4.5. Relação entre compostos fenólicos, flavonóides e actividade antioxidante**

Recentemente, há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos e plantas para uso em fitoterapia, a fim de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido aos seus efeitos colaterais, tais como a carcinogenicidade. Além disso, os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, e proporcionar, ainda, benefícios adicionais à saúde dos consumidores. Embora as evidências sejam claras sobre a acção *in vitro* dos fenóis e polifenóis contra as ROS, eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes [34-36].

Na indústria alimentar, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol (BHA), BHT, *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBF) e galato de propilo (GP). Estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propilo, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogénio reage com iões ferrosos formando ROS, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no

sentido de encontrar produtos naturais com actividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles [36-38].

Os compostos activos mais comumente encontrados nas frutas, hortaliças e plantas são as substâncias fenólicas, as quais são conhecidas como potentes antioxidantes e antagonistas naturais de agentes patogénicos. Estas substâncias encontram-se nos vegetais na forma livre ou ligadas a açúcares e proteínas. Como antioxidantes naturais, além de serem compostos alternativos com finalidade de evitar a deterioração oxidativa dos alimentos, também podem exercer um importante papel fisiológico, minimizando os danos oxidativos no organismo animal. Há evidências de que os compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos tintos podem inibir a oxidação *in vitro* das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas, assim como é possível a sua utilização na prevenção de aterosclerose [19]. A actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e à sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela acção de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. Os compostos fenólicos podem actuar como agentes redutores, dadores de átomos de hidrogénio, neutralizadores de oxigénio singlete e quelantes de metais demonstrando diferentes actividades biológicas, tais como: actividade anti-bacteriana, anti-carcinogénica, anti-inflamatória, anti-viral, anti-alérgica, estrogénica e estimuladora do sistema imunitário [38-41].

Estudos têm demonstrado que polifenóis naturais possuem efeitos significativos na redução do cancro, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos, fonte de substâncias fenólicas, possivelmente pelas suas propriedades antioxidantes [41-43].

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos conhecidos pelas suas propriedades que incluem, sequestração ou quelação de radicais livres, inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas e actividade anti-inflamatória. Evidências experimentais, sugerem que estas propriedades se relacionam com actividade antioxidante dos flavonóides [43-45].

Estudos demonstram uma grande correlação linear entre o conteúdo de compostos fenólicos numa determinada amostra e a sua actividade antioxidante relacionada com a capacidade sequestradora de radicais livres, assim como boas correlações positivas entre o conteúdo de flavonóides de uma amostra e a respectiva actividade antioxidante [43-45].

## 5. ACTIVIDADE ANTI-MICROBIANA

## 5. ACTIVIDADE ANTI-MICROBIANA

---

As moléculas produzidas por microrganismos (*Penicillium spp.*, *Streptomyces spp.*, entre outros) com propriedades anti-microbianas contra outros microrganismos, são designadas por antibióticos, e as moléculas de síntese química com idênticas propriedades são os quimioterápicos. Actualmente dá-se a designação genérica de antibióticos a todos os fármacos com acção anti-microbiana [46].

A quimioterapia começou em 1935 com a utilização do corante Prontosil no tratamento das infecções estreptocócicas. A cedência no organismo de sulfanilamida a partir do Prontosil constituiu a premunicação da era das sulfonamidas em Medicina. Com a descoberta da penicilina por A. Fleming, em 1945, dá-se início à era da antibioterapia. A penicilina sendo um antibiótico inibidor da biossíntese do peptidoglicano, molécula tipicamente procariota, praticamente não apresenta efeitos prejudiciais para o Homem. Mais tarde é descoberta a estreptomicina, dando-se início à era dos antibióticos inibidores da síntese proteica [46].

A primeira descrição de resistência bacteriana a antibióticos deve-se a Abraham e Chain, em 1940, com o aparecimento de estirpes de *S. aureus* produtoras de penicilinas, enzimas que inactivam por hidrólise as penicilinas. Em 1950 surgem no Japão estirpes de *Shigella* resistentes às sulfonamidas e, em 1952, estirpes co-resistentes às sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina. A resistência microbiana aos diversos grupos de anti-microbianos tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sobretudo nos ambientes hospitalares com o acréscimo de morbilidade e mortalidade nas infecções. Por este motivo, surge o interesse na pesquisa de novos compostos de origem natural/vegetal que tenham propriedades anti-microbianas e que possam ser usados em humanos como alternativa aos antibióticos tradicionais [46].

Por outro lado, como uma grande variedade de microrganismos pode levar a uma deterioração dos alimentos, sendo a intoxicação alimentar um problema para os consumidores e para a indústria alimentar, alguns produtos químicos sintéticos são utilizados para controlar o crescimento microbiano e reduzir a incidência de deterioração dos alimentos e consequentes intoxicações alimentares. Embora estes conservantes sintéticos sejam eficazes, podem ser prejudiciais para a saúde humana

causando preocupação nos consumidores, logo tem sido crescente o interesse na procura de novas substâncias anti-microbianas a partir de fontes naturais, como plantas, para reduzir a aplicação de agentes anti-microbianos sintéticos na conservação dos alimentos. Extractos brutos de especiarias, ervas e plantas medicinais, ricos em compostos fenólicos são cada vez mais importantes na preservação dos alimentos devido à sua actividade anti-microbiana [47].

### **5.1. Microrganismos procariotas**

Os microrganismos procarióticos têm uma organização celular bastante simples. As bactérias, protótipo dos procariotas, apresentam uma grande diversidade morfológica, tendo a sua maioria uma de duas formas: esférica (coco) ou em bastonete (bacilo). A maioria das bactérias, após a replicação do seu material genético dividem-se por cisão binária e, de acordo com os planos da divisão celular, podem apresentar diversos agrupamentos. Os cocos podem agrupar-se aos pares (diplococos), em cadeia (estreptococos), em cacho (estafilococos) ou em tétradas. Os bacilos aparecem geralmente isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Existem ainda outras formas bacterianas demonstrando o pleomorfismo do mundo bacteriano, nomeadamente bacilos encurvados (vibriões), fusiformes e ondulados ou espirilados [46].

O tamanho da célula bacteriana também é muito heterogéneo exibindo alguns membros do Género *Mycoplasma* 100 – 200 nm de diâmetro e as células de *E. coli* 1,1 – 1,5 µm de comprimento. As bactérias (excepto *Mycoplasma* formas L e halófilos) possuem parede celular. De um modo geral, as bactérias desenvolvem-se em ambientes hipotónicos e dada a fragilidade da membrana citoplasmática ocorreria lise celular se não fosse a presença de uma parede celular rígida. Esta estrutura constitui, portanto, uma protecção mecânica eficaz contra a ruptura osmótica da célula bacteriana em ambientes hipotónicos. O componente responsável por essa rigidez é o peptidoglicano (mucopeptídeo ou mureína), macromolécula presente em todas as bactérias com parede celular, excepto nas *Archaeobacterias* [46].

A parede celular, estruturada sob controlo genético, também é responsável pela morfologia bacteriana e pelo duplo comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram. A coloração de Gram tem um grande significado taxonómico pois permite dividir as bactérias em dois grupos: positivas ao Gram / Gram positivas ou negativas ao

Gram / Gram negativas. As bactérias Gram positivas tomam a cor arroxeadada, conferida pelo corante primário (cristal violeta) e as Gram negativas coram de vermelho (fucsina básica). O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram deve-se ao facto dos dois grupos bacterianos apresentarem parede celular química e estruturalmente distinta. As diferenças mais relevantes residem no facto de: a parede celular das bactérias Gram positivas não apresentar lípidos (excepto *Mycobacterium*, algumas estirpes de *Corinebacterium*, *Nocardia*), enquanto a parede celular das bactérias Gram negativas apresenta um elevado teor de lípidos; o peptidoglicano ser muito abundante nas bactérias Gram positivas, cerca de 50 – 90 % do peso total da parede celular seca; nas bactérias Gram negativas o peptidoglicano constituir somente cerca de 10 % do peso total da parede celular seca. As diferenças químicas entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas vão ter repercussões na arquitectura da parede celular, sendo as diferenças ultraestruturais entre os dois grupos bacterianos evidenciados por microscopia electrónica de transmissão e através da observação de cortes celulares ultrafinos [46].

### **5.1.1. Bactérias Gram positivas**

#### **5.1.1.1. *Staphylococcus aureus***

O género *Staphylococcus* pertence à família dos *Micrococcaceae*. O nome tem origem grega e significa cocos em cacho, morfologia característica destes microrganismos, sobretudo quando cultivados à superfície de meios de cultura sólidos. Os estafilococos são bactérias que vivem em contacto íntimo com o Homem, numa relação habitual de comensalismo ou mutualismo. Muitas espécies constituem parte importante da população microbiana indígena da pele e mucosas, mas o género inclui também alguns dos principais microrganismos patogénicos, nomeadamente a espécie *Staphylococcus aureus*. As infecções causadas por estafilococos são muito variadas, tanto nas manifestações clínicas como na potencial gravidade. O contexto epidemiológico em que surgem apresenta condicionalismos particulares de profilaxia e controlo das infecções. A origem da infecção por *Staphylococcus aureus* é, muitas vezes endógena. A partir do nariz, da pele ou de uma lesão superficial, o microrganismo pode entrar em circulação e originar infecção à distância. Para além da infecção endógena ocorre também transmissão homem a homem, o que se verifica frequentemente na infecção hospitalar. Neste caso a transmissão pode dar-se por contacto directo (o mais

importante), por contacto indirecto através de objectos contaminados, ou por via aérea [48].

#### **5.1.1.2. *Bacillus cereus***

O *Bacillus cereus* tem uma distribuição ubiqüitária na natureza, nomeadamente no solo e em plantas em crescimento. Por isso aparece, frequentemente, nos alimentos (carne, leite em pó, arroz e em vegetais), podendo ocasionar toxi-infecções alimentares, devido à produção de exotoxinas, que são importantes na patogénese da intoxicação alimentar [48].

#### **5.1.1.3. *Enterococcus faecalis***

A grande resistência dos enterococos aos agentes físicos, que lhes permite crescer e sobreviver em ambientes hostis faz com que a presença seja habitual em quase todos os produtos biológicos, no solo, alimentos, água, animais, aves e insectos. No homem e outros animais a sua presença é constante nos aparelhos digestivo e urinário. A espécie *E. faecalis* existe, quase constantemente e em grande número, no tracto gastrointestinal. Apesar da sua abundância no organismo humano, o seu poder invasivo e patogénico é escasso e só em circunstâncias especiais é que ganha relevo como agente de infecção. Aparece, muitas vezes, associado a outros germes e, ocasionalmente, isolado em determinadas infecções, como por exemplo, endocardite. No entanto, quando é agente de infecção a sua resistência natural aos agentes infecciosos, torna muito difícil o tratamento. Esta mesma resistência natural aos antibióticos confere-lhe vantagem em ambientes onde o uso destes é frequente e, daí, a sua relevância como agente de infecções adquiridas nos hospitais em doentes sujeitos a tratamento prolongado com antibióticos de largo espectro que eliminam outras bactérias comensais susceptíveis [48].

### **5.1.2. Bactérias Gram negativas**

#### **5.1.2.1. *Escherichia coli***

*E. coli*, vulgarmente designada por coli-bacilo, é a espécie de maior importância clínica, ocasionando frequentemente infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias, abscessos, etc.. É também um habitante indígena do tracto intestinal dos

mamíferos e, por essa razão, a sua presença em águas de consumo indica poluição fecal. Embora *E. coli* seja um habitante indígena do tracto intestinal, algumas estirpes podem ocasionar perturbações entéricas. As estirpes *E. coli* enterotoxígenas (ETEC) são produtoras de dois tipos de toxinas: termo-lábil (LT) ou termo-estável (ST), as quais são responsáveis pela patogénese da infecção entérica. A toxina LT ocasiona no enterócito um aumento de intracelular de cAMP, provocando um distúrbio na permeabilidade da membrana citoplasmática, com perda de água e electrólitos para o lúmen intestinal. O mecanismo descrito é semelhante ao da toxina de *V. cholerae* [48].

#### **5.1.2.2. *Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* é a espécie mais frequente nas infecções humanas (tracto urinário, tracto respiratório, etc.). Tem a característica de produzir colónias mucóides em gelose de MacKoney, ser produtora de urease, e de ser imóvel [48].

#### **5.1.2.3. *Salmonella typhimurium***

Na maioria dos casos, a salmonelose é adquirida pela ingestão de alimentos e de água, contaminados ou por contacto fecal-oral. As aves e os animais contaminados constituem o reservatório de *Salmonella* não *typhi* e transmitem a doença ao Homem. O reservatório de *S. typhi* é o Homem, que é também o principal disseminador da febre tifóide, na fase aguda da doença ou no estado de portador assintomático [48].

#### **5.1.2.4. *Pseudomonas aeruginosa***

A espécie *P. aeruginosa* é praticamente ubiqüitária, podendo ser isolada de águas, do solo, de plantas, de esgoto e de amostras clínicas. Um meio selectivo para *P. aeruginosa* inclui cetrimida, que inibe o crescimento de muitos microrganismos, mas não o seu, devido à sua resistência à acção de compostos de amónio quaternários. Apesar de ser um agente patogénico oportunista, na maior parte dos casos *P. aeruginosa* é completamente inócua. As infecções por *P. aeruginosa* (infecções urinárias, difíceis de erradicar e frequentes após cateterização; infecções em feridas e zonas queimadas; otites crónicas, média e externa; infecções do tracto respiratório em doentes com fibrose quística e em doentes que têm que recorrer a ventiladores; infecções dos olhos após lesão traumática ou cirurgia) surgem, fundamentalmente, em doentes que já

anteriormente sofriam de outra doença ou lesão, podendo causar três tipos principais de infecções graves: i) infecção aguda e localizada dos olhos, após lesão da córnea ou cirurgia; ii) infecção crónica dos pulmões de doentes com fibrose quística; iii) infecção grave e disseminada em doentes com o sistema imunológico deficiente (doentes com SIDA, neoplasias, ou sob terapia com imunossuppressores após transplante de órgão) ou que apresentem queimaduras graves [48].

## **5.2. Microrganismos eucariotas**

As células são a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos. Por outras palavras, cada célula possui uma organização molecular que lhe permite desempenhar as funções que caracterizam a vida: crescer, reproduzir-se e adaptar-se ao meio exterior. As células eucarióticas existem quer como organismos unicelulares quer como constituintes de organismos multicelulares. A organização celular eucariótica é comum aos fungos, algas e protozoários. Os seres unicelulares eucarióticos mais simples são as leveduras, enquanto os protozoários são organismos unicelulares extremamente complexos que desenvolveram inúmeras especializações funcionais, tais como cílios sensoriais, fotoreceptores, cílios e flagelos e feixes contrácteis semelhantes a músculos. Em geral os organismos unicelulares são pequenos, consomem relativamente poucos nutrientes, dividem-se rapidamente e possuem capacidade de adaptação aos mais diversos meios ambientes. Apesar de terem alcançado um claro sucesso evolutivo (os seres vivos unicelulares constituem mais de metade do total da biomassa da Terra), o aparecimento de organismos multicelulares tornou possível o desenvolvimento de formas de vida com características mais complexas [46].

### **5.2.1. Leveduras**

Os fungos são células eucariotas, desprovidas de clorofila e que se reproduzem por esporos. Neles estão incluídos organismos de forma e dimensões muito variadas, conhecidos correntemente como leveduras, bolores, mofo, moirão e cogumelos. Os fungos leveduriformes, designados por leveduras, são fungos unicelulares. Os outros, que constituem a grande maioria, são fungos filamentosos ou pluricelulares [46,48].

A etimologia da palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de crescer ou fazer crescer, pois as primeiras leveduras descobertas estavam associadas a processos fermentativos como o de pães e de mostos que provocam um aumento da massa do pão ou do volume do mosto pela liberação de gás e formação de espuma nos mostos. Como células simples, as leveduras crescem e reproduzem-se mais rapidamente do que os bolores. São mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume. As leveduras também diferem das algas, pois não efectuam a fotossíntese, e igualmente não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões superiores e das suas propriedades morfológicas [46,48].

#### 5.2.1.1. *Candida albicans*

*Candida albicans* é uma espécie de fungo diplóide que causa, oportunamente, alguns tipos de infecção oral e vaginal nos seres humanos. As infecções causadas por fungos emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com algum tipo de imunodeficiência (como é o caso dos portadores da SIDA e das pessoas que estão sujeitas a algum tipo de quimioterapia). Além disso, este fungo pode ser perigoso para pacientes cuja saúde esteja enfraquecida, como por exemplo os pacientes de uma unidade hospitalar. Devido a estes factores, a *Candida albicans* tem despertado grande interesse nas pesquisas nas áreas da saúde e da medicina. A *Candida albicans* está entre os muitos organismos que vivem na boca e no sistema digestivo humano. Sob circunstâncias normais, a *Candida albicans* pode ser encontrada em 80 % da população humana sem que isso implique quaisquer efeitos prejudiciais na sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase. A virulência e patogenicidade da *Candida albicans* estão ligadas a diversos factores, sendo a formação de hifas, a estrutura da sua superfície celular (que, durante o contacto com células do hospedeiro, se adapta, sendo determinante para uma eficaz adesão e penetração), alterações fenotípicas (transição espontânea entre a forma típica de levedura, branca e circular, e uma forma opaca, em forma de pequenos bastões) e produção de enzimas extracelulares hidrolíticas [48].

### 5.2.1.2. *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* é uma espécie de fungo pertencente ao género *Candida* e a ordem *Saccharomycetales*. Como outras estirpes de *Candida* é, oportunamente, causadora da candidíase. A *Candida tropicalis* é por vezes usada como modelo em pesquisas genéticas e medicinais [48].

## 5.3. Métodos de determinação laboratorial da actividade anti-microbiana

### 5.3.1. Teste da difusão em disco

Os primeiros métodos para avaliar os efeitos dos antibióticos sobre as bactérias envolviam a utilização de pequenos orifícios feitos em placas de agar. A solução de antibiótico era depois colocada no orifício para, deste modo, inibir o crescimento bacteriano de forma perpendicular ao orifício. Em 1943, Foster e Woodruff utilizaram tiras de papel impregnadas com antibióticos como uma fonte alternativa de difusão. Os reservatórios de antibióticos que inicialmente consistiam em soluções dos mesmos, depositadas em poços de agar, foram rapidamente substituídos por discos de papel impregnados com antibióticos (Figura 10) [49].

Os resultados dos primeiros testes de difusão foram interpretados arbitrariamente: a presença de uma zona de inibição sugeria susceptibilidade e nenhuma zona, resistência. Os resultados qualitativos foram considerados uma desvantagem, e foram introduzidos vários discos com elevado ou baixo teor de antibiótico [49].

O teste de difusão em disco é relativamente barato, fácil de usar e flexível, é um método baseado na difusão em agar e que fornece resultados qualitativos para o rápido crescimento de bactérias aeróbias. No entanto, o teste de difusão em disco é baseado na utilização de um gradiente de concentração de um antibiótico relativamente instável, gerado a partir de uma fonte de difusão pontual central, ou seja, o disco. Muitas variáveis *in vitro*, tais como, a densidade do inóculo, a fase de crescimento, e as variações na placa de agar (por exemplo, a profundidade) podem influenciar directamente os tamanhos da zona de inibição e portanto, dar resultados pouco fiáveis. Serão obtidas zonas de inibição maiores com o crescimento lento dos organismos fastidiosos em comparação com rápido crescimento de bactérias aeróbias. Compostos de alto peso molecular tais como a vancomicina e polimixinas não difundem bem em agar e são, portanto, inadequados para testar por difusão em disco [49].



**Figura 10:** Resultado de um teste de difusão em disco para uma estirpe muito susceptível de *Staphylococcus* [49].

### 5.3.2. Métodos de determinação da Concentração Mínima Inibitória

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) é definida como a menor concentração dos compostos em estudo que inibe o crescimento visível dos microrganismos testados [49,50].

A Concentração Mínima Letal (MLC), que no caso das bactérias se designa por Concentração Mínima Bactericida (MBC) é a menor concentração de um composto que mata a maioria (99,9 %) do inóculo [49].

Como a MIC se refere à capacidade de inibição, é possível que, caso o antibiótico seja removido, o microrganismo comece a crescer novamente. Para determinar a capacidade do antibiótico para matar o microrganismo, pode ser realizado um ensaio de crescimento. O valor de MIC pode ajudar um médico a decidir a concentração de antibiótico necessária para inibir o agente patogénico. A determinação do valor de MIC pode ser realizada em agar ou em meio líquido [49].

#### 5.3.2.1. Microdiluição

O método tradicional de determinação da MIC é utilizando a técnica de diluição em meio líquido, onde várias diluições do antibiótico são incorporadas no meio líquido, utilizando para isso os poços de microplacas ou tubos de ensaio. Cada tubo ou poço da microplaca contém uma concentração diferente do agente anti-microbiano e é inoculada com um valor fixo do organismo a ser testado. Após incubação adequada, a menor

concentração que não revele crescimento visível é considerada como o valor de MIC. Um guia completo para este protocolo encontra-se na norma M7 - A7 do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI). Este é um teste quantitativo cujo resultado é expresso em microgramas por mililitro ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou miligramas por mililitro ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) [49].

Em testes de susceptibilidade anti-microbiana, o laboratório deve manter um elevado nível de precisão e reprodutibilidade nos procedimentos de ensaio. Devido às diferentes condições, tais como, inóculo, composição do meio de cultura, tempo de incubação, temperatura, pH, etc., um teste de diluição pode não proporcionar sempre o mesmo resultado [49].

#### **5.3.2.2. Diluição em agar**

O teste de diluição em agar é utilizado para a determinação do valor de MIC de um agente anti-microbiano necessária para inibir o crescimento de um microrganismo. Tal como acontece com técnica de diluição em meio líquido, o método de diluição em agar fornece um resultado quantitativo, sob a forma do valor de MIC, em contraste com os testes de susceptibilidade baseados na difusão em disco que resultam numa medida indirecta de susceptibilidade e proporcionam um resultado qualitativo interpretativo. O método de diluição em agar é o método que se encontra melhor estabelecido para determinar a susceptibilidade anti-microbiana e é comumente utilizado como padrão ou método de referência para a avaliação de novos agentes anti-microbianos [49].

## II. Material e Métodos

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 1. Moagem

As partes aéreas (que incluem os ramos, caules, folhas e flores) dos três arbustos em estudo (urze, carqueja e giesta) foram moídas em moinho de lâminas (RETSCH ®) (Figura 11) com crivo de 2 mm, de modo a obter um pó grosseiro. De referir, que nesta fase, pode acontecer a destruição de substâncias voláteis e termolábeis, com o calor que é libertado neste processo.



**Figuras 11:** Moinho utilizado na moagem.

### 2. Determinação do teor de matéria seca

Após arrefecimento/estabilização e homogeneização do pó grosseiro obtido, determinou-se o teor de matéria seca (TMS) de cada um dos arbustos. Para tal, colocou-se uma pequena quantidade de amostra dos arbustos reduzidos a pó numa balança com infravermelhos (Figura 12) que monitoriza a perda de peso pelo material e indica o TMS.



**Figura 12:** Balança com infravermelhos para determinação do teor de matéria seca.

**Tabela 1:** Valores do teor de matéria seca (TMS) e das massas secas dos arbustos.

<b>Extracção</b>	<b>Espécie</b>	<b>Massa de arbusto para extracção (g)</b>	<b>TMS (%)</b>	<b>Massa <u>seca</u> de arbusto para extracção (g) *</b>
<i>Etanólica</i>	<i>Urze</i>	110,197	92,79	102,252
	<i>Carqueja</i>	107,506	91,68	98,562
	<i>Giesta</i>	112,900	94,10	106,239
<i>Aquosa</i>	<i>Urze</i>	110,511	92,79	102,543
	<i>Carqueja</i>	115,146	91,68	105,566
	<i>Giesta</i>	111,160	94,10	104,602

### 3. Extracção

Fizeram-se duas extracções sólido-líquido, utilizando dois solventes diferentes, a água (para comprovar a eficácia da utilização das plantas na medicina tradicional) e o etanol. Para as extracções utilizou-se uma proporção de 1:10, isto é, 100 gramas de arbusto para 1000 mL de solvente.

#### 3.1. Preparação dos extractos etanólicos

Fez-se uma extracção sólido-líquido utilizando o Extractor de Soxhlet (Figura 13). Procedeu-se do seguinte modo para cada um dos três arbustos: pesaram-se cerca de 110 g do pó grosseiro obtido após a moagem, que foram cuidadosamente colocadas no interior de quatro cartuchos; foram necessários dois extractores de Soxhlet nos quais foram colocados dois cartuchos em cada um; de seguida adicionaram-se cerca de 500 mL de etanol em cada extractor e procedeu-se à extracção até o solvente ficar incolor (cerca de 6 - 7 horas).

Após a extracção, o volume do extracto etanólico foi aferido para 1 L. De seguida foram retiradas duas alíquotas (50 mL) para posterior quantificação. Estas alíquotas foram pesadas e sujeitas a concentração utilizando um evaporador rotativo (Figura 15) ( $T_{\text{evaporação}} = 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e permaneceram na estufa para completa secagem. Após vários ciclos de secagem (intercalando secagem e arrefecimento) – até que a massa se

mantivesse constante – aceita-se o valor da massa e calcula-se a concentração do extracto.

O restante extracto foi concentrado, para um volume final de 150 mL, utilizando para isso o evaporador rotativo ( $T_{\text{evaporação}} = 45\text{ °C}$ ) e foi conservado no frigorífico para as determinações posteriores.



**Figura 13:** Montagem laboratorial para as extracções etanólicas (à esquerda) e exemplo de uma extracção etanólica (à direita).

**Tabela 2:** Determinação das concentrações dos extractos etanólicos.

Espécie	[extracto etanólico] (mg/mL)
<i>Urze</i>	5,950
<i>Carqueja</i>	14,097
<i>Giesta</i>	6,248

### 3.2. Preparação dos extractos aquosos

Neste caso utiliza-se a técnica de decocção, para se efectuar a extracção sólido-líquido.

Procedeu-se do seguinte modo para cada um dos três arbustos: pesaram-se cerca de 110 g do pó grosseiro obtido após a moagem (Figura 14) que foram cuidadosamente colocadas no interior de um balão (1000 mL) com refluxo; de seguida adicionaram-se cerca 1000 mL de água destilada e procedeu-se à extracção, em ebulição durante 30 minutos.

Após a extração, o extracto foi filtrado sob vácuo utilizando um cadinho de porosidade 2 e o volume do extracto aquoso foi aferido para 2 L (Figura 14). De seguida foram retiradas duas alíquotas (50 mL) para posterior quantificação. Estas alíquotas foram pesadas e sujeitas a concentração utilizando um evaporador rotativo ( $T_{\text{evaporação}} = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e permaneceram na estufa para completa secagem. Após vários ciclos de secagem (intercalando secagem e arrefecimento) – até que a massa se mantivesse constante – aceita-se o valor da massa e calcula-se a concentração do extracto.

O restante extracto foi centrifugado (5 minutos a 4500 rpm) e o sobrenadante foi concentrado (resíduo/pellet foi desprezado), para um volume final de 150 mL, utilizando para isso o evaporador rotativo ( $T_{\text{evaporação}} = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e foi conservado no frigorífico para as determinações posteriores.



**Figura 14:** Preparação dos extractos aquosos.

**Tabela 3:** Determinação das concentrações dos extractos aquosos.

Espécie	[extracto aquoso] (mg/mL)
<i>Urze</i>	2,378
<i>Carqueja</i>	6,337
<i>Giesta</i>	2,606



**Figura 15:** Evaporador rotativo utilizado durante as sucessivas determinações.

#### **4. Diluições dos extractos em metanol**

Os métodos de determinação dos fenóis totais, flavonóides e actividade antioxidante pelo método do DPPH, exigem que o solvente das amostras seja o metanol. Assim sendo, procedeu-se do seguinte modo para cada um dos seis extractos: foram retirados 5 mL de extracto e colocados num balão volumétrico de 50 mL, perfazendo-se de seguida o volume com metanol. Deste modo, obtêm-se extractos etanólicos em metanol e extractos aquosos em metanol.

De seguida foi retirada uma alíquota dos extractos em metanol (10 mL) para posterior quantificação. Estas alíquotas foram pesadas e sujeitas a secagem na estufa para completa evaporação do solvente. Após vários ciclos de secagem (intercalando secagem e arrefecimento) – até que a massa se mantivesse constante – aceita-se o valor da massa e calcula-se a concentração do extracto.

Estas concentrações foram usadas para as posteriores diluições dos extractos em metanol (durante a determinação da actividade antioxidante) e para expressar o conteúdo de fenóis totais e flavonóides por matéria seca [19].

**Tabela 4:** Determinação das concentrações dos extractos em metanol.

<b>Extractos</b>	<b>Espécie</b>	<b>[extracto em metanol] (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>Etanólicos</i>	<i>Urze</i>	3600
	<i>Carqueja</i>	9300
	<i>Giesta</i>	3900
<i>Aquosos</i>	<i>Urze</i>	2700
	<i>Carqueja</i>	5700
	<i>Giesta</i>	3200

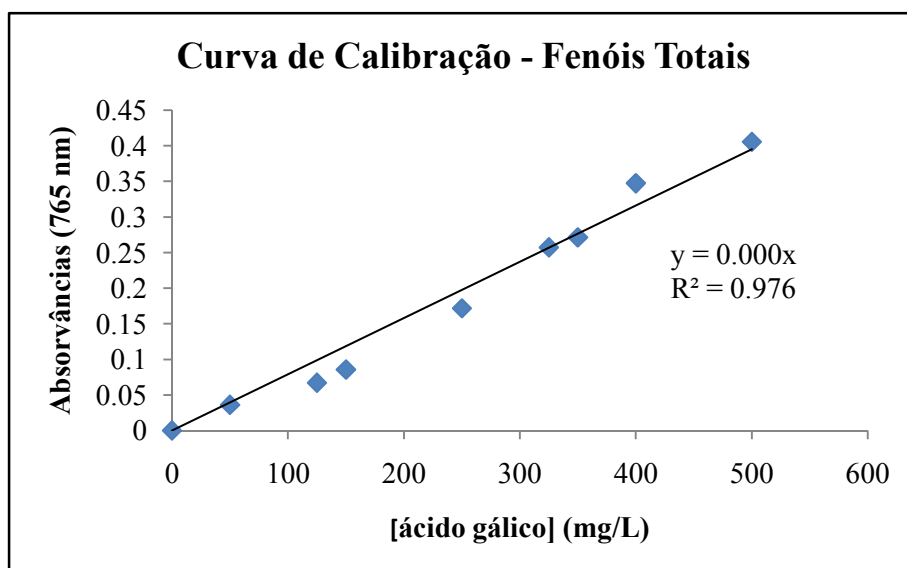
## 5. Determinação dos fenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais foi necessário construir uma curva de calibração. Para tal prepararam-se soluções, em metanol, de ácido gálico (utilizado como padrão fenólico de controlo) com diferentes concentrações (500, 400, 350, 325, 300, 250, 225, 200, 150, 125, 100 e 50 mg/L).

A 50  $\mu\text{L}$  das soluções anteriores, adicionaram-se 450  $\mu\text{L}$  de água destilada, 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (diluído em água destilada a partir de uma solução comercial com concentração 2 N), e de seguida deixou-se reagir (à temperatura ambiente) durante 5 minutos. Passado este tempo, adicionaram-se 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (75 g/L) e deixou-se reagir num banho de água à temperatura de 30 °C, durante uma hora e meia, com agitação intermitente. Para o branco procedeu-se de igual forma ao descrito, substituindo os 50  $\mu\text{L}$  iniciais por 50  $\mu\text{L}$  de metanol.

Após este tempo, leram-se as absorvâncias destas misturas reaccionais a 765 nm. As determinações foram feitas em duplicado.

Deste modo foi possível construir uma curva de calibração em que nas abcissas se colocam as concentrações de ácido gálico e nas ordenadas as absorvâncias (Figura 16).



**Figura 16:** Curva de calibração utilizada para a determinação dos fenóis totais.

Para a determinação dos fenóis totais nos extractos, procedeu-se como descrito anteriormente, substituindo os 50  $\mu\text{L}$  iniciais por 50  $\mu\text{L}$  de cada um dos seis extractos em metanol.

A quantidade de fenóis totais em cada um dos extractos foi calculada utilizando a equação da curva de calibração e é apresentada em miligramas de equivalentes de ácido gálico por gramas de matéria seca [43].

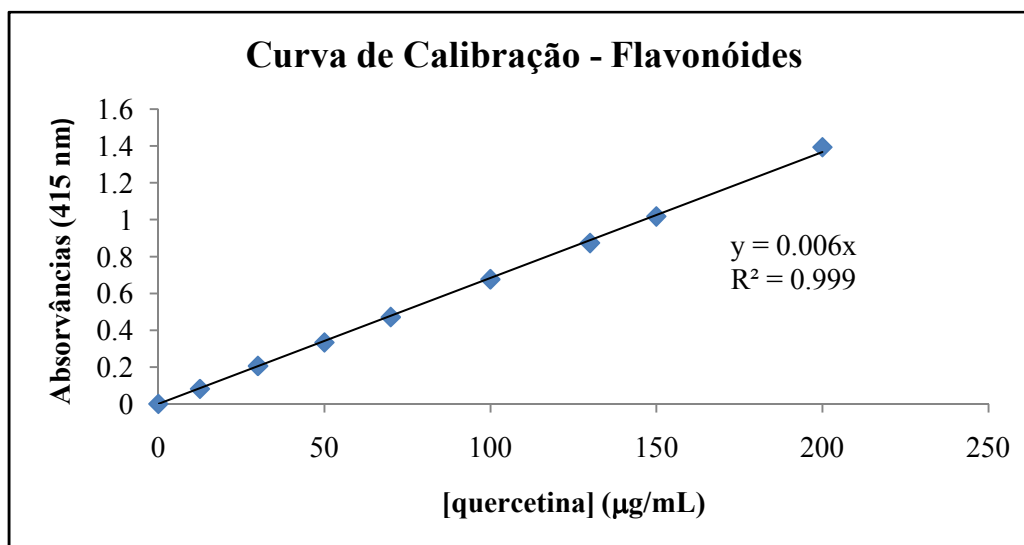
## 6. Determinação dos flavonóides totais

Para a determinação dos flavonóides foi necessário construir uma curva de calibração. Para tal prepararam-se soluções, em metanol, de quercetina com diferentes concentrações (200, 150, 130, 100, 70, 50, 30 e 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

A 500  $\mu\text{L}$  das soluções anteriores, adicionaram-se 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de uma solução aquosa de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de uma solução aquosa de acetato de potássio (1M) e 2,8 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente, durante trinta minutos, com agitação intermitente. Para o branco procedeu-se de igual forma ao descrito, substituindo os 500  $\mu\text{L}$  iniciais por 500  $\mu\text{L}$  de metanol.

Após este tempo, leram-se as absorvâncias destas misturas reaccionais a 415 nm. As determinações foram feitas em duplicado.

Deste modo foi possível construir uma curva de calibração em que nas abcissas se colocam as concentrações de quercetina e nas ordenadas as absorvâncias (Figura 17).



**Figura 17:** Curva de calibração utilizada para a determinação dos flavonóides totais.

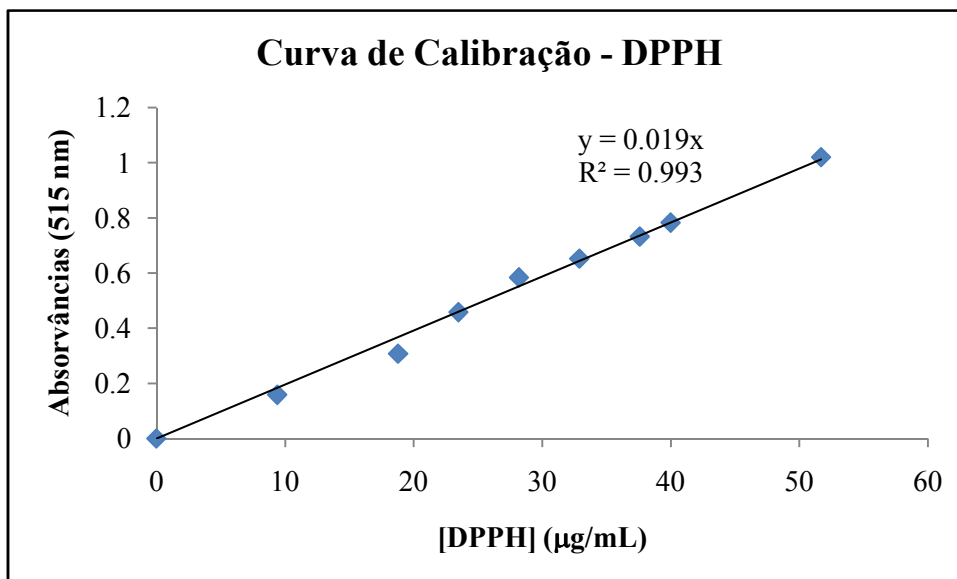
Para a determinação dos flavonóides nos extractos, procedeu-se como descrito anteriormente, substituindo os 500 µL iniciais por 500 µL de cada um dos seis extractos em metanol.

A quantidade de flavonóides em cada um dos extractos foi calculada utilizando a equação da curva de calibração e é apresentada em miligramas de equivalentes de quercetina por gramas de matéria seca [40].

## 7. Determinação da actividade antioxidante

### 7.1. Método do DPPH – Versão 1

Inicialmente construiu-se uma curva de calibração. Para tal prepararam-se soluções, em metanol, de DPPH com diferentes concentrações (50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 5 µg/mL). De seguida leram-se, em triplicado, as absorvâncias destas soluções a 515 nm. Para o ensaio em branco utiliza-se apenas metanol. Deste modo foi possível construir uma curva de calibração em que nas abcissas se colocam as concentrações de DPPH e nas ordenadas as absorvâncias (Figura 18).



**Figura 18:** Curva de calibração – DPPH.

Para determinar a actividade antioxidante dos extractos foi necessário preparar algumas diluições destes, em metanol, com as seguintes concentrações: 250, 200, 150, 100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Para cada uma destas diferentes diluições dos extractos procedeu-se do seguinte modo: a 2,7 mL de uma solução de DPPH com uma concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  (preparada diariamente), adicionou-se 0,3 mL de solução amostra.

De seguida leram-se as absorvâncias (a 515 nm) desta mistura reaccional, durante uma hora, em intervalos de um minuto. Neste caso, fez-se um ensaio em branco para cada amostra que consistiu em: 2,7 mL de metanol + 0,3 mL de solução amostra.

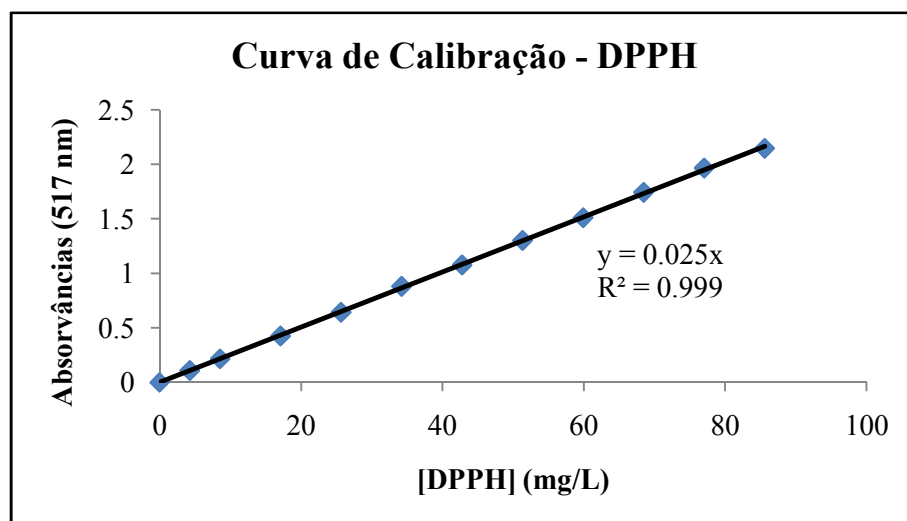
Para ser possível a comparação da actividade antioxidante dos extractos com a actividade antioxidante de compostos-padrão, procedeu-se de igual modo ao anteriormente descrito para as amostras, substituindo as amostras por soluções metanólicas de: rutina e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (trolox) (250, 200, 150, 100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  – concentrações iguais às das amostras) e ácido gálico (25, 20, 15, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  – concentrações dez vezes inferiores às das amostras, uma vez que o ácido gálico é um antioxidante potente e por isso são necessárias menores concentrações deste nas misturas reaccionais) [19,51,52].

## 7.2. Método do DPPH – Versão 2

Foi construída uma curva de calibração para utilizar este método. Preparou-se uma solução-mãe de DPPH, dissolvendo 21,4 mg deste composto, em 250 mL de metanol. Com esta solução de concentração igual a 85,6 mg/L ou 0,217 mM prepararam-se diferentes soluções com as concentrações que se encontram na Tabela 5.

De seguida, leram-se as absorvâncias destas soluções, contra um ensaio em branco contendo apenas metanol. As leituras foram feitas em duplicado.

A partir destes pontos obteve-se uma curva de calibração, na qual se representou graficamente a absorvância em função da concentração de DPPH em mg/L (Figura 19).



**Figura 19:** Curva de calibração ([DPPH] – mg/L) utilizada para a determinação da actividade antioxidante.

Para a medição da actividade antioxidante dos extractos, utilizando este método, prepararam-se diariamente três soluções de DPPH em metanol com as seguintes concentrações: 0,2000, 0,1242, 0,0800 mM.

De seguida, para cada concentração de cada um dos extractos em metanol (250, 200, 150, 100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  – concentrações iguais às do método anterior) e para cada solução de DPPH preparada previamente, seguiu-se o seguinte esquema experimental: a 0,1 mL de amostra adicionou-se 3,9 mL de solução de DPPH, após 90 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, foram lidas as absorvâncias a 517 nm.

**Tabela 5:** Concentrações das soluções de DPPH preparadas para a construção das curvas de calibração.

[DPPH] (mM)	[DPPH] (mg/L)
0,01085	4,28
0,0217	8,56
0,0434	17,12
0,0651	25,68
0,0868	34,24
0,1085	42,8
0,1302	51,36
0,1519	59,92
0,1736	68,48
0,1953	77,04
0,217	85,6

Os ensaios foram feitos em triplicado e o controlo para cada solução de DPPH consistia em 0,1 mL de metanol + 3,9 mL de solução de DPPH. O ensaio em branco era apenas metanol.

Calculou-se, de seguida, a percentagem de inibição (% I), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

Onde  $Abs_0$  corresponde à absorvância do controlo aos 90 minutos e  $Abs_1$  é a absorvância da amostra aos 90 minutos.

Para averiguar a sensibilidade e reprodutibilidade do método, assim como para comparar os AAI dos extractos, procedeu-se de igual modo ao descrito anteriormente, utilizando compostos antioxidantes como padrão. Neste caso utilizaram-se soluções metanólicas de: rutina e quercetina (500, 400, 300, 200, 100 e 50 mg/L), trolox (100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L) e ácido gálico (150, 100, 75, 50, 25 e 10 mg/L) [53].

### 7.3. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Utilizando este método para determinar a actividade antioxidante dos extractos foi necessário preparar diariamente uma emulsão, procedendo da seguinte forma: num balão de fundo redondo (100 mL), adicionar 20  $\mu$ L de uma solução de  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL de clorofórmio), 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 400 mg de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio; após homogeneização desta mistura, evaporou-se o clorofórmio utilizando o evaporador rotativo ( $T_{\text{evaporação}} = 45 \text{ }^{\circ}\text{C} - 5 \text{ minutos}$ ); de seguida adicionou-se ao resíduo 100 mL de água destilada saturada com oxigénio ( $\text{O}_2$ ) com agitação vigorosa e contínua.

A absorvância (a 470 nm) desta emulsão, utilizando como branco uma emulsão preparada de modo idêntico ao anterior, substituindo os 20  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -caroteno por 20  $\mu$ L de clorofórmio, deve situar-se entre 0,6 e 0,7.

Para determinar a actividade antioxidante dos extractos é necessário preparar diferentes diluições (em metanol) das amostras (1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 5  $\mu\text{g/mL}$ ); depois, num tubo de ensaio contendo 5 mL de emulsão adicionou-se 300  $\mu$ L de amostra. É necessário efectuar um ensaio em branco para cada amostra que será composto por 5 mL da emulsão preparada sem a solução do  $\beta$ -caroteno mais 300  $\mu$ L da amostra, e também um controlo para cada amostra que será composto por 5 mL de emulsão mais 300  $\mu$ L de metanol.

As absorvâncias destas misturas reaccionais, foram lidas a 470 nm para o tempo 0 e após duas horas de reacção, num banho térmico a 50  $^{\circ}\text{C}$ . Os ensaios foram feitos em duplicado.

Calculou-se depois a actividade antioxidante sob a forma de percentagem de inibição utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{amostra}^{t=2} - Abs_{controlo}^{t=2}}{Abs_{controlo}^{t=0} - Abs_{controlo}^{t=2}}$$

Onde  $Abs_{amostra}^{t=2}$  corresponde à absorvância da amostra após as duas horas de reacção,  $Abs_{controlo}^{t=2}$  corresponde à absorvância do controlo após as duas horas de reacção e  $Abs_{controlo}^{t=0}$  corresponde à absorvância inicial do controlo.

Procedeu-se de igual modo ao descrito para as amostras para o antioxidante sintético BHT, o qual serviu de padrão. De modo a poder comparar as actividades antioxidantes dos extractos relativamente ao BHT, representou-se graficamente as percentagens de inibição em função das respectivas concentrações [34,54-58].

## 8. Fraccionamento cromatográfico em coluna dos extractos

Os extractos etanólicos foram fraccionados por cromatografia em coluna usando sílica gel ( $\text{SiO}_2$  / 70 – 230 mesh / 0,063 – 0,2 mm) (Figura 20). Para tal, cerca de 500 mg de extracto seco, foram dissolvidas numa pequena quantidade de clorofórmio. O gel de sílica foi preparado num erlenmeyer, misturando cerca de 70 g de sílica com 300 mL (volume da coluna utilizada) de clorofórmio. A coluna foi cheia a húmido (de modo a evitar a retenção de bolhas de ar, o que prejudicaria a eluição), colocando-se no fundo um pouco de algodão, com o auxílio de uma vareta, seguida da adição de cerca de 0,5 cm de areia e em seguida do gel de sílica

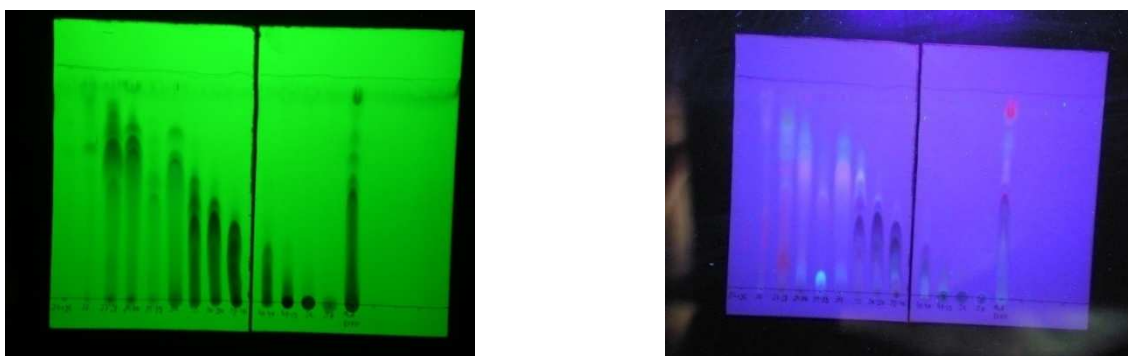


**Figura 20:** Montagem laboratorial de uma coluna de cromatografia.

preparado anteriormente. Colocou-se depois no cimo da coluna, o extracto dissolvido no eluente iniciando-se a eluição, abrindo a torneira, e a respectiva separação dos compostos presentes no extracto. Como eluentes utilizaram-se: clorofórmio, clorofórmio/acetato de etilo (9:1), clorofórmio/acetato de etilo (8:2), clorofórmio/acetato de etilo (7:3), clorofórmio/acetato de etilo (5:5), acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (9:1), acetato de etilo/metanol (8:2), acetato de etilo/metanol (7:3), acetato de etilo/metanol (5:5) e metanol; de modo a aumentar gradualmente a polaridade para que fossem separados em primeiro lugar os compostos com polaridade menor e por fim os compostos mais polares. De referir que o metanol (acima de 10%), dissolve a sílica, assim sendo, as fracções recolhidas podem conter vestígios de sílica. Foram recolhidas fracções, em tubos de ensaio, de cerca de 5 mL.

Para avaliar a separação dos compostos, para cada fracção foi feita cromatografia em camada fina (TLC) (Figura 21), usando como controlo o extracto bruto e como fase móvel clorofórmio/acetato de etilo (9:1) para as fracções iniciais e acetato de etilo/metanol (9:1) para as restantes. A revelação das sucessivas TLC foi feita usando

uma lâmpada de ultra-violeta (245 nm e 365 nm). Sempre que nas fracções se identificavam bandas semelhantes nas cromatografias em camada fina, as fracções correspondentes eram adicionadas num balão de fundo redondo tarado e o solvente era evaporado, utilizando para isso o evaporador rotativo e as massas das fracções foi determinada (Tabelas 6 e 7) [18,59-63].



**Figura 21:** Fotografias de algumas cromatografias em camada fina.

**Tabela 6:** Massas das fracções do extracto etanólico de urze.

<b>Nome da Fracção</b>	<b>Fracções</b>	<b>Massa da Fracção (mg)</b>	<b>Volume de DMSO para uma concentração final de 200 mg/mL (µL)</b>
A	3	67,61	338,1
B	4,5	277,25	1386,3
C	6	110,63	553,2
E	7-9	250,79	1254,0
F	10	297,12	1485,6
G	11,12	442,38	2211,9
H	13-15	220,69	1103,5
I	16-18	110,69	553,5
J	19	64,67	323,4
L	20-27	109,65	548,3
M	28	216,19	1081,0
N	29-32	246,64	1233,2
O	32-36	83,11	415,6
P	36-46	212,46	1062,3

**Tabela 7:** Massas das fracções do extracto etanólico de carqueja.

<b>Nome da Fracção</b>	<b>Fracções</b>	<b>Massa da Fracção (mg)</b>	<b>Volume de DMSO para uma concentração final de 200 mg/mL (µL)</b>
A	2,3	77,65	388,3
B	4,5	77,91	389,6
C	6-8	78,30	391,5
E	9-11	71,78	358,9
F	12	67,61	338,1
G	13	78,38	391,9
H	14	69,96	349,8
I	15-25	89,92	449,6
J	26-33	80,96	404,8
L	34-36	116,33	581,7
M	37-40	128,46	642,3
N	41,42	94,83	474,2
O	43-48	155,60	778,0
P	49-51	137,17	685,9

## **9. Determinação da actividade anti-microbiana**

Todos os extractos, à excepção do extracto aquoso de urze, foram dissolvidos em dimetilsufóxido (DMSO) para obter uma solução final de concentração igual a 200 mg/mL. As fracções dos extractos etanólicos foram também dissolvidas em DMSO (Tabelas 6 e 7). Por impossibilidade de dissolução em DMSO, o extracto aquoso de urze não foi estudado quanto à sua eventual actividade anti-microbiana.

### **9.1. Difusão em disco - Bactérias (de acordo com a norma M2-A8)**

Os discos de papel de filtro, com diâmetro igual a 6 mm, foram impregnados com 10 µL dos extractos dissolvidos em DMSO (200 mg/mL), assim sendo, os discos possuem 2 mg de extracto (2 mg/disco). Como controlo positivo, utilizou-se o antibiótico tetraciclina (30 µg/disco, isto é, 10 µL de uma solução de tetraciclina em

água a uma concentração de 3 mg/mL), permitindo deste modo controlar o crescimento da estirpe bacteriana e comparar a actividade do antibiótico com a actividade antimicrobiana dos extractos. Como controlo negativo, utilizaram-se discos impregnados com 10 µL de DMSO, uma vez que este foi o solvente no qual os extractos se encontravam dissolvidos, assim pode controlar-se a eventual inibição do crescimento bacteriano pelo DMSO ou uma possível contaminação.

Preparou-se o inóculo fazendo uma suspensão directa, em solução salina (NaCl – 0,85 %), de colónias isoladas seleccionadas numa placa de agar de meio não selectivo com 18 – 24 horas. Esta suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 McFarland.

Para a inoculação de placas de teste, mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão ajustada. A zaragatoa deve ser girada várias vezes e apertada firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo da zaragatoa.

A superfície seca de placas de Petri contendo meio Müller-Hinton Agar (MHA), preparado de acordo com as instruções do fabricante e com uma altura de cerca de 4 mm ( $\approx$  25 mL), é inoculada esfregando a zaragatoa em toda a superfície estéril do agar. Repetiu-se este procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° de cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se a zaragatoa na margem da placa de agar.

Os discos impregnados com os agentes anti-microbianos foram depois colocados na superfície das placas de agar semeadas. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contacto completo com a superfície de agar. Os discos devem ser distribuídos por igual, de maneira a que a distância de centro para centro não exceda 24 mm. Uma vez que alguns compostos se difundem quase instantaneamente, o disco não deve ser reaplicado após ter entrado em contacto com a superfície de agar.

As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 37 °C, durante cerca de 16 - 18 horas. Após este tempo, e se a placa estivesse satisfatoriamente semeada, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua encostada na parte de trás da placa de Petri invertida. O halo de inibição será considerado como a área sem crescimento detectável a olho nu e só foram considerados como halos de inibição os halos cujo diâmetro fosse superior ao diâmetro do disco (6 mm). O teste foi efectuado em triplicado, de forma independente [64].

### **9.2. Difusão em disco - Leveduras (de acordo com a norma CSLI-M44A)**

O procedimento para efectuar o teste de difusão em disco para leveduras é idêntico ao descrito no ponto anterior, com algumas alterações.

Como controlo positivo utilizou-se a anfotericina B (25 µg/disco, isto é, 10 µL de uma solução de anfotericina B em DMSO a uma concentração de 2,5 mg/mL).

O meio MHA, foi suplementado com 100 µL de azul-de-metileno por litro de meio (solução stock de azul-de-metileno 5 mg/mL) e com 20 g de glucose por litro de meio (20 g/L). O tempo de incubação das placas de Petri semeadas foi de 20 – 24 horas [65].

### **9.3. Diluição em agar – Bactérias (de acordo com a norma M7-A6)**

Nesta metodologia o agente anti-microbiano é incorporado ao meio (agar), sendo que cada placa de Petri contém uma concentração diferente do agente.

Este método permite determinar o valor de MIC que é a menor concentração de um agente anti-microbiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em agar ou em meio líquido [66].

O meio MHA foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, após autoclavado, o agar foi arrefecido num banho-maria a 45 °C – 50 °C, antes de se acrescentar, assepticamente, as soluções anti-microbianas. Posteriormente, o agar com o agente anti-microbiano incorporado foi vertido para as placas de Petri, de modo a obter uma superfície de agar de 3 mm de profundidade.

As placas devem ser produzidas o mais rapidamente possível após misturar, para evitar o arrefecimento e solidificação parcial do agar. Deve evitar-se a formação de bolhas. O agar deve solidificar à temperatura ambiente e as placas usadas imediatamente, pois não se pode presumir que todos os agentes anti-microbianos manterão a sua potência se forem armazenados.

Fizeram-se também, placas de controlo, isto é, placas sem os extractos/fracções, preparadas a partir do meio base para cultivar os controlos; e placas contendo apenas DMSO e sem os extractos/fracções permitem controlar possíveis contaminações do DMSO.

Em tubos de ensaio estéreis, foram preparadas as diversas diluições dos extractos/fracções de modo a obter diferentes concentrações dos extractos/fracções e que a percentagem de DMSO fosse de 2 % (Tabela 8). Após a preparação das diversas

diluições (extracto/fracção + DMSO + água estéril), foi adicionado o meio MHA como descrito anteriormente.

**Tabela 8:** Esquema para as sucessivas diluições.

[extracto/fracção] (mg/mL)	Volume de extracto/fracção (200 mg/mL de DMSO) (µL)	Volume de DMSO (µL)	Volume de água (µL)	Volume Total (µL)	Volume de MHA (mL)	Volume Final (mL)
0,3125	4,70	25,00	270,3	300	2,7	3
0,625	9,30	20,70	270	300	2,7	3
1,25	18,75	11,25	270	300	2,7	3
2,5	37,50	---	262,5	300	2,7	3
5	75	---	225	300	2,7	3
10	150	---	150	300	2,7	3
20	300	---	---	300	2,7	3
<i>DMSO</i>	---	30,00	270	300	2,7	3

De seguida, preparou-se o inóculo fazendo uma suspensão directa, em solução salina (NaCl – 0,85 %), de colónias isoladas seleccionadas numa placa de agar de meio não selectivo com 18 – 24 horas. Esta suspensão foi ajustada para uma turbidez de 0,5 McFarland. Como as culturas ajustadas ao padrão McFarland 0,5 contêm aproximadamente de  $1$  a  $2 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colónias/mL (UFC/mL) na maioria das espécies, sendo o inóculo final necessário de  $10^4$  UFC por ponto de 5 a 8 mm de diâmetro. Como se aplicam 2 µL de inóculo, a suspensão de McFarland 0,5 deve ser diluída 1:10 em solução salina estéril para obter uma concentração de  $10^7$  UFC/mL. O inóculo final em agar terá, então, aproximadamente  $10^4$  UFC por ponto.

As placas inoculadas devem permanecer à temperatura ambiente até que a humidade nos pontos do inóculo tenha sido absorvida pelo agar, isto é, até os pontos secarem, mas nunca mais de 30 minutos. A seguir, as placas foram invertidas e incubadas, a 37° C, por um período de 16 a 20 horas.

Após a incubação das placas, estas devem ser colocadas numa superfície escura, não reflectiva, para determinar os pontos finais. Foram feitas três determinações experimentais independentes [66].

### III. Resultados e Discussão

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 1. Rendimentos das Extracções

Dos resultados apresentados na Tabela 9, verifica-se que a carqueja possibilita maiores rendimentos de extracção, quando comparados com os outros arbustos. Por outro lado, os extractos etanólicos apresentam maiores rendimentos de extracção do que os extractos aquosos, isto porque na extracção de compostos com actividade antioxidante, nomeadamente de compostos fenólicos, a partir de produtos vegetais, o etanol é o solvente mais adequado, quando comparado com a água.

O estudo desenvolvido por Kaur e seus colaboradores [41], que pretendia avaliar a actividade antioxidante e o conteúdo fenólico de alguns vegetais, permitiu concluir que os extractos etanólicos dos vegetais em estudo possuíam maior actividade antioxidante do que os extractos aquosos dos mesmos vegetais o que indica que os processos de extracção de antioxidantes, especialmente carotenóides, a partir de vegetais usando etanol como solvente, são mais eficientes do que usando a água [41].

Os valores dos rendimentos de extracção obtidos, são semelhantes aos obtidos por Sousa e seus colaboradores [19], nomeadamente nos extractos etanólicos de casca e folha de *T. brasiliensis*, e de folhas de *C. macrophyllum*, *T. fagifolia*, *Q. grandiflora*.

**Tabela 9:** Rendimentos das Extracções.

<b>Extractos</b>	<b>Espécie</b>	<b>Rendimento da Extracção (%)</b>
<i>Etanólicos</i>	<i>Urze</i>	11,638
	<i>Carqueja</i>	28,605
	<i>Giesta</i>	11,762
<i>Aquosos</i>	<i>Urze</i>	4,638
	<i>Carqueja</i>	12,006
	<i>Giesta</i>	4,983

## 2. Fenóis totais

Na avaliação da actividade antioxidante de extractos de produtos vegetais é importante a determinação dos fenóis, uma vez que estes compostos estão presentes em quantidades significativas em todas as plantas e constituem um dos maiores grupos de compostos com actividade antioxidante [43]. Os fenóis encontram-se maioritariamente nas folhas e flores das plantas, exercendo protecção contra agentes patogénicos devido à sua actividade anti-microbiana. Por isso, os compostos fenólicos têm também recebido uma grande importância devido à eventual acção anti-microbiana que alguns possam apresentar contra microrganismos patogénicos para o Homem [44].

Na Tabela 10 encontram-se registados os valores dos conteúdos fenólicos dos extractos em estudo.

**Tabela 10:** Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g matéria seca) – Média  $\pm$  Desvio Padrão.

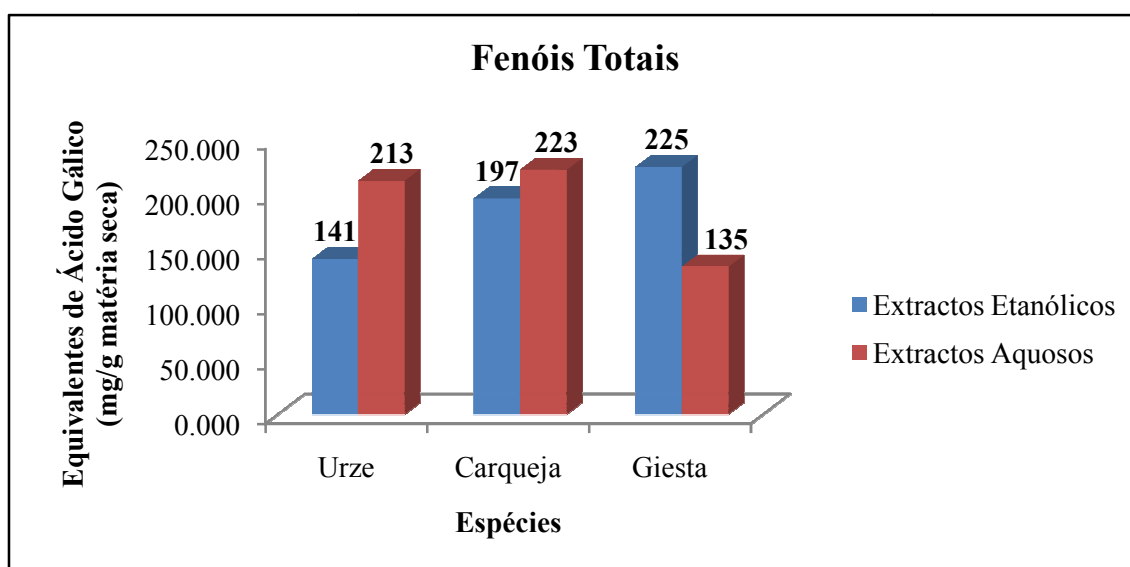
<b>Extractos</b>	<b>Espécie</b>	<b>Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g matéria seca) - Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>
<i>Etanólicos</i>	<i>Urze</i>	141,493 $\pm$ 1,228
	<i>Carqueja</i>	196,606 $\pm$ 3,944
	<i>Giesta</i>	225,321 $\pm$ 4,079
<i>Aquosos</i>	<i>Urze</i>	212,731 $\pm$ 1,637
	<i>Carqueja</i>	222,697 $\pm$ 5,117
	<i>Giesta</i>	134,668 $\pm$ 0,138

O extracto que apresenta uma maior concentração em fenóis totais é o extracto etanólico de giesta e, pelo contrário, aquele que apresenta uma menor concentração em fenóis totais é o extracto aquoso de giesta.

De entre os extractos etanólicos, aquele que possui uma maior quantidade de fenóis é o extracto de giesta e o que apresenta a menor quantidade em fenóis totais é o extracto de urze.

Por outro lado, nos extractos aquosos, aquele que apresenta a maior quantidade de fenóis totais é o extracto de carqueja e o que apresenta menor quantidade é o extracto de giesta.

Os resultados obtidos para o conteúdo fenólico são muito semelhantes nas diferentes espécies de arbustos estudadas. Neste caso, parece que o tipo de solvente não influencia a quantidade de fenóis extraídos, o que indica que tanto o etanol como a água são solventes adequados para extrair compostos fenólicos, no entanto o etanol pode extrair outros compostos com actividade antioxidante que não sejam fenóis, nomeadamente carotenóides [41].



**Figura 22:** Concentração de fenóis totais nos extractos.

Observando a Figura 22 é possível ordenar os extractos por ordem decrescente da concentração em fenóis totais do seguinte modo:

extracto etanólico de giesta > extracto aquoso de carqueja > extracto aquoso de urze > extracto etanólico de carqueja > extracto etanólico de urze > extracto aquoso de giesta

A composição em fenóis totais nestes arbustos é muito semelhante a outros resultados obtidos por Sousa e colaboradores [19] em extractos etanólicos de raiz de *C. prunifera* e são superiores aos obtidos por Miliauskas e colaboradores [43] em extractos de diversas plantas usando como solventes a acetona, o acetato de etilo e o metanol o que pode indicar que para a extracção de fenóis a água e o etanol são solventes mais indicados.

### 3. Flavonóides totais

Os flavonóides, como um dos mais diversificados e generalizados grupos de compostos naturais são, provavelmente, os compostos fenólicos mais importantes. Estes compostos possuem um amplo espectro de actividades biológicas e químicas, incluindo propriedades sequestradoras de radicais. No entanto, sabe-se que a estrutura química dos flavonóides influencia as suas propriedades antioxidantes (que dependem da capacidade para doar um átomo de hidrogénio ou um electrão ao radical livre), particularmente a posição do grupo hidroxilo na molécula [43].

Na Tabela 11, encontram-se resumidas as concentrações em flavonóides totais dos extractos.

**Tabela 11:** Equivalentes de Quercetina (mg/g matéria seca) – Média  $\pm$  Desvio Padrão.

<b>Extractos</b>	<b>Espécie</b>	<b>Equivalentes de Quercetina (mg/g matéria seca) - Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>
<i>Etanólicos</i>	<i>Urze</i>	37,541 $\pm$ 0,260
	<i>Carqueja</i>	32,175 $\pm$ 1,616
	<i>Giesta</i>	39,084 $\pm$ 0,587
<i>Aquosos</i>	<i>Urze</i>	15,169 $\pm$ 0,385
	<i>Carqueja</i>	28,160 $\pm$ 0,128
	<i>Giesta</i>	16,716 $\pm$ 0,374

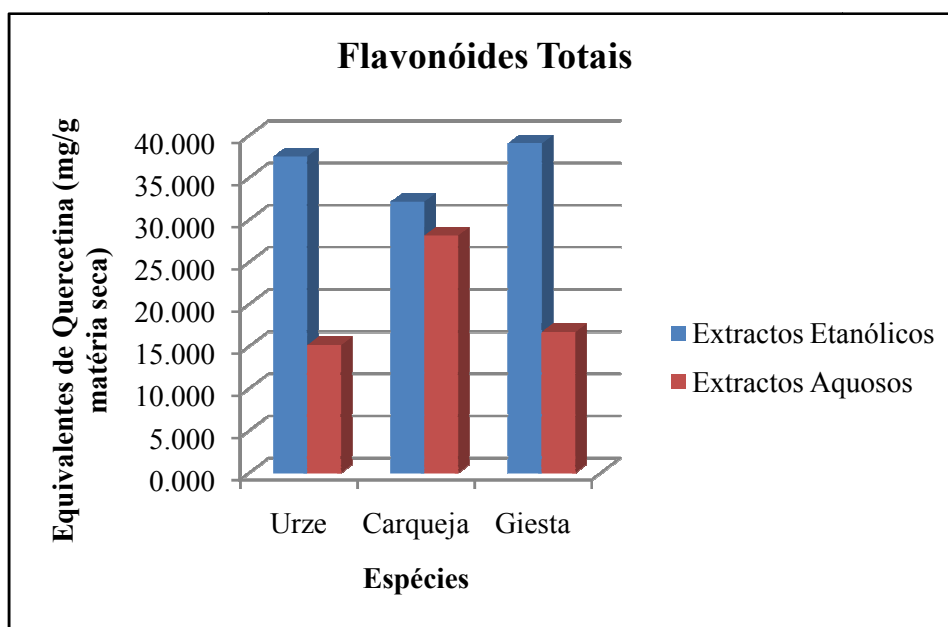
O extracto que apresenta uma maior concentração em flavonóides totais é o extracto etanólico de giesta e, pelo contrário, aquele que apresenta uma menor concentração em flavonóides totais é o extracto aquoso de urze.

De entre os extractos etanólicos, aquele que possui uma maior quantidade de flavonóides é o extracto de giesta e o que apresenta a menor quantidade em flavonóides totais é o extracto de carqueja.

Por outro lado, nos extractos aquosos, aquele que apresenta a maior quantidade de flavonóides totais é o extracto de carqueja e o que apresenta menor quantidade é o extracto de urze.

De um modo geral, os extractos etanólicos possuem maior quantidade de flavonóides totais quando comparados com os extractos aquosos, o que mostra que o etanol é o solvente preferível para a extracção de flavonóides de amostras vegetais, o que acontece devido à maior afinidade do etanol para os flavonóides, uma vez que tanto o etanol como os flavonóides possuem polaridades semelhantes, devido ao grupo hidroxilo dos flavonóides [43].

De referir também que o extracto etanólico de giesta é aquele que apresenta uma maior concentração em fenóis totais e flavonóides totais, simultaneamente.



**Figura 23:** Concentração de flavonóides totais nos extractos.

Observando o gráfico da Figura 23 é ordenam-se os extractos por ordem decrescente da concentração em fenóis totais:

extracto etanólico de giesta > extracto etanólico de urze > extracto etanólico de carqueja > extracto aquoso de carqueja > extracto aquoso de giesta > extracto aquoso de urze

O conteúdo em flavonóides totais nos extractos estudados é análogo ao dos extractos metanólicos de *Mellilotus officinalis*, *Adiantum capillus-veneris*, *Equisetum maximum* e *Urtica dioica*, analisados por Pourmorad e colaboradores [40].

#### 4. Actividade antioxidante

Existem inúmeros métodos estabelecidos para a determinação da actividade antioxidante de compostos puros e de extractos de plantas. O método do DPPH é usualmente utilizado na quantificação da actividade antioxidante de amostras, relacionada com a sua capacidade em sequestrar radicais livres. O radical formado durante a reacção do antioxidante com o DPPH é um radical livre estável, mas é sensível à luz, ao oxigénio, ao pH e ao solvente utilizado.

Diversos métodos de determinação da actividade antioxidante, que se baseiam na reacção do DPPH, estão actualmente descritos, estes incluem diferentes concentrações iniciais da solução de DPPH, diferentes alíquotas dos extractos, diferentes alíquotas da solução de DPPH, o que resulta em diferentes concentrações finais dos extractos de plantas, dos compostos puros e de DPPH. Têm sido referidos tempos reaccionais (no escuro ou não) de 10, 15, 20, 30, 60, 100 e 120 minutos. Os resultados dos ensaios baseados no DPPH, são apresentados sob inúmeras formas, como percentagens de inibição, percentagens de DPPH remanescente, actividade antirradicalar, etc.

Assim sendo, a actividade antioxidante dos extractos dos arbustos foi determinada utilizando dois métodos diferentes do DPPH, para se compararem os resultados entre eles.

Posteriormente determinou-se a actividade antioxidante dos extractos utilizando um terceiro método – sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico – que se baseia num mecanismo diferente do método do DPPH (sequestração de radicais livres) de forma a comparar a actividade antioxidante dos extractos determinada pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, com as determinações dos métodos dos DPPH.

#### 4.1. Método do DPPH – Versão 1

Usando este método para a determinação da actividade antioxidante calculou-se, para cada uma das diluições dos diferentes extractos e para cada minuto em que as absorvâncias foram lidas, a concentração de DPPH no momento –  $[DPPH]_{T=t}$ ,  $t = 1, 2, \dots, 60$  minutos, a partir da equação da curva de calibração. Calculou-se depois a percentagem de DPPH remanescente ( $\% DPPH_{rem}$ ) utilizando a seguinte fórmula:

$$\% DPPH_{rem} = \frac{[DPPH]_{T=t}}{[DPPH]_{T=0}}, \text{ em que } t = 1, 2, \dots, 60 \text{ minutos}$$

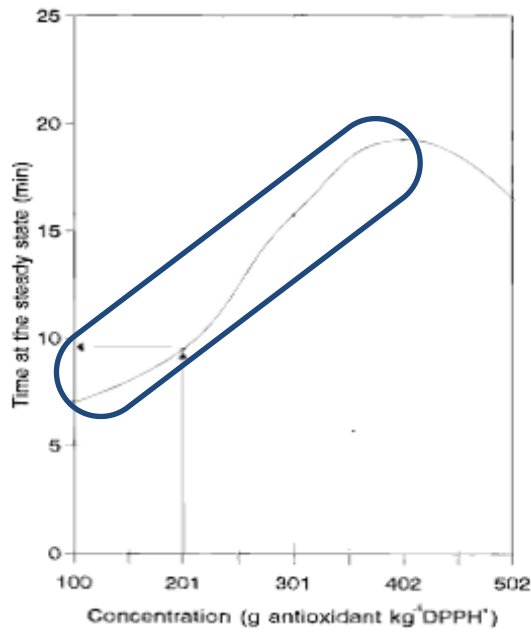
$$\text{e } [DPPH]_{T=0} = [DPPH]_{inicial} = 40\mu g/mL$$

Representou-se graficamente, para cada extracto, a  $\% DPPH_{rem}$  em função do tempo (em minutos), para todas as diluições do mesmo [19].

Para a determinação da concentração eficiente (quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50 %) –  $EC_{50}$ , representou-se graficamente a  $\% DPPH_{rem}$  para  $t = 60$  minutos em função da concentração da amostra. Após o ajuste de uma equação a este gráfico foi possível determinar a concentração de amostra que corresponda a uma  $\% DPPH_{rem} = 50$  e que é  $EC_{50}$  [19,52,53].

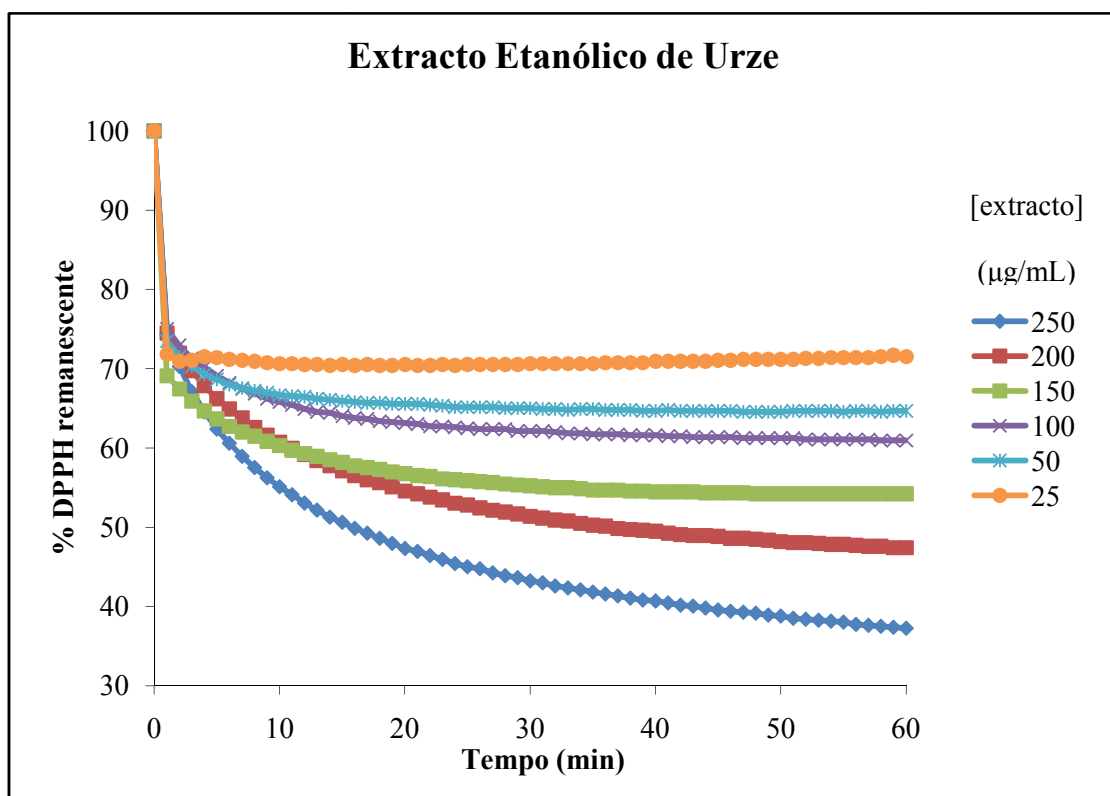
Para se obter o valor do tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), representou-se graficamente o tempo ( $t$  em minutos) em que, para cada diluição, a  $\% DPPH_{rem}$  fica estável/constante, isto é, quando se atinge o estado estacionário, em função da concentração da amostra. Este gráfico deve ser semelhante ao da Figura 24 [19,52,53]. Depois, na zona crescente deste gráfico (assinalada a azul na Figura 24), ajustou-se uma recta, cuja equação permitiu determinar o tempo que corresponde à concentração  $EC_{50}$  e que é o  $T_{EC50}$  [51,52].

Finalmente, foi possível determinar a Eficiência Antirradicalar (AE) de uma amostra, usando a seguinte fórmula:  $AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}}$  [51,52].



**Figura 24:** Determinação do tempo eficiente, isto é, tempo necessário para atingir  $EC_{50}$  [51].

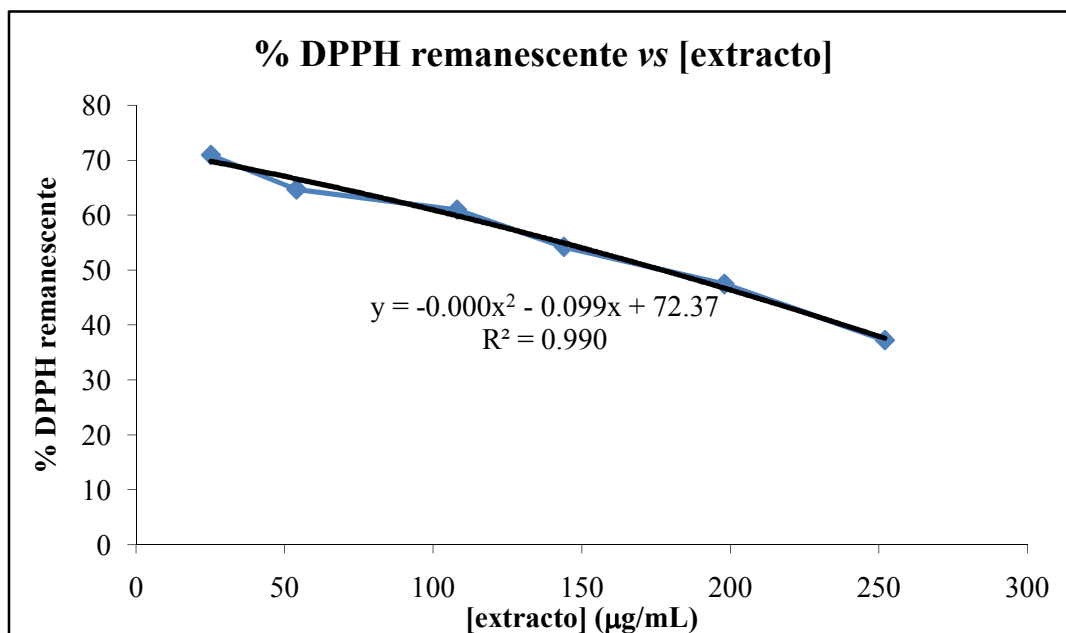
Para a determinação dos parâmetros da actividade antioxidante dos extractos e dos padrões, segue-se o procedimento de cálculo descrito anteriormente e que a seguir se exemplifica para o extracto etanólico de urze.



**Figura 25:** Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto etanólico de urze.

No gráfico da Figura 25, observa-se a diminuição da percentagem de DPPH remanescente, na presença das várias concentrações do extracto etanólico de urze.

Para  $T = 60$  minutos, representa-se graficamente a concentração de extracto em função da percentagem de DPPH remanescente (Figura 26).



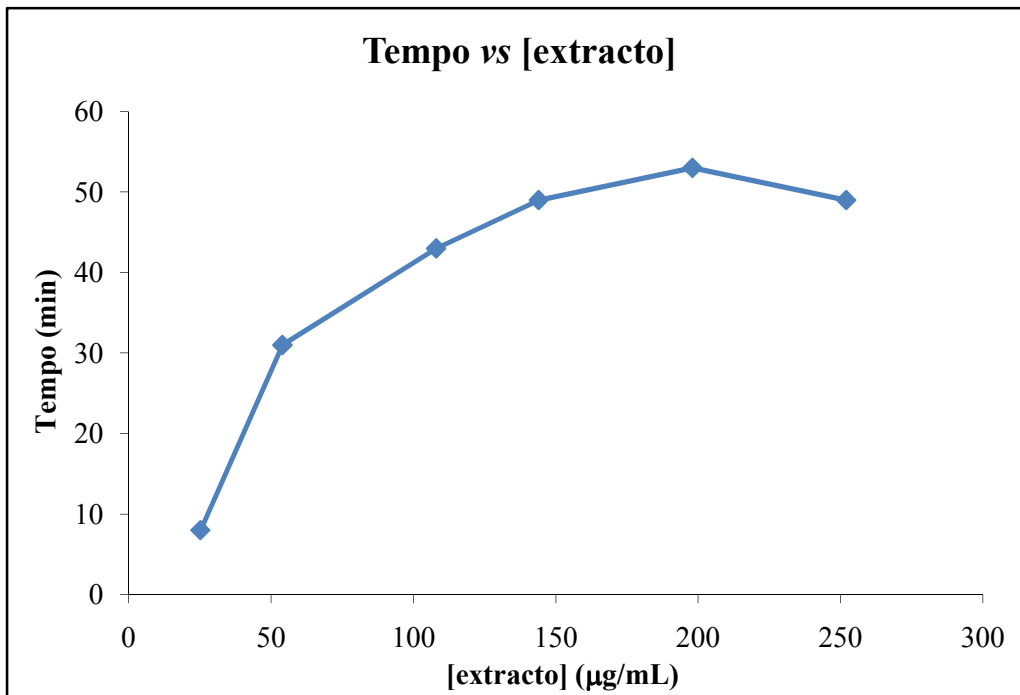
**Figura 26:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$  do extracto etanólico de urze.

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

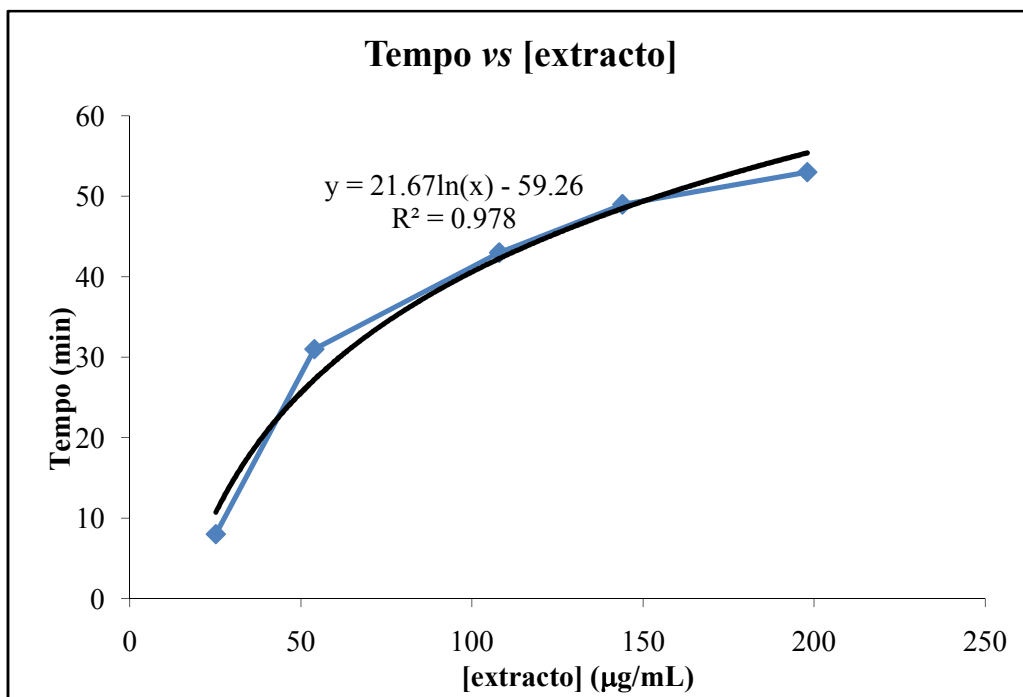
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [\text{extracto}] = 168,596 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 168,596 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto etanólico de urze, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 168,596  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 27:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 28:** Zona crescente do gráfico da Figura 27. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$  do extracto etanólico de urze.

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico da Figura 28:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 51,892 \text{ minutos}$$

$$T_{EC50} = 51,892 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o extracto etanólico de urze é de 51,892 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

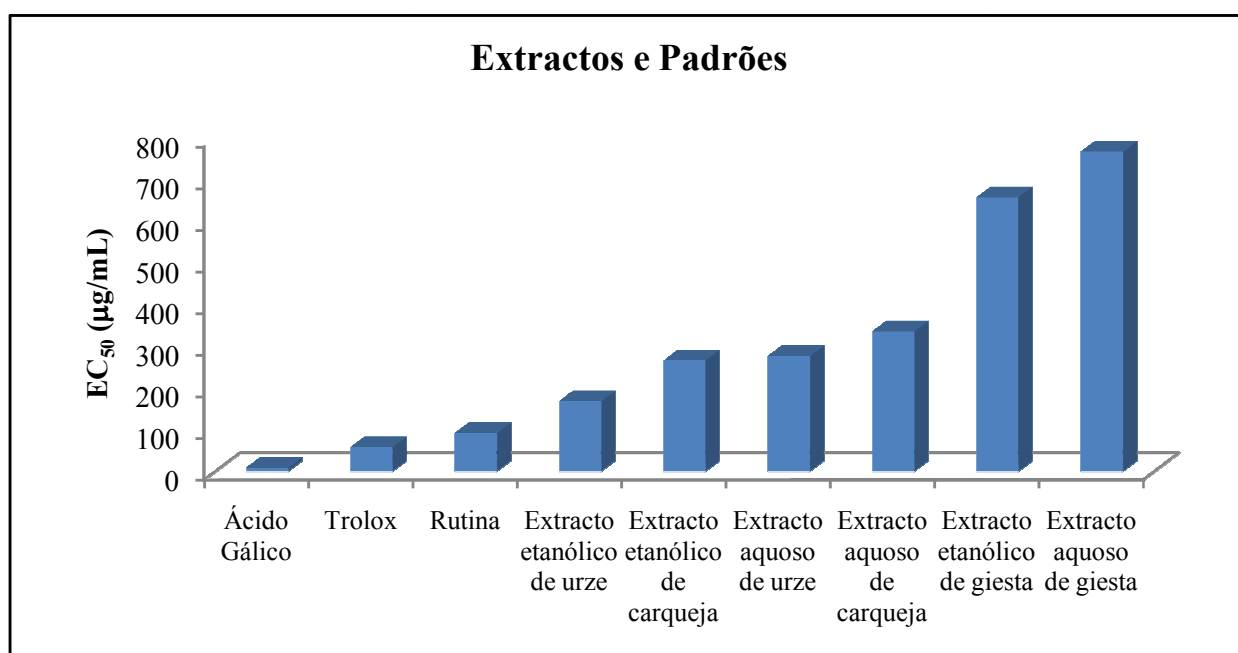
$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{168,596 \times 51,892} = 1,14 \times 10^{-4}$$

Para os restantes extractos e substâncias-padrão, os cálculos efectuam-se da mesma forma como demonstrado para o extracto etanólico de urze, e são apresentados na secção “Anexos”. De seguida, apresenta-se apenas o resumo de todas as determinações da actividade antioxidante segundo este método.

**Tabela 12:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $EC_{50}$ ,  $T_{EC50}$  e AE) dos extractos e dos padrões.

Extractos	Espécie	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$T_{EC50}$ (min)	AE
<i>Etanólicos</i>	<i>Urze</i>	168,596	51,892	$1,14 \times 10^{-4}$
	<i>Carqueja</i>	266,394	58,986	$6,36 \times 10^{-5}$
	<i>Giesta</i>	658,345	61,632	$2,46 \times 10^{-5}$
<i>Aquosos</i>	<i>Urze</i>	277,170	59,886	$6,02 \times 10^{-5}$
	<i>Carqueja</i>	335,982	63,471	$4,69 \times 10^{-5}$
	<i>Giesta</i>	768,270	39,632	$3,28 \times 10^{-5}$
<i>Rutina</i>		92,285	45,095	$2,40 \times 10^{-4}$
<i>Trolox</i>		57,925	15,632	$1,10 \times 10^{-3}$
<i>Ácido Gálico</i>		8,542	33,160	$3,53 \times 10^{-3}$

Verifica-se (Figura 29) que ambos os extractos de urze são os que apresentam uma menor  $EC_{50}$ , o que significa que são necessárias menores concentrações destes extractos para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 %, indicando que o consumo de DPPH pelos extractos de urze é maior e que este é o arbusto que apresenta a maior actividade antioxidante. Pelo contrário, os extractos de giesta são aqueles que têm os maiores valores de  $EC_{50}$ , o que revela que, no geral, este arbusto terá um actividade antioxidante pobre, uma vez que são necessárias maiores concentrações de extractos deste arbusto para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 %. Quanto aos extractos de carqueja, apresentam  $EC_{50}$  intermédias, sendo o arbusto com actividade antioxidante média.



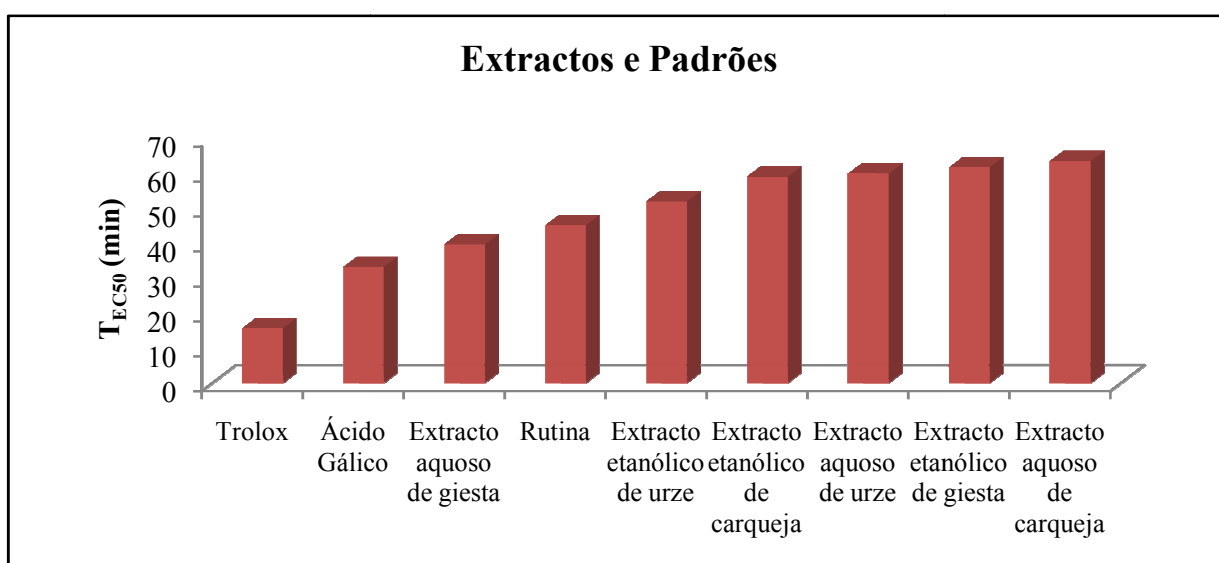
**Figura 29:** Resumo das concentrações eficientes ( $EC_{50}$  em µg/mL) dos extractos e dos padrões, em ordem crescente.

Conclui-se também (Figura 29) que os extractos aquosos têm maiores valores de  $EC_{50}$ , quando comparados com os extractos etanólicos da mesma espécie, indicando por isso que os extractos etanólicos apresentam, no geral, maiores actividades antioxidantes o que pode sugerir que o etanol é mais indicado para a extracção de substâncias com actividade antioxidante como os compostos fenólicos e os flavonóides.

Todos os extractos (Figura 30), à excepção do extracto aquoso de giesta, necessitam de mais de quarenta minutos para consumir DPPH suficiente, para que a concentração inicial deste decresça 50 %, o que indica que, apesar de os extractos

possuírem actividade antioxidante, é necessário algum tempo para que as substâncias com actividade antioxidante presentes nesses extractos actuem, sequestrando/quelando o radical livre DPPH. Relativamente ao extracto aquoso de giesta – aquele que apresenta menor  $T_{EC50}$ , apesar de ser o que tem maior  $EC_{50}$  – se por um lado é necessária uma grande concentração deste extracto para decrescer a concentração inicial de DPPH, o tempo necessário para que isso aconteça é o mais baixo, quando comparado com os restantes extractos. Isto pode dever-se ao facto das substâncias com actividade antioxidante deste extracto, estarem presentes em concentrações menores que nos outros, mas possuírem uma acção sequestradora de radicais livres mais eficaz.

O extracto etanólico de urze é aquele que possui a maior eficiência antirradicalar, sendo por isso, este extracto aquele que tem a maior actividade antioxidante, estando de acordo com o respectivo valor de concentração eficiente. Ambos os extractos de giesta revelam ter uma actividade antioxidante baixa, o que se comprova pelas suas eficiências antirradicalares. De um modo geral, os extractos etanólicos, possuem maiores eficiências antirradicalares (quando comparados com os extractos aquosos), o que está de acordo com o descrito anteriormente. Excepção do extracto aquoso de giesta, que por possuir um menor tempo eficiente, apresenta uma menor eficiência antirradicalar quando comparado com o extracto etanólico do mesmo arbusto que é o que tem o valor mais baixo para a eficiência antirradicalar, indicando que a sua capacidade para sequestrar os radicais livres é muito baixa.



**Figura 30:** Resumo dos tempos eficientes ( $T_{EC50}$  em minutos) dos extractos e dos padrões, em ordem crescente.

Quanto aos padrões, o ácido gálico é o padrão que tem a menor EC<sub>50</sub> (Figura 29), significando por isso que tem uma actividade antioxidante forte, quando comparada com a actividade antioxidante dos restantes padrões estudados e com os extractos. Pelo contrário, a rutina é o padrão do qual é necessária uma maior concentração para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 %. Relativamente aos tempos eficientes (Figura 30), o trolox é aquele que necessita de menos tempo para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 %, isto é, é dos padrões analisados o que tem o menor T<sub>EC50</sub>. A rutina, além de ter a maior concentração eficiente, tem também o maior tempo eficiente, significa que dos padrões é o que terá a menor eficiência antirradicalar e conseqüentemente a menor actividade antioxidante. De todos os padrões, o ácido gálico é o que possui a maior eficiência antirradicalar, o que significa que é a substância analisada com a maior actividade antioxidante, apesar de ter um tempo eficiente menor.

#### 4.2. Método do DPPH – Versão 2

Segundo este método de determinação da actividade antioxidante dos extractos, para determinar a concentração de amostra necessária para promover 50 % de percentagem de inibição (concentração inibitória - IC<sub>50</sub>), representou-se graficamente a % I em função da concentração de amostra na célula do espectrofotómetro. Após ajuste de uma recta a este gráfico, foi possível, através da equação da recta determinar a concentração à qual corresponde uma percentagem de inibição de 50. A actividade antioxidante, foi expressa através do Índice de Actividade Antioxidante (AAI), que é calculado da seguinte forma:

$$AAI = \frac{[DPPH \text{ no controlo aos } 90 \text{ minutos}](\mu\text{g/mL})}{IC_{50}} \times 100$$

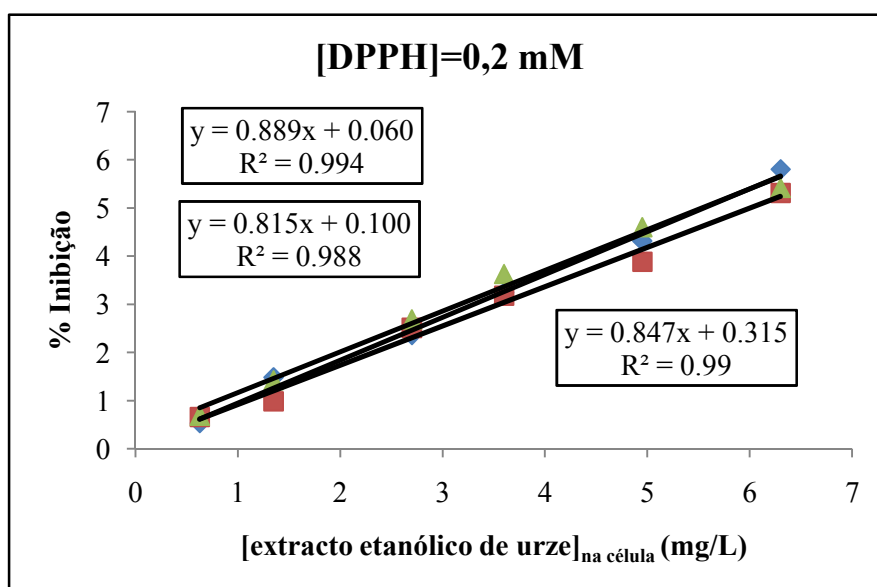
A concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos foi calculada utilizando a curva de calibração.

Com base no valor de AAI, é possível classificar uma amostra quanto à sua actividade antioxidante, assim [53]:

<b>AAI &lt; 0,5 Actividade Antioxidante Pobre</b>
<b>0,5 &lt; AAI &lt; 1,0 Actividade Antioxidante Moderada</b>
<b>1,0 &lt; AAI &lt; 2,0 Actividade Antioxidante Forte</b>
<b>AAI &gt; 2,0 Actividade Antioxidante Muito Forte</b>

Como o valor de AAI é calculado considerando a massa de DPPH e a massa de composto testado na reacção, este valor é uma constante para cada composto, independente da concentração de DPPH e da amostra utilizada [53].

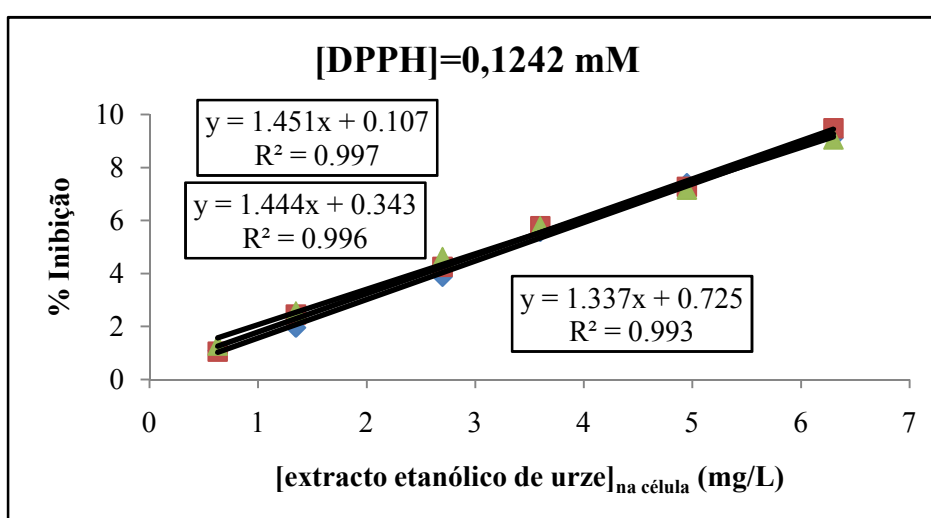
São de seguida apresentados os cálculos dos parâmetros da actividade antioxidante, segundo este método do DPPH, para o extracto etanólico de urze (Figuras 31, 32 e 33), que servirão de exemplo para os restantes extractos e padrões.



**Figura 31:** Extracto etanólico de urze, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 13:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de urze para  $[DPPH]=0,2$  mM.

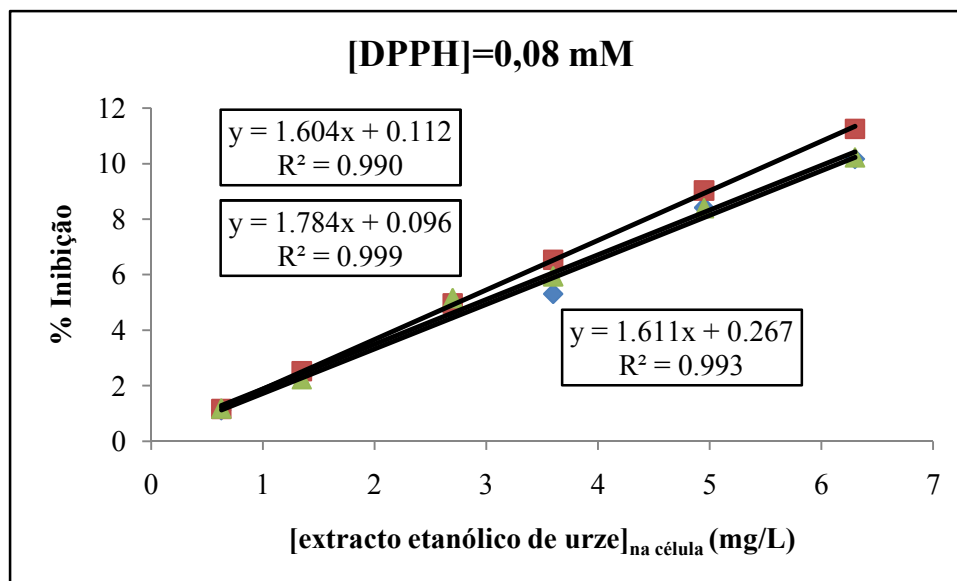
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
56,149	61,204	58,660	58,671 ± 2,527
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,494	1,371	1,432	1,432 ± 0,062



**Figura 32:** Extracto etanólico de urze, para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

**Tabela 14:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de urze para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
34,364	34,377	36,836	35,192 ± 1,423
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,407	1,412	1,318	1,379 ± 0,053



**Figura 33:** Extracto etanólico de urze, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 15:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de urze para [DPPH]=0,08 mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
31,084	27,960	30,861	29,969 ± 1,743
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,334	1,489	1,347	1,390 ± 0,086

**Tabela 16:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de urze.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade Antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	41,277 ± 1,898	FORTE
AAI	1,400 ± 0,067	

É necessária uma concentração de 41,277 mg/L de extracto etanólico de urze para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto etanólico de urze tem uma actividade antioxidante forte.

Para os restantes extractos e padrões as determinações são efectuadas de forma idêntica à apresentada para o extracto etanólico de urze e encontram-se na secção “Anexos”, de seguida são apenas apresentados os resultados finais dos parâmetros da actividade antioxidante.

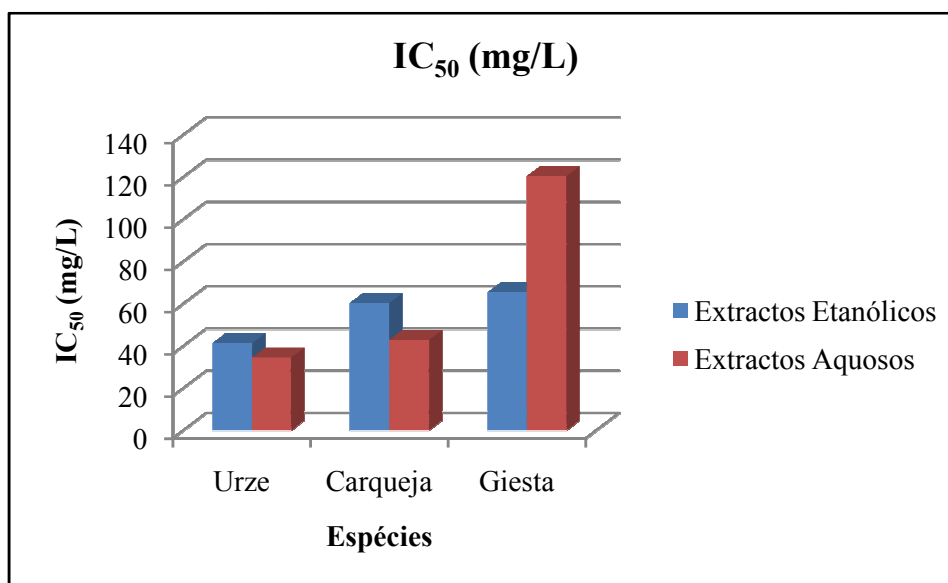
**Tabela 17:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) dos extractos e padrões.

<b>Extractos</b>	<b>Espécie</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/L) *</b>	<b>AAI *</b>	<b>Actividade antioxidante</b>
<b>Etanólicos</b>	<i>Urze</i>	41,277 ± 1,898	1,400 ± 0,067	FORTE
	<i>Carqueja</i>	60,388 ± 1,779	0,973 ± 0,025	MODERADA
	<i>Giesta</i>	65,425 ± 2,473	0,863 ± 0,027	MODERADA
<b>Aquosos</b>	<i>Urze</i>	34,533 ± 1,448	1,723 ± 0,077	FORTE
	<i>Carqueja</i>	42,965 ± 1,691	1,296 ± 0,047	FORTE
	<i>Giesta</i>	120,416 ± 5,334	0,452 ± 0,020	POBRE
<i>Rutina</i>		10,205 ± 0,580	5,463 ± 0,301	MUITO FORTE
<i>Trolox</i>		7,100 ± 0,083	7,183 ± 0,079	MUITO FORTE
<i>Ácido Gálico</i>		1,806 ± 0,020	30,723 ± 0,266	MUITO FORTE
<i>Quercetina</i>		4,796 ± 0,505	12,912 ± 1,443	MUITO FORTE

\* Média ± Desvio Padrão

De todos os extractos (Figura 34), aquele de que é necessária uma menor concentração para que se verifique 50 % de inibição, é o extracto aquoso de urze. Assim sendo, este extracto será aquele cuja actividade antioxidante será maior, o que se verifica também pelo valor do AAI (Figura 35), que é o maior de todos os extractos, e que permite classificar a actividade antioxidante deste extracto como forte. Pelo

contrário, o extracto aquoso de giesta é o que apresenta o maior valor de concentração inibitória, como concluído pelo primeiro método do DPPH.

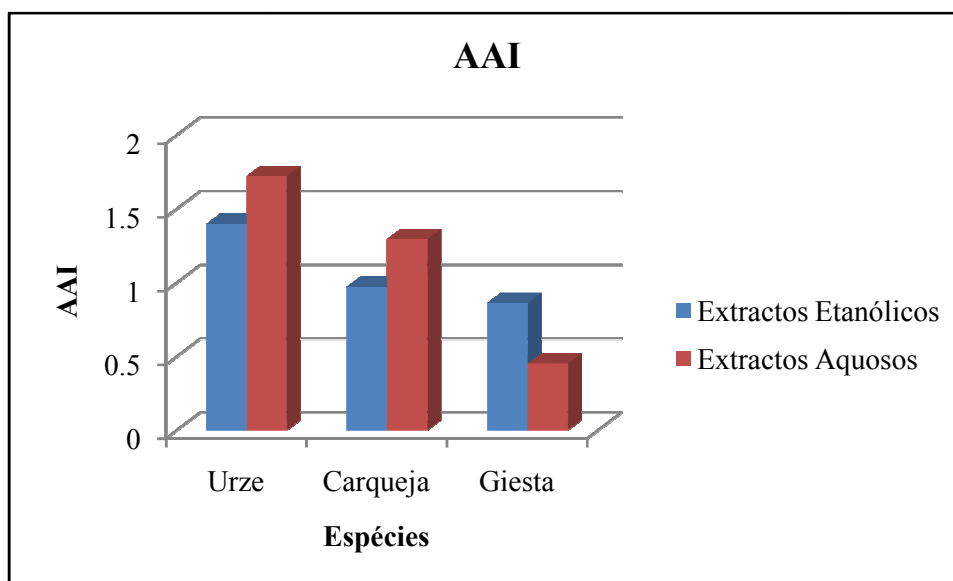


**Figura 34:** IC<sub>50</sub> (mg/L) dos extractos.

Ambos os extractos de giesta apresentam elevadas IC<sub>50</sub> (Figura 34), e por conseguinte, os menores valores de AAI (Figura 35), concluindo-se por isso que de todos os extractos estudados, os da giesta são aqueles cujas propriedades antioxidantes são menores. À excepção do caso da giesta, os extractos aquosos apresentam maiores valores de AAI do que os extractos etanólicos da mesma espécie.

Como comprovado pelo método do DPPH anterior, o ácido gálico é o que possui a menor concentração inibitória, querendo dizer que a concentração de ácido gálico necessária para promover 50 % de inibição é muito pequena o que se traduz no maior AAI e numa actividade antioxidante muito forte.

Ambos os métodos revelam que a actividade antioxidante dos extractos é inferior á actividade antioxidante das substâncias-padrão. Apesar de os extractos possuírem actividade antioxidante significativa, nomeadamente os extractos de urze, as suas eficiências antirradicalares e os seus índices de actividade antioxidante são menores do que os mesmos parâmetros dos padrões. Já os extractos de giesta, são aqueles cuja actividade antioxidante é menor.



**Figura 35:** AAI dos extractos.

**Tabela 18:** Índices de Actividade Antioxidante (AAI) e concentrações de compostos-padrão necessárias para promover 50 % de inibição, obtidos por Scherer e colaboradores [53].

Composto	AAI (Média)	IC <sub>50</sub> – µg/mL (Média)
Rutina	6,55	8,06
Quercetina	16,02	3,27
Ácido Gálico	26,62	1,95

Os resultados obtidos para os parâmetros da actividade antioxidante dos padrões, estão de acordo com os dados obtidos por Scherer e seus colaboradores [53] que implementaram este método do DPPH, indicando não só a reprodutibilidade do método, mas também a eficácia do mesmo.

No geral, ambos os métodos de determinação da actividade antioxidante utilizados, que se baseiam no consumo de DPPH pelas amostras, fornecem resultados semelhantes, isto é, indicam que os extractos de urze são os que possuem maiores actividades antioxidantes e os extractos de giesta as menores (principalmente os extractos aquosos), sendo os extractos de carqueja os que possuem actividade antioxidante intermédia.

### **4.3. Relação entre fenóis totais, flavonóides totais e actividade antioxidante**

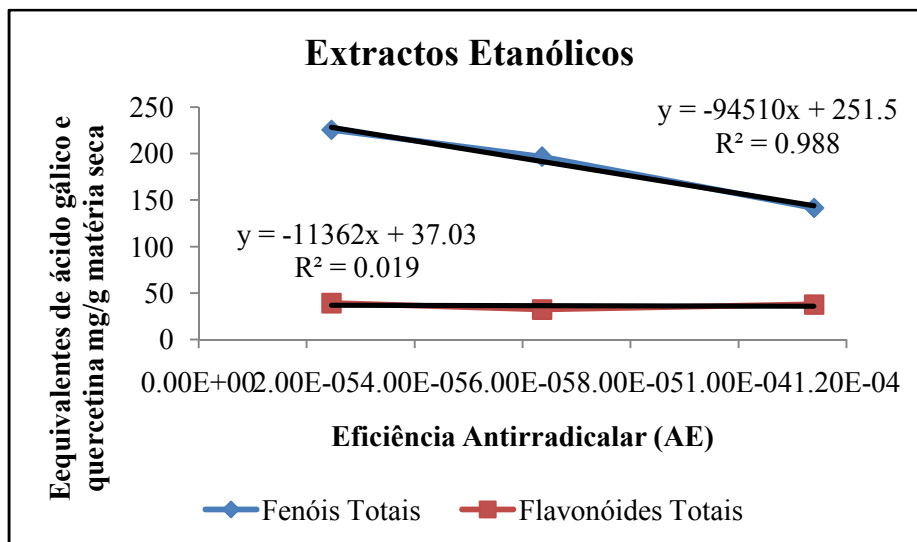
Como verificado anteriormente [19,40-44], existe uma correlação linear entre compostos fenólicos totais presentes num extracto vegetal e a sua actividade antioxidante, indicando que os compostos fenólicos são responsáveis pela actividade antirradicalar de um extracto vegetal.

Por outro lado, estudos anteriores sugerem uma relação menos evidente ou ausência de relação entre os flavonóides e a actividade antioxidante de extractos de plantas [19,40-44]. De salientar que a estrutura química dos flavonóides, particularmente a posição do grupo hidroxilo na molécula, determina as propriedades antioxidantes das amostras, que no geral, se referem à habilidade de doação de átomos de hidrogénio e/ou de electrões aos radicais livres [43].

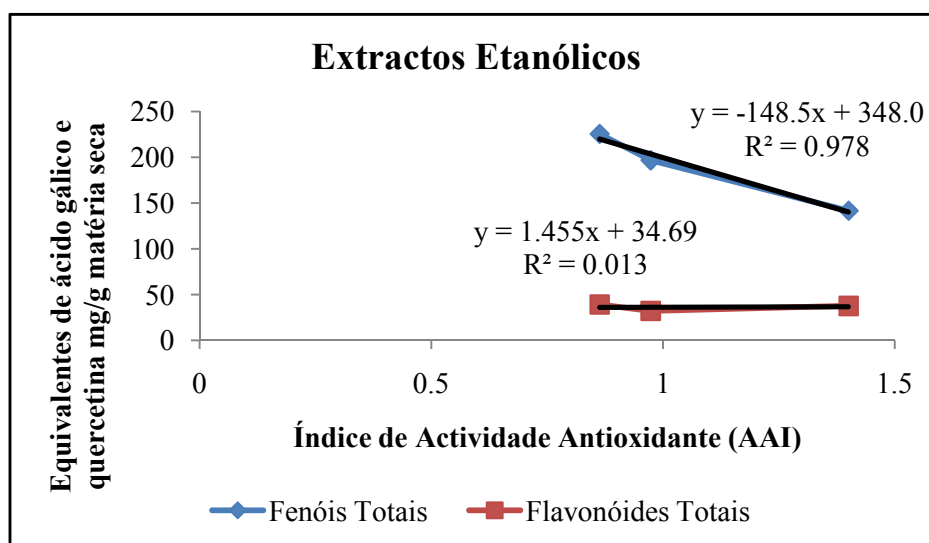
#### **4.3.1. Extractos etanólicos**

Verifica-se um nível bastante elevado de correlação linear positiva entre os fenóis totais e a eficiência antirradicalar ( $R^2=0,9887$ ) e os fenóis totais e o índice de actividade antioxidante ( $R^2=0,9781$ ) dos extractos etanólicos (Figuras 36 e 37).

No caso dos flavonóides, essa correlação não se verifica ( $R^2=0,0197$  e  $0,013$ ) (Figuras 36 e 37), concluindo-se por isso, que a actividade antioxidante dos extractos, nomeadamente a capacidade de estes sequestrarem radicais livres, está directamente relacionada com a existência de compostos fenólicos, mas que não têm que ser precisamente flavonóides.



**Figura 36:** Relação entre a eficiência antirradicalar e os fenóis totais e a eficiência antirradicalar e os flavonóides totais, dos extractos etanólicos.

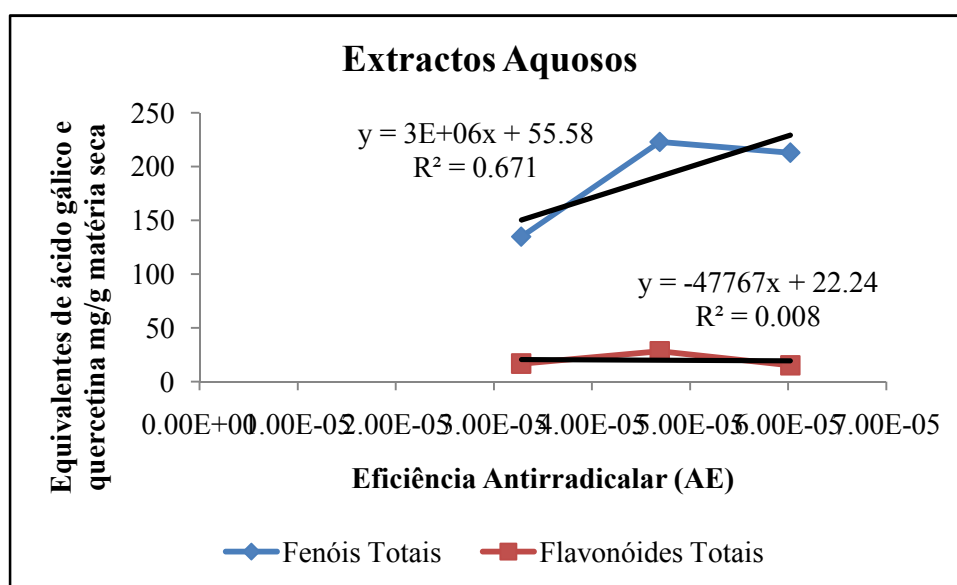


**Figura 37:** Relação entre o índice de actividade antioxidante e os fenóis totais e o índice de actividade antioxidante e os flavonóides totais, dos extractos etanólicos.

Conclui-se portanto, que os compostos fenólicos presentes nos extractos etanólicos, devido à sua capacidade redutora, contribuem significativamente para a capacidade dos extractos sequestrarem os radicais livres, contribuindo deste modo para a sua actividade antioxidante ou antirradicalar.

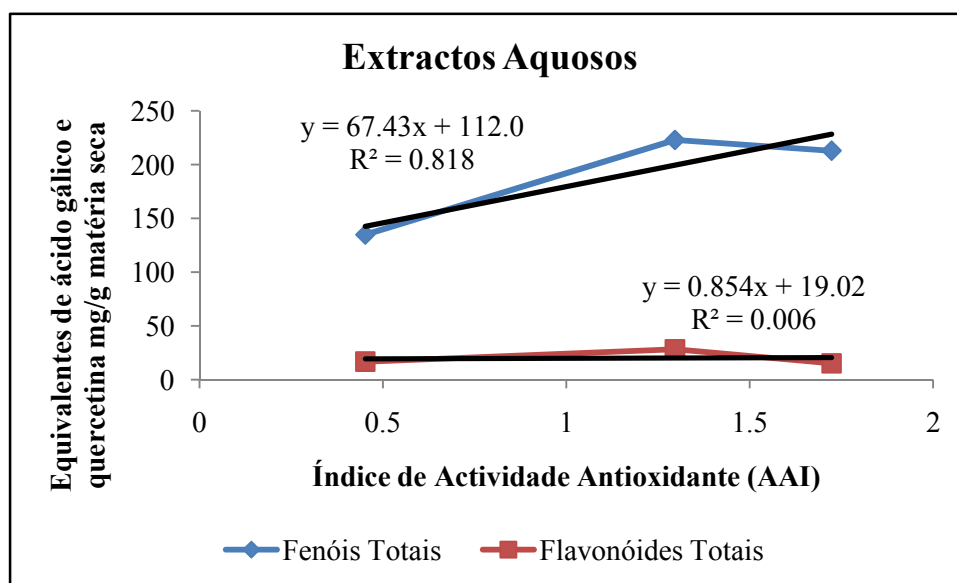
#### 4.3.2. Extractos aquosos

Nos extractos aquosos (Figuras 38 e 39) a correlação linear entre fenóis totais e eficiência antirradicalar ( $R^2=0,6715$ ) e fenóis totais e índice de actividade antioxidante ( $R^2=0,8186$ ) não é tão significativa como nos extractos etanólicos. Contudo, os compostos fenólicos dos extractos aquosos também estão directamente associados à sua acção antioxidante, o que pode indicar que a água pode extrair outros compostos fenólicos que não têm actividade antioxidante ou antirradicalar.



**Figura 38:** Relação entre a eficiência antirradicalar e os flavonóides totais e a eficiência antirradicalar e os flavonóides totais, dos extractos aquosos.

No caso dos flavonóides, sucede o mesmo que nos extractos etanólicos, isto é, não se verifica correlação linear entre os flavonóides totais e a actividade antioxidante dos extractos, indicando assim que o conteúdo de flavonóides nos extractos não influencia de forma directa a sua actividade antioxidante.



**Figura 39:** Relação entre o índice de actividade antioxidante e os flavonóides totais e o índice de actividade antioxidante e os flavonóides totais, dos extractos aquosos.

#### 4.4. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

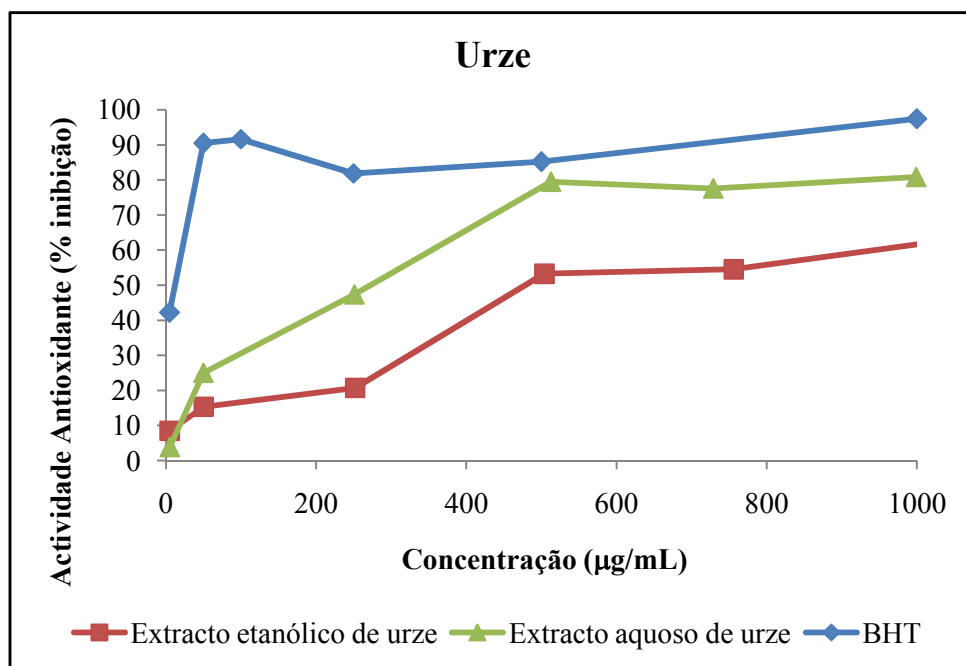
O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, que consiste na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, estima a habilidade relativa de compostos antioxidantes presentes em extractos de plantas de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ), que oxida o  $\beta$ -caroteno presente na emulsão. Este método permite uma medição indirecta da inibição da peroxidação lipídica.

É possível comparar as percentagens de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno dos extractos (a várias concentrações) com a percentagem de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno do antioxidante sintético BHT. Os resultados permitem concluir que todos os extractos, à excepção do extracto aquoso de giesta, possuem actividade antioxidante inferior ao BHT.

Para uma melhor análise e comparação das actividades antioxidantes dos extractos relativamente ao BHT, constroem-se os gráficos das Figuras 40 a 44, nos quais se separam por extractos e por arbustos as percentagens de inibição de oxidação do  $\beta$ -caroteno.

#### 4.4.1. Extractos de urze

Relativamente aos extractos de urze, como se pode observar no gráfico da Figura 40, verifica-se que o extracto aquoso é aquele que possui a maior capacidade de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico, inibindo assim a oxidação do  $\beta$ -caroteno, estando de acordo com as determinações do Método 2 do DPPH, que indica que o extracto aquoso de urze possui um elevado índice de actividade antioxidante.



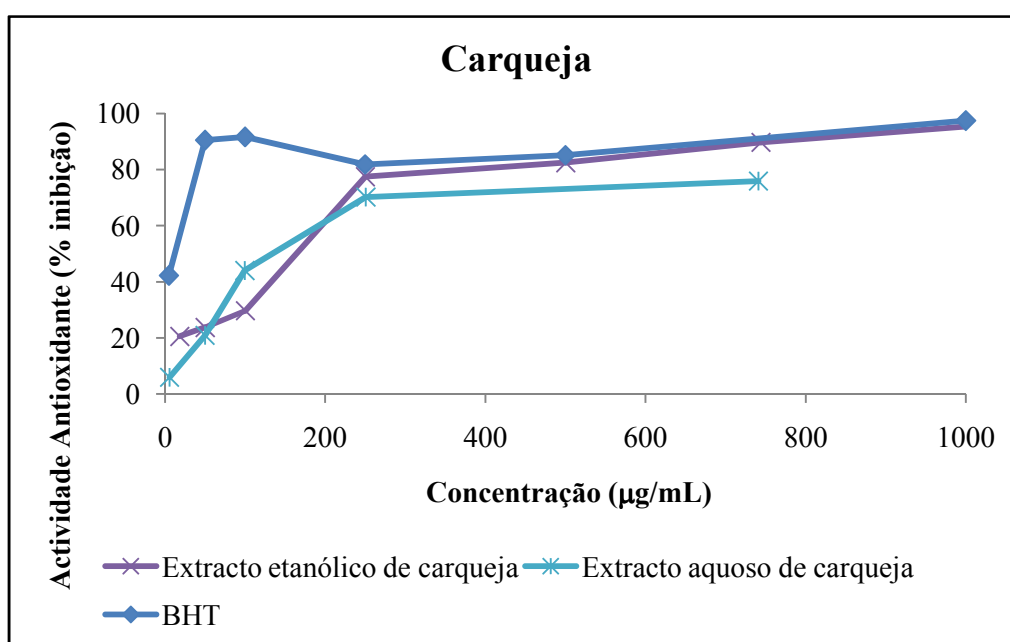
**Figura 40:** Actividade antioxidante dos extractos de urze e do padrão BHT.

Pelos métodos de determinação antioxidante anteriormente utilizados, baseados na metodologia do DPPH, sabe-se que ambos os extractos de urze possuem actividades antioxidantes significativas. O extracto etanólico de urze é aquele cuja eficiência antirradicalar é maior e o extracto aquoso de urze é o que possui maior índice de actividade antioxidante. Conclui-se portanto que todos os resultados estão coerentes no que diz respeito à actividade antioxidante dos extractos de urze.

#### 4.4.2. Extractos de carqueja

Os extractos de carqueja apresentam elevadas percentagens de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno, principalmente o extracto etanólico (Figura 41).

Pelas determinações anteriores, baseadas na sequestração do radical livre DPPH, os extractos de carqueja eram aqueles que tinham uma actividade antioxidante intermédia, quando comparados com os extractos de urze – maior actividade antioxidante – e com os extractos de giesta – mais fracas.

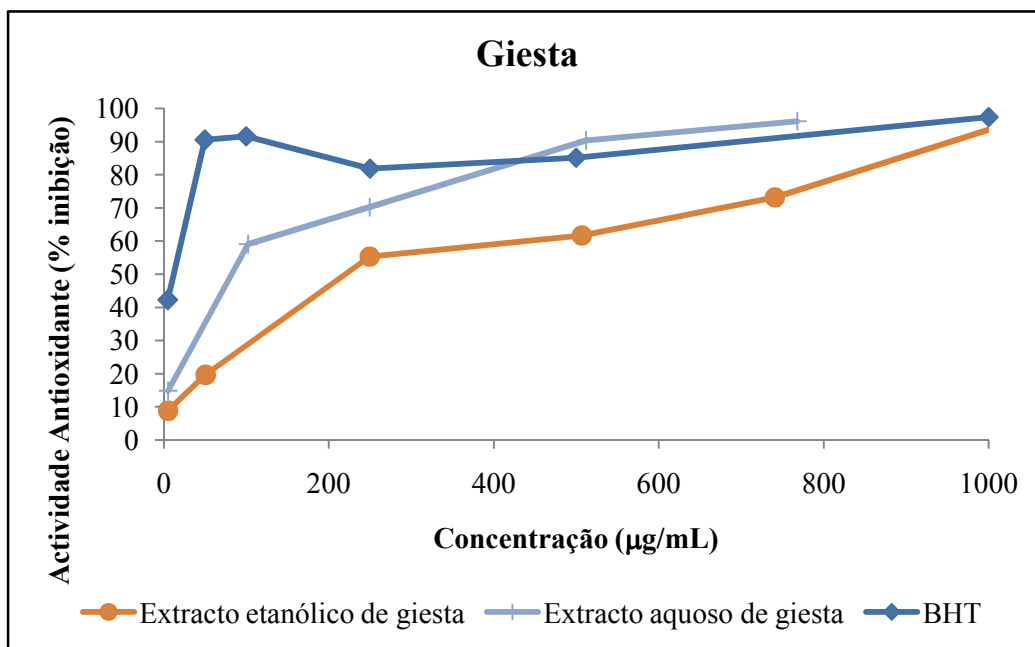


**Figura 41:** Actividade antioxidante dos extractos de carqueja e do padrão BHT.

Segundo este método, os extractos de carqueja demonstram actividade antioxidante significativa. Estes resultados, aparentemente contraditórios, apenas indicam que os extractos de carqueja não têm grande habilidade para a sequestração de radicais livres, como o DPPH, mas possuem uma elevada capacidade de inibição da oxidação lipídica (ácido linoleico) e de sequestração dos radicais resultantes da sua eventual oxidação, o que demonstra a importância da utilização de diferentes métodos na determinação da actividade antioxidante das amostras em estudo.

#### 4.4.3. Extractos de giesta

De todos os extractos, o extracto aquoso de giesta é aquele cujas percentagens de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno são maiores, indicando a elevada acção antioxidante deste extracto (Figura 43).

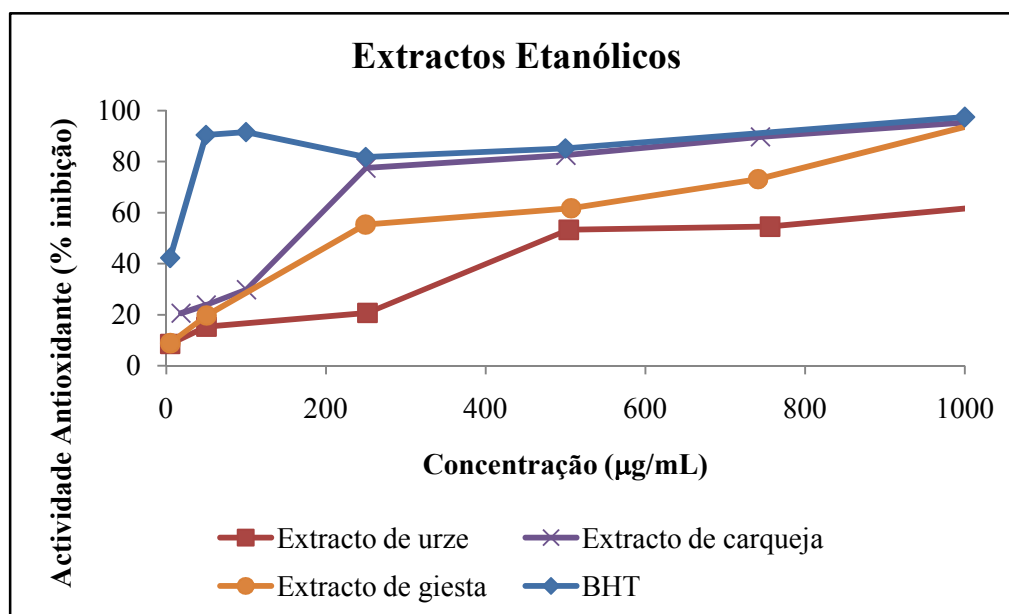


**Figura 42:** Atividade antioxidante dos extractos de giesta e do padrão BHT.

Mais uma vez, este resultado está em contradição com as determinações anteriores que indicavam o extracto aquoso de giesta como sendo aquele cujas concentrações eficiente e inibitória são maiores – baixa atividade antioxidante - índice de atividade antioxidante menor, apesar de ser o extracto que necessita de menor tempo para reduzir a concentração inicial de DPPH 50 %. Isto significa que este extracto tem pouca capacidade em sequestrar os radicais livres, como o DPPH, mas possui elevada capacidade em inibir a peroxidação lipídica. De referir ainda que, o extracto aquoso de giesta possui propriedades antioxidantes maiores do que o padrão BHT, mas apenas para concentrações muito elevadas. Deste modo conclui-se que são extraídos compostos com diferentes tipos de atividade antioxidante.

#### 4.4.4. Extractos etanólicos

Como já foi referido anteriormente, os processos de extracção de antioxidantes, especialmente carotenóides, a partir de vegetais usando etanol como solvente, são mais eficientes do que usando a água [41].

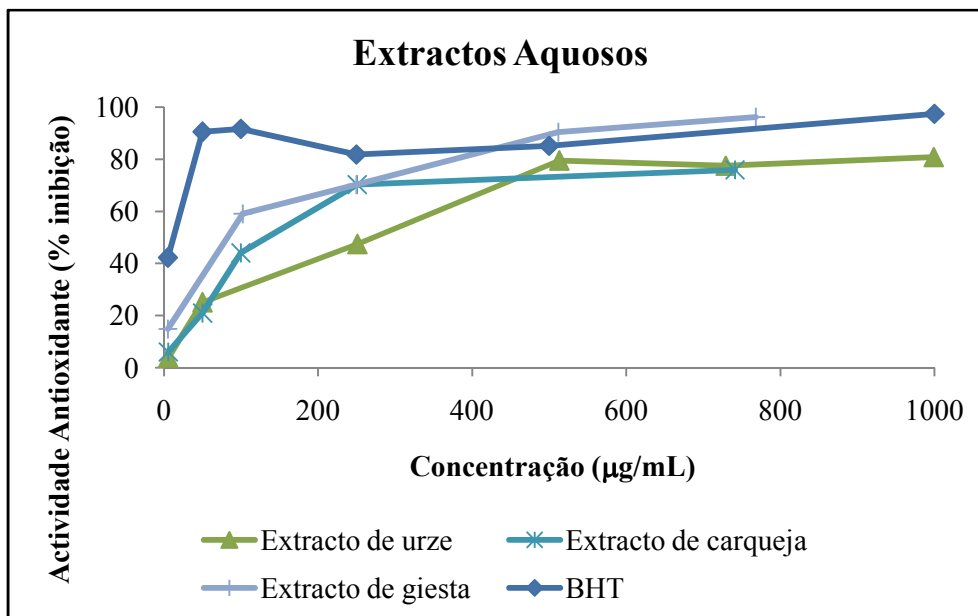


**Figura 43:** Actividade antioxidante dos extractos etanólicos e do padrão BHT.

O extracto etanólico que possui maiores percentagens de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno é o extracto de carqueja seguido do extracto de giesta e do extracto de urze, que é aquele que tem menor actividade antioxidante, segundo este método (Figura 43).

#### 4.4.5. Extractos aquosos

Dos extractos aquosos, destaca-se o extracto de giesta, cujas percentagens de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno são maiores, seguido dos extractos de carqueja e de urze, que possuem menores actividade antioxidantes (Figura 44).



**Figura 44:** Atividade antioxidante dos extractos aquosos e do padrão BHT.

## 5. Actividade anti-microbiana

Como referido anteriormente, nos últimos anos tem surgido um interesse na procura de novas substâncias, normalmente de origem vegetal, que possuam actividade anti-microbiana, no sentido de substituir os agentes anti-microbianos sintéticos usualmente utilizados na indústria alimentar na preservação dos alimentos. Por outro lado estas novas substâncias anti-microbianas poderiam ser usadas como alternativa à terapêutica tradicional, e assim serem uma solução para o problema da resistência aos antibióticos, de grande número de estirpes que são hoje encontradas ao nível hospitalar. Neste sentido, os compostos fenólicos têm recebido particular atenção, pois sabe-se que estes, além de estarem directamente relacionados com a actividade antioxidante, podem também exercer actividade anti-microbiana. Os flavonóides, nomeadamente, ao estarem localizados nas folhas de certas plantas, têm como função a protecção dessas plantas contra agentes microbianos patogénicos, por isso, estes compostos têm sido estudados quanto à sua eventual actividade anti-bacteriana e anti-fúngica contra microrganismos patogénicos para humanos [43,44,47].

Outro grande grupo de compostos, presentes maioritariamente nas flores das plantas, que tem recebido destaque pelas suas propriedades anti-microbianas, são os taninos,

alguns dos quais são actualmente utilizados como alternativa aos antibióticos convencionais [6,16].

### 5.1. Difusão em disco

Uma forma de avaliar a susceptibilidade de um microrganismo a uma determinada substância, consiste na medida dos halos de inibição. São apresentados na Tabela 19, os diâmetros dos halos de inibição dos extractos etanólicos de urze, carqueja e giesta e dos extractos aquosos de carqueja e giesta, para as estirpes de leveduras. Na Tabela 20, encontram-se registados os diâmetros dos halos de inibição dos mesmos extractos, para as bactérias.

De acordo com as normas M2-A8 e CSLI M44A, apenas são considerados os halos de inibição com diâmetro superior a 6 mm (assinalados na Tabela 20 a negrito), uma vez que o diâmetro dos discos utilizados também é de 6 mm.

**Tabela 19:** Diâmetros (mm) dos halos de inibição dos extractos e dos controlos para as estirpes de leveduras (Média ± Desvio Padrão).

Leveduras / Estirpes	Extractos (2mg/disco)				
	Etanólico de Urze	Etanólico de Carqueja	Aquoso de Carqueja	Etanólico de Giesta	Aquoso de Giesta
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
Leveduras / Estirpes	DMSO	Anfotericina B (25 µg/disco)			
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	6,000 ± 0,000	22,333 ± 0,577			
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	6,000 ± 0,000	20,333 ± 0,577			
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	6,000 ± 0,000	21,500 ± 0,577			

Como para a determinação da actividade anti-microbiana, os extractos foram dissolvidos em DMSO (com excepção do extracto aquoso de urze que se mostrou insolúvel neste solvente), fez-se um controlo no qual o disco era impregnado com 10 µL de DMSO. Através dos resultados apresentados, é possível concluir que o DMSO não inibe o crescimento dos microrganismos em estudo, significando que os halos de inibição que se conseguem são exclusivamente devidos aos compostos presentes nos extractos.

Como controlo positivo, utilizou-se a tetraciclina, no caso das bactérias, pois este antibiótico inibe a síntese proteica ao nível da subunidade 30 S dos ribossomas, impedindo estericamente a ligação codão-anticodão. Para as leveduras, o antibiótico utilizado como controlo foi a anfotericina B. Produzida por *Sterptomyces nodosus*, é o único polieno com administração por via endovenosa. Este heptaeno, apresenta um espectro de acção bastante alargado sendo activo contra fungos leveduriformes, dimorfos e diferentes géneros de fungos filamentosos [46]. Verifica-se que os halos de inibição produzidos pelos extractos em estudo são inferiores aos halos de inibição provocados pelos antibióticos utilizados como controlo

Pode concluir-se pela análise da Tabela 20 que a actividade anti-bacteriana dos extractos é maioritariamente exercida em bactérias Gram positivas. Quanto às bactérias Gram negativas apenas se verifica actividade anti-bacteriana na estirpe de *K. pneumoniae*. A actividade anti-bacteriana dos extractos etanólicos é superior à dos extractos aquosos, uma vez que os diâmetros dos halos de inibição são superiores no caso dos extractos etanólicos. Conclui-se também que os extractos não possuem actividade anti-fúngica, pois não inibem o crescimento das leveduras.

É possível verificar que os diâmetros dos halos de inibição obtidos, são muito inferiores aos normalmente encontrados na bibliografia. Por exemplo, Shan e colaboradores [47], estudaram a actividade anti-bacteriana de extractos metanólicos de *P. cuspidatum*, obtendo para diâmetros de halos de inibição valores superiores a 16 mm, usando discos de diâmetro igual a 6 mm. Kosalec e colaboradores [67] elaboraram um estudo sobre a actividade anti-bacteriana de própolis (substância resinosa obtida pelas abelhas através da colecta de resinas da flora de uma região, e alteradas pela acção das enzimas contidas na sua saliva), obtendo diâmetros de halos de inibição para *S. aureus* ATCC 25923 superiores a 10 mm, para *E. faecalis* ATCC 29212 superiores a 8 mm e para estirpes de *C. albicans* superiores a 10 mm.

**Tabela 20:** Diâmetros (mm) dos halos de inibição dos extractos e dos controlos para as estirpes bacterianas (Média ± Desvio Padrão).

		Extractos (2 mg/disco)				
Bactérias	Estirpes	Etanólico de Urze	Etanólico de Carqueja	Aquoso de Carqueja	Etanólico de Giesta	Aquoso de Giesta
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,250 ± 0,957	10,167 ± 1,169	6,000 ± 0,000	8,500 ± 1,000	7,333 ± 0,577
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	6,667 ± 0,577	8,667 ± 0,577	6,000 ± 0,000	10,000 ± 0,000	8,667 ± 0,577
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6,000 ± 0,000	6,250 ± 0,500	6,000 ± 0,000	6,250 ± 0,500	6,000 ± 0,000
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	6,000 ± 0,000	6,750 ± 0,957	7,333 ± 0,577	6,500 ± 0,577	6,667 ± 0,577
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000	6,000 ± 0,000
Bactérias	Estirpes	DMSO	Tetraciclina (30 µg/disco)			
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,000 ± 0,000	30,250 ± 0,500			
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	6,000 ± 0,000	30,000 ± 0,816			
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6,000 ± 0,000	10,375 ± 1,109			
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,000 ± 0,000	23,250 ± 0,500			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	6,000 ± 0,000	22,250 ± 0,500			
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	6,000 ± 0,000	21,833 ± 0,289			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,000 ± 0,000	11,500 ± 0,577			

ATCC – “American Type Culture Collection”

No caso do estudo da actividade anti-microbiana de diferentes infusões da planta do chá desenvolvido por Almajano e colaboradores [68], são obtidos valores de diâmetros de halos de inibição semelhantes aos obtidos nos extractos etanólicos de urze, carqueja e giesta e extractos aquosos de carqueja e giesta.

Como os extractos não apresentaram actividade anti-fúngica, não foram determinados os correspondentes valores de MIC para leveduras.

## 5.2. Diluição em agar

O método de diluição em agar permitiu a determinação dos valores de MIC (mg/mL) dos extractos para as diferentes estirpes bacterianas. Estão registados na Tabela 21 os valores das concentrações mínimas inibitórias dos extractos.

Verifica-se que os extractos aquosos possuem valores de MIC muito elevados, indicando que é necessária uma grande concentração destes extractos para inibir o crescimento visível das bactérias, logo estes extractos apresentam uma baixa actividade anti-bacteriana. Uma possível razão pela qual os extractos aquosos possuem valores de MIC muito elevados prende-se pelo facto de a água não ser um bom solvente para a extracção de compostos com actividade anti-microbiana.

Relativamente aos extractos etanólicos, o extracto de giesta precipita quando misturado com o meio MHA, o que dificulta a determinação do valor de MIC, pois os compostos com eventual actividade anti-bacteriana podem ficar sequestrados no precipitado e desta forma não inibem o crescimento das bactérias. Quanto ao extracto etanólico de urze, o valor de MIC para as estirpes de *S. aureus* e de *B. cereus* é de 2,5 mg/mL, valores muito superiores aos obtidos por Shan e colaboradores [47] no estudo da actividade anti-bacteriana de extractos metanólicos de *P. cuspidatum*, que são da ordem das µg/mL.

O extracto etanólico de carqueja também apresenta actividade anti-microbiana assinalável para as estirpes de *S. aureus*, *B. cereus*, *K. pneumoniae* e para uma das estirpes de *S. aureus* resistente à meticilina, ainda assim são valores superiores aos encontrados na literatura, nomeadamente aos obtidos por Shan e colaboradores [47].

**Tabela 21:** Concentrações Mínimas Inibitórias dos extractos.

Bactérias	Estirpes	Extractos – MIC (mg/mL)				
		Etanólico de Urze	Etanólico de Carqueja	Aquoso de Carqueja	Etanólico de Giesta *	Aquoso de Giesta
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5	1,25	10	1,875 ± 0,884	10
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	2,5	1,25	10	0,938 ± 0,412	5
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 2,5	> 2,5	> 20	> 2,5	20
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 2,5	> 2,5	> 20	2,5	> 20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	> 2,5	2,5	2,5	> 2,5	5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	> 2,5	> 2,5	20	> 2,5	20
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 2,5	> 2,5	10	> 2,5	20
Resistentes à Meticilina	<i>S. aureus</i> (MRSA – 10/08)	> 2,5	2,5	5	1,875 ± 0,884	5
	<i>S. aureus</i> (MRSA – 12/08)	> 2,5	> 2,5	> 20	> 2,5	20

ATCC – “American Type Culture Collection”

\* Este extracto precipita após a adição do meio MHA (MIC em Média ± Desvio Padrão).

Como os extractos aquosos possuem valores de MIC muito elevados e o extracto etanólico de giesta precipita durante o procedimento experimental dificultando assim o estudo da sua potencial actividade anti-microbiana, os extractos etanólicos de urze e de carqueja foram fraccionados por cromatografia em coluna tendo-se obtido várias fracções que foram estudadas quanto à actividade anti-bacteriana, determinando os valores de MIC pelo método de diluição em agar. As Tabelas 22 e 23 mostram os valores de MIC para as fracções dos extractos etanólicos de urze e de carqueja, respectivamente.

As fracções do extracto etanólico de urze têm valores de MIC semelhantes ao valor de MIC do extracto bruto, e encontram-se entre 1,25 e 2,5 mg/mL. As estirpes de *S. aureus* e de *B. cereus* mostraram ser as estirpes mais sensíveis às fracções deste extracto. De referir que também as estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina são sensíveis a algumas fracções deste extracto, nomeadamente às fracções D e E. Pode concluir-se que estirpes de *S. aureus* e de *B. cereus*, ambas bactérias Gram positivas, são as mais sensíveis às fracções do extracto etanólico de carqueja. A maioria das fracções deste extracto possui valor de MIC superior a 2,5 mg/mL.

Como referido anteriormente, também as fracções dos extractos etanólicos de urze e de carqueja possuem valores de MIC muito superiores aos obtidos por outros grupos de investigação, nomeadamente por Shan e seus colaboradores [47] no seu estudo dos extractos metanólicos de *P. cuspidatum*.

Verifica-se que tanto os extractos etanólicos e aquosos brutos, como as fracções dos extractos etanólicos de urze e de carqueja, possuem actividade anti-microbiana reduzida, o que se traduz pelas pequenas dimensões dos halos de inibição produzidos por estes extractos assim como pelos elevados valores de MIC dos extractos brutos e respectivas fracções. Uma vez que os compostos com actividade anti-microbiana estão maioritariamente localizados nas flores, e alguns nas folhas, seria necessário obter diversos extractos dessas partes dos arbustos de forma a estudar a sua actividade anti-microbiana.

**Tabela 22:** Concentrações Mínimas Inibitórias das fracções do extracto etanólico de urze.

		Fracções do Extracto Etanólico de Urze – MIC (mg/mL)													
Bactérias	Estirpes	A	B	C *	D *	E *	F *	G *	H	I	J *	L *	M	N	O
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	>2,5	>2,5	2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	2,5	2,5	2,5	>2,5	>2,5	1,25	1,25	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>2,5	2,5	2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
Resistentes à Meticilina	<i>S. aureus</i> (MRSA – 10/08)	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>S. aureus</i> (MRSA – 12/08)	>2,5	>2,5	>2,5	2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5

ATCC – “American Type Culture Collection”

\* Estas fracções precipitam após adição do meio MHA.

**Tabela 23:** Concentrações Mínimas Inibitórias das fracções do extracto etanólico de carqueja.

		Fracções do Extracto Etanólico de Carqueja – MIC (mg/mL)													
Bactérias	Estirpes	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	>2,5	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	1,25	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
Gram Negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
Resistentes à Meticilina	<i>S. aureus</i> (MRSA – 10/08)	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
	<i>S. aureus</i> (MRSA – 12/08)	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5

ATCC – “American Type Culture Collection”

## IV. Conclusões Gerais

## CONCLUSÕES GERAIS

---

Existe actualmente um elevado interesse na descoberta de novos compostos com actividade antioxidante e anti-microbiana. Os compostos de natureza antioxidante podem ser utilizados na medicina, no tratamento de patologias, como o cancro e as doenças neurodegenerativas, que estão relacionadas com o stresse oxidativo nos humanos, em alternativa à terapêutica habitual. Por outro lado, podem ser utilizados pela indústria alimentar, na confecção de alimentos funcionais ou como substitutos dos antioxidantes sintéticos, normalmente utilizados, que se podem acumular nas células e terem efeitos tóxicos a longo prazo. Quanto aos agentes anti-microbianos, podem da mesma forma, ser utilizados no tratamento de infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais e por outro lado na indústria alimentar na protecção dos alimentos contra a deterioração provocada pelos microrganismos a fim de evitar o número crescente de intoxicações alimentares.

Estes novos compostos bioactivos podem ser obtidos a partir de um grande número de produtos naturais, nomeadamente plantas, vegetais, frutas e legumes, entre outros. De entre o vasto conjunto de constituintes activos das plantas, os fenóis e de um modo particular os flavonóides têm sido amplamente estudados quanto às suas propriedades antioxidantes e de sequestração de radicais livres, assim como na inibição da peroxidação lipídica. Têm também sido referidas as propriedades anti-microbianas destes compostos, particularmente dos flavonóides, pois estes exercem nas plantas acção protectora contra microrganismos patogénicos.

Como existem inúmeras plantas consideradas “medicinais” usadas ao longo dos tempos pelas populações, sob a forma de infusões, decocções, cataplasmas e outras preparações, para o tratamento de várias patologias, têm surgido vários estudos científicos que pretendem determinar quais os compostos presentes nas plantas responsáveis pelas actividades antioxidante e anti-microbiana. Além disso, diversas formas de extracção, assim como, diferentes solventes, são estudados no sentido de determinar quais as condições ideais de extracção destes novos compostos funcionais.

Com este trabalho pretendia-se avaliar as eventuais actividades antioxidante e anti-microbiana de extractos de plantas que são usualmente utilizadas, nesta região, no

tratamento de algumas doenças ou apenas como tratamento sintomático das mesmas. Nomeadamente, a urze tem sido amplamente usada no tratamento das infecções urinárias, a carqueja tem sido utilizada pelos diabéticos e a giesta tem sido empregue devido às suas propriedades antioxidante assim como devido ao efeito vasoconstritor e hipertensor por ela provocado. Como na zona da Beira Baixa, de um modo particular na Serra da Estrela, existem em grande quantidade, estas três espécies de arbustos que crescem espontaneamente, e como os resíduos resultantes das podas frequentes não são valorizados, a não ser pelas centrais de biomassa, este trabalho pretendia acrescentar valor a um conjunto de material biológico que à partida não tinha qualquer utilização posterior. Neste sentido, e para comprovar a eficiência das preparações destas ervas que são tradicionalmente administradas, fizeram-se extractos aquosos, sob a forma de decocção, dos arbustos. Fez-se também outra extracção com etanol, solvente orgânico amplamente utilizado para a extracção de antioxidantes de materiais vegetais, para assim se poderem comparar as propriedades antioxidantes e anti-microbianas com os extractos aquosos.

Além de se terem determinado as actividades antioxidante e anti-microbiana dos extractos, determinaram-se os fenóis neles presentes, pois estes compostos estão em muitos casos directamente relacionados com as propriedades antioxidantes de diversas amostras biológicas e a sua actividade anti-microbiana tem também sido referida, e os flavonóides por serem um grupo de compostos que, pela sua estrutura química, possuem propriedades de sequestração de radicais livres e assim contribuírem para a actividade antioxidante.

Para a determinação dos fenóis totais presentes nos extractos, utilizou-se o método colorimétrico baseado na reacção destes compostos com o reagente de Folin-Ciocalteu, um método aceite e utilizado nesta determinação. Verifica-se que o extracto que apresenta uma maior concentração em fenóis totais é o extracto etanólico de giesta e, pelo contrário, aquele que apresenta uma menor concentração em fenóis totais é o extracto aquoso de giesta. A análise dos resultados sugere que o solvente não influencia de forma significativa a extracção dos fenóis.

No caso dos flavonóides, utilizou-se o método da precipitação destes compostos com o cloreto de alumínio. Neste caso, conclui-se que o etanol extrai mais flavonóides

que a água, o que mostra que o etanol é o solvente preferível para a extracção de flavonóides de amostras vegetais.

Para a determinação da actividade antioxidante dos extractos, foram utilizados três métodos distintos, dois dos quais baseados no DPPH e o terceiro método baseado na inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. Conclui-se que todos os extractos apresentam actividade antioxidante significativa. Demonstra-se também a importância da utilização de vários métodos na determinação da actividade antioxidante dos extractos, assim são medidas diferentes propriedades antioxidantes da mesma amostra, nomeadamente a sequestração de radicais livres (DPPH) e a inibição da peroxidação lipídica ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico), pois um mesmo extracto pode conter compostos com diferentes modos de acção da sua actividade antioxidante. A utilização de diferentes solventes na extracção, com polaridades distintas, é também importante, só assim se garante a extracção de vários compostos com variadas propriedades.

É possível verificar uma correlação linear positiva entre a actividade antioxidante dos extractos e o respectivo conteúdo em fenóis totais, sendo esta correlação mais evidente nos extractos etanólicos. Indicando assim que os compostos fenólicos presentes nos extractos estão intimamente relacionados com a capacidade de sequestração de radicais livres por parte dos extractos. Pelo contrário, não se verifica qualquer relação entre a actividade antioxidante e o teor em flavonóides dos extractos, indicando que os flavonóides, apesar de contribuírem para a actividade antioxidante não estão directamente relacionados com esta.

Os extractos estudados apresentam diferentes actividades antioxidantes dependendo no método utilizado para a sua determinação, sugerindo diferentes utilizações para os mesmos. Por exemplo, extractos que revelaram actividade antioxidante semelhante ao BHT (extracto etanólico de carqueja e extracto aquoso de giesta) podem ser utilizados pela indústria alimentar na produção de alimentos, e os restantes extractos, particularmente os extractos de urze, que possuem elevada actividade antirradicalar podem ser aplicados no fabrico de alimentos funcionais e/ou na prevenção do stresse oxidativo humano. Seria necessário, no entanto, fazer ensaios de citotoxicidade e/ou genotoxicidade, pois os compostos presentes nos extractos podem ser tóxicos quando

ingeridos pelo Homem. Podia também determinar-se, por RMN ou GC-MS, qual ou quais os compostos com actividade presentes nos extractos.

Relativamente à actividade anti-microbiana, os extractos estudados não apresentam actividade anti-fúngica. Quanto à actividade anti-bacteriana, os extractos etanólicos possuem maior actividade do que os extractos aquosos, cujos valores de MIC são muito superiores. A actividade anti-bacteriana exercida pelos extractos é essencialmente sobre as bactérias Gram positivas.

O facto da actividade anti-microbiana dos extractos ser muito reduzida deve-se essencialmente ao facto de os compostos com actividade anti-microbiana encontrados nas plantas, principalmente os taninos, se encontrarem maioritariamente nas flores. Como os extractos estudados foram feitos a partir do conjunto das partes aéreas dos arbustos, incluindo as flores, os compostos anti-microbianos encontram-se em quantidades diminutas. Por isso, seria importante, extrair estes compostos utilizando apenas uma amostra das flores de cada um dos arbustos e depois determinar a actividade anti-microbiana destes extractos, que seria necessariamente maior. Depois podia ainda fazer-se um estudo semelhante mas com extractos das folhas do arbusto e comparar a actividade anti-microbiana deste extracto com o das flores.

Um outro factor a ter em conta, seria a forma de extracção e os solventes utilizados. Neste trabalho os extractos aquosos foram feitos por decocção, segundo este método, as elevadas temperaturas podem destruir/inactivar compostos funcionais, podiam pois, fazer-se extractos por maceração, eliminando-se deste modo a temperatura. Podia também estudar-se a eficiência de outros solventes orgânicos, nomeadamente, o metanol, o acetato de etilo, o clorofórmio, entre outros, na extracção de compostos com actividade antioxidante e /ou actividade anti-microbiana.

Os extractos aquosos foram centrifugados e os respectivos pellets foram rejeitados, tinha sido importante determinar a sua actividade antioxidante, pois o pellet resultante da centrifugação dos extractos aquosos era constituído por partículas de pequenas dimensões que poderiam pertencer às folhas e às flores, locais onde se encontram os compostos activos em grandes quantidades.

## V. Referências

## REFERÊNCIAS

---

- [1] <http://www.eb2-miranda-douro.rcts.pt/35/floresta.htm> (Disponível em 28/01/2009);
- [2] [http://pt.wikipedia.org/wiki/Floresta\\_portuguesa](http://pt.wikipedia.org/wiki/Floresta_portuguesa) (Disponível em 28/01/2009);
- [3] Moreira, J. (2008) – “Árvores e Arbustos em Portugal”, 1ª Edição, Argumentum, Lisboa;
- [4] Chaves, A. (2008) – “Viva Melhor Com as Plantas Mediciniais”, 3ª Edição, Edições Une, Lisboa;
- [5] ARKOCÁPSULAS® (2008) – “60 Maneiras de dizer Saúde – Guia das Plantas Mediciniais”, Edição 2008, Distrifa, Cascais;
- [6] Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A., Roque, O. (2007) – “Plantas na Terapêutica: Farmacologia e Ensaio Clínicos”, 1ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;
- [7] Zhao, P., Tanaka, T., Hirabayashi, K., Zhang, Y., Yang, C., Kouno, I. (2008) – “Caffeoyl arbutin and related compounds from the buds of *Vaccinium dunalianum*”, *Phytochemistry*, 69: 3087 – 3094;
- [8] Akkol, E., Yeşilada, E., Güvenç, A. (2007) – “Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey”, *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 251 – 257;
- [9] Harfani, H., Bouanani, N., Aziz, M., Caid, H., Ghalim, N., Amrani, S. (2007) – “The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate”, *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 156 – 160;
- [10] Vitor, R., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A., Teixeira, A., Paulo, A. (2004) – “Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing

endothelial protection against oxidative injury”, *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 363 – 370;

- [11] Costa, A. (2002) – “Farmacognosia – Volume II”, 5ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;
- [12] Sundararajan, R., Haja, N., Venkatesan, K., Mukherjee, K., Saha, B., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P. (2006) – “*Cytisus scoparius* link – A natural antioxidant”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6: 8 – 14;
- [13] Raja, S., Ahamed, K., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, P. (2007) – “Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 41 – 47;
- [14] Júnior, L., Höehr, N., Vellasco, A. (2001) – “Sistema Antioxidante envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathiona associado a Métodos Electroanalíticos na avaliação do Estresse Oxidativo”, *Química Nova*, 24: 112 – 119;
- [15] Nirmal, J., Babu, C., Harisudhan, T., Ramanathan, M. (2008) – “Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8: 15 – 22;
- [16] Cunha, A. (2005) – “Farmacognosia e Fitoquímica”, 1ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;
- [17] Costa, A. (2000) – “Farmacognosia – Volume III”, 3ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;
- [18] Simões, T., Queirós, M., Simões, M. (2001) – “Técnicas Laboratoriais de Química – Bloco I”, 1ª Edição, Porto Editora, Porto;

- [19] Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr., G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D., Cavalcante, L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M., Chaves, M. (2007) – “Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais”, *Química Nova*, 30: 351 – 355;
- [20] Cicco, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M. (2009) – “A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts”, *Microchemical Journal*, 91: 107 – 110;
- [21] Marcucci, M., Woisky, R., Salatino, A. (2008) – “Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis”, *Journal of Apiculture Research*;
- [22] Chang, R. (1994) – “Química”, 5ª Edição, McGrawHill, Amadora;
- [23] Devlin, T. (2006) – “Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations”, 6ª Edição, Hoboken, Wiley-Liss;
- [24] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007) – “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44 - 84;
- [25] Xavier, R., Albuquerque, G., Barros, E. (2006) – “Laboratório na Prática Clínica – Consulta Rápida”, 1ª Edição, Artmed, Porto Alegre;
- [26] Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002) – “Methods for testing antioxidant activity”, *The Royal Society of Chemistry*, 127: 183 – 198;
- [27] Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G. (2009) – “Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods”, *Food Chemistry*, 112: 721 – 726;

- [28] [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=D9132|ALDRICH&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=D9132|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC) (Disponível em 11/02/2009);
- [29] Prakash, A. (2001) – “Antioxidant Activity”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701 – 705;
- [30] Ascoli, B., Bernardi, A., Poser, G., Lisse, E., Bridi, R. (2008) – “Estudo do Potencial Antioxidante de *Hypericum polyanthemum* através do Método DPPH”, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Laboratório de Farmacognosia;
- [31] Marxen, K., Vanselow, K., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U. (2007) – “Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements”, *Sensors*, 7: 2080 – 2095;
- [32] Borguini, R. (2006) – “Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional”, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo;
- [33] Wang, B., Zhang, W., Duan, X., Li, X. (2009) – “*In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoids* (Rhodomelaceae)”, *Food Chemistry*, 113: 1101 – 1105;
- [34] Broinzi, P., Andrade-Wartha, E., Silva, A., Novoa, A., Torres, R., Azeredo, H., Alves, R., Mancini-Filho, J. (2007) – “Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.)”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 902 – 908;

- [35] Cataneo, C., Caliari, V., Gonzaga, L., Kuskoski, E., Fett, R. (2008) – “Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho”, *Ciências Agrárias Londrina*, 29: 93 – 102;
- [36] Furlong, E., Colla, E., Bortolato, D., Baisch, A., Souza-Soares, L. (2003) – “Avaliação do Potencial de Compostos Fenólicos em Tecidos Vegetais”, *Vetor*, 13: 105 – 114;
- [37] Dagáspari, C., Waszczyński, N. (2004) – “Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos”, *Visão Acadêmica*, 5: 33 – 40;
- [38] Gao, H., Shupe, T., Hse, C., Eberhardt, T. (2006) – “Antioxidant activity of extracts from the bark of *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl.”, *Holzforschung*, 60: 459 – 462;
- [39] Stratil, P., Kledjus, B., Kubáň, V. (2007) – “Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals”, *Talanta*, 71: 1741 – 1751;
- [40] Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., Shahabimajd, N. (2006) – “Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants”, *African Journal of Biotechnology*, 5: 1142 – 1145;
- [41] Kaur, C., Kapoor, H. (2002) – “Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables”, *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 153 – 161;
- [42] Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007) – “Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species”, *Food Chemistry*, 104: 1372 – 1378;

- [43] Miliauskas, G., Venskutonis, P., van Beek, T. (2004) – “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts”, *Food Chemistry*, 85 : 231 – 237;
- [44] Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J., Larondelle, Y. (2007) – “Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region”, *Food Chemistry*, 101: 1012 – 1018;
- [45] Liu, H., Qiu, N., Ding, H., Yao, R. (2008) – “Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses”, *Food Research International*, 41: 363 – 370;
- [46] Ferreira, W., Sousa, J. (1998) – “Microbiologia – Volume 1”, 1ª Edição, Lidel, Lisboa;
- [47] Shan, B., Cai, Y., Brooks, J., Corke, H. (2008) – “Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents”, *Food Chemistry*, 109: 530 – 537;
- [48] Ferreira, W., Sousa, J. (2000) – “Microbiologia – Volume 2”, 1ª Edição, Lidel, Lisboa;
- [49] Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. (2007) – “Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols”, 1ª Edição, CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Raton;
- [50] Shai, L., McGaw, L., Aderogba, M., Mdee, L., Eloff, J. (2008) – “Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves”, *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 238 – 244;
- [51] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F. (1998) – “A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols”, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 76: 270 – 276;

- [52] Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995) – “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity”, *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 28: 25 – 30;
- [53] Scherer, R., Godoy, H. (2009) – “Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method”, *Food Chemistry*, 112: 654 – 658;
- [54] Marco, G. (1968) – “A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 45: 594 – 598;
- [55] Miller, H. (1970) – “A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 48: 91;
- [56] Yanishlieva, N., Marinova, E. (1995) – “Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids sunflower oil”, *Food Chemistry*, 54: 377 – 382;
- [57] Conforti, F., Rosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. (2009) – “The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents”, *Food Chemistry*, 112: 587 – 594;
- [58] Obied, H., Bedgood Jr., D., Prenzler, P., Robards, K. (2007) – “Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities”, *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1238 – 1248;
- [59] Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M. (2009) – “Major flavonoids with antioxidant activity from *Teuricum polium* L.”, *Food Chemistry*, 112: 885 – 888;
- [60] Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z. (2009) – “Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Julgans regia* L.)”, *Food Chemistry*, 113: 160 – 165;

- [61] Orhan, I., Kartal, M., Abu-Asaker, M., Şenol, F., Yilmaz, G., Şener, B. (2009) – “Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants”, *Food Chemistry*, 114: 276 – 281;
- [62] Zhao, S., Zhang, L., Gao, P., Shao, Z. (2009) – “Isolation and characterization of the isoflavonas from sprouted chickpea seeds”, *Food Chemistry*, 114: 869 – 873;
- [63] Ho, C., Kumaran, A., Hwang, L. (2009) – “Bio-assay guided isolation and identification of anti-Alzheimer active compounds from the root of *Angelica sinensis*”, *Food Chemistry*, 114: 246 – 252;
- [64] “Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição”, Norma NCCLS M2 – A8, Volume 23, N.º 1;
- [65] Espinel-Ingroff, A., Cantón, E. (2007) – “Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts”, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 199 – 205;
- [66] “Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição”, Norma NCCLS M7 – A8, Volume 23, N.º 2;
- [67] Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., Vladimir-Knežević, S. (2005) – “Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products”, *Acta Pharmaceutica*, 55: 423 – 430;
- [68] Almajano, M., Carbó, R., Jiménez, J., Gordon, M. (2008) – “Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions”, *Food Chemistry*, 108: 55 – 63.



# Anexos

## 1. Determinação da actividade antioxidante

### 1.1. Método do DPPH – Versão 1

No ponto 4.1. (Método do DPPH – Versão 1) do capítulo III. (Resultados e Discussão), é exemplificada a determinação da actividade antioxidante do Extracto Etanólico de Urze segundo o método 1 do DPPH. De seguida serão apresentados os gráficos e os cálculos necessários para a determinação da actividade antioxidante dos restantes extractos e das substâncias-padrão, segundo este método.

#### 1.1.1. Extracto aquoso de urze

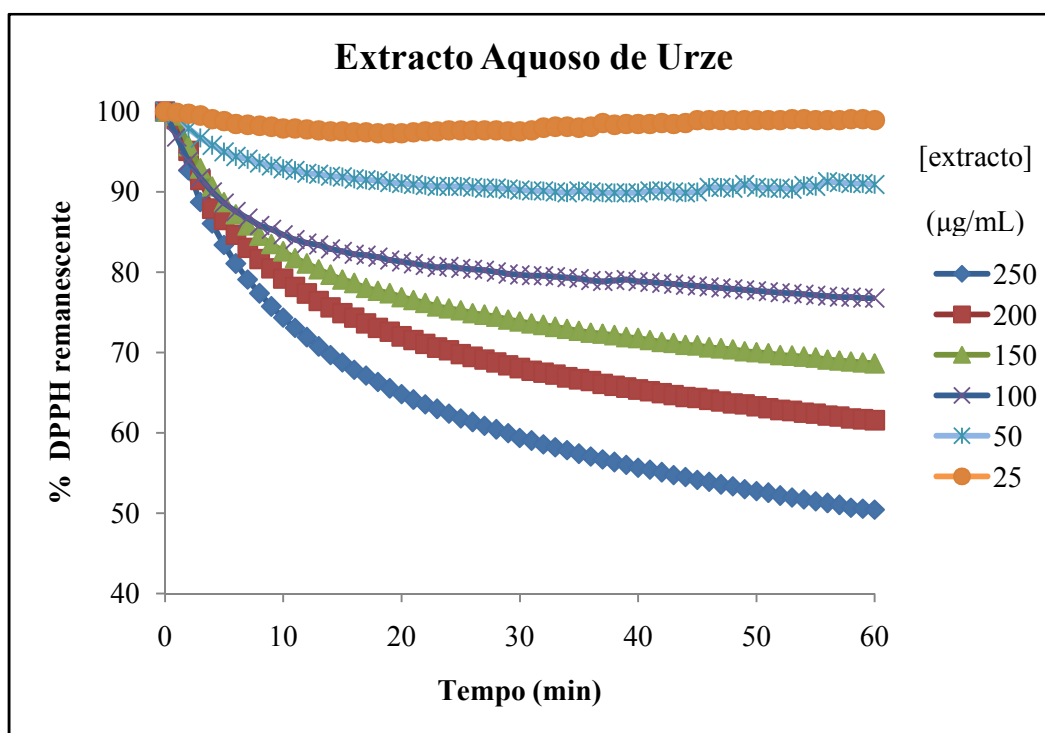
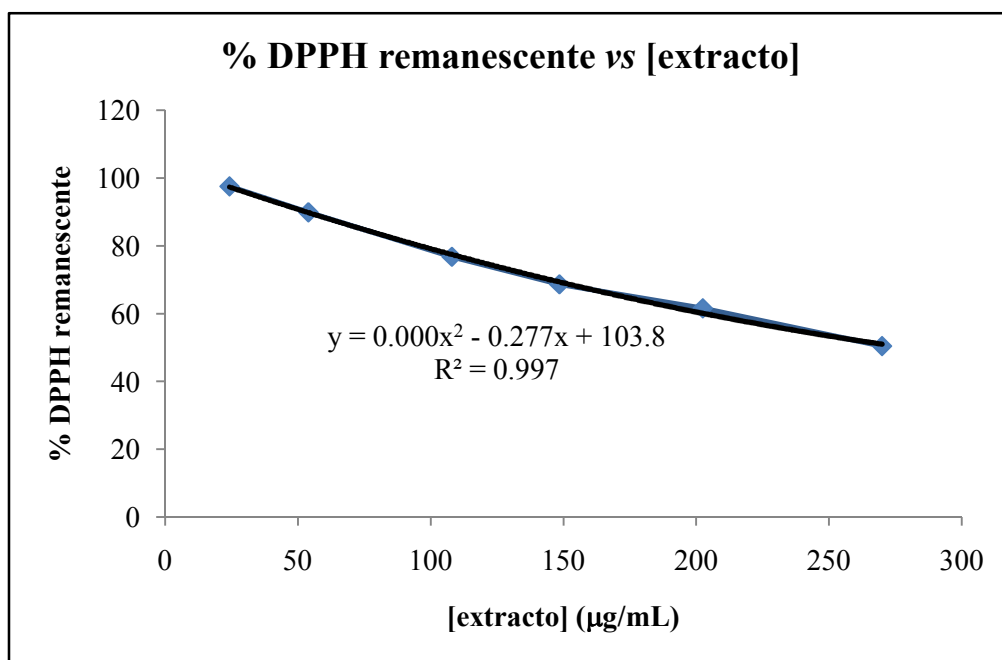


Figura 1: Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto aquoso de urze.

Para T = 60 minutos:



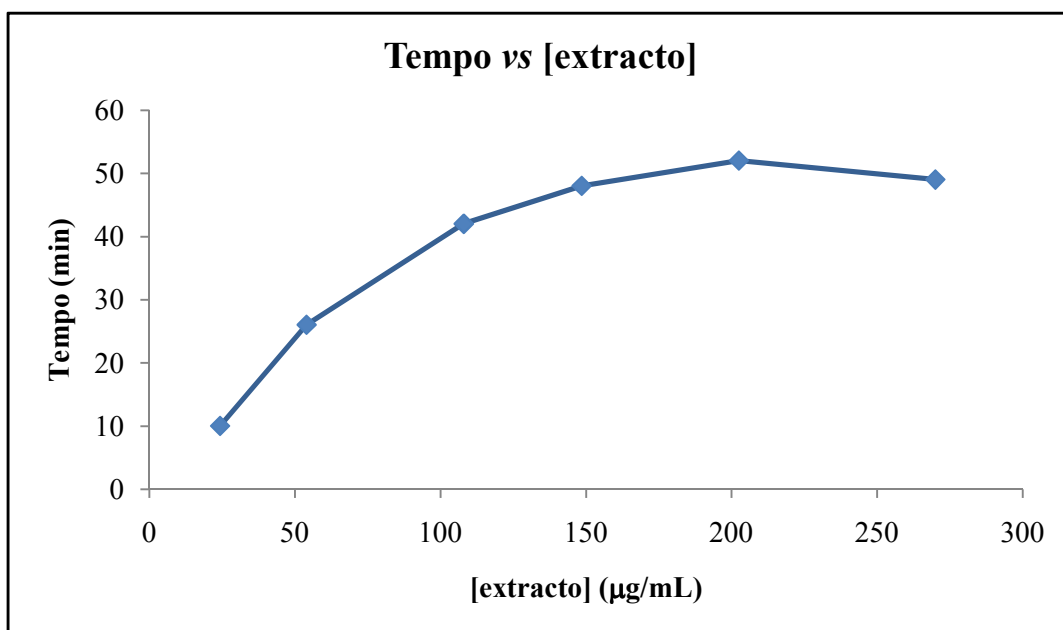
**Figura 2:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

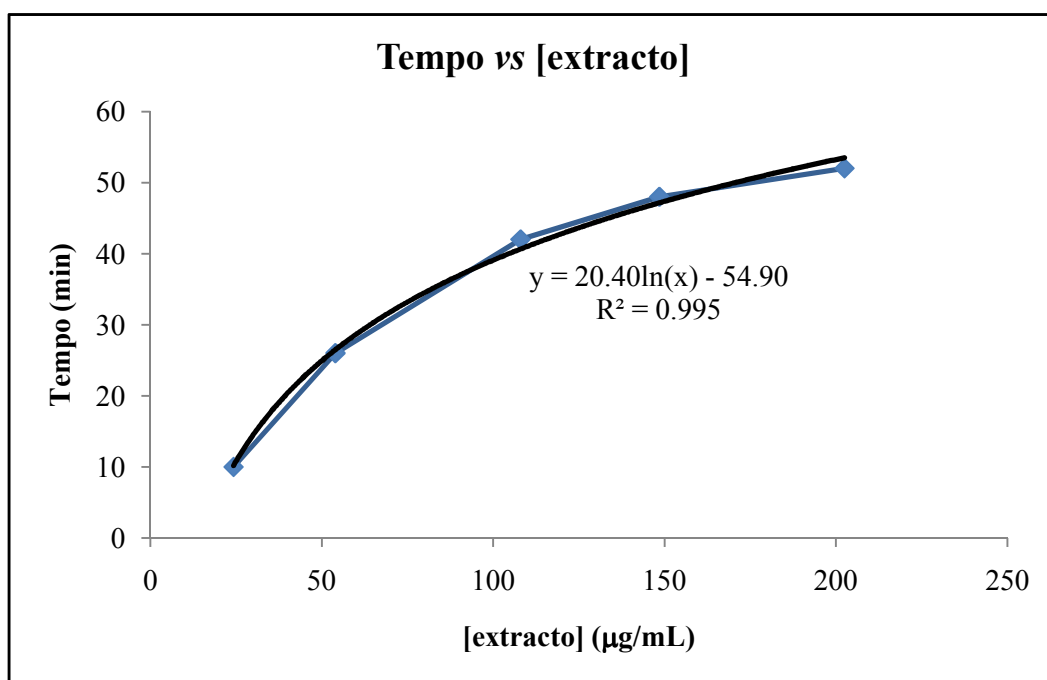
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [extracto] = 277,170 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 277,170 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto aquoso de urze, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 277,170  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 4:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 59,886 \text{ minutos}$$

$$T_{EC50} = 59,886 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o extracto aquoso de urze é de 59,886 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{277,170 \times 59,886} = 6,02 \times 10^{-5}$$

### 1.1.2. Extracto etanólico de carqueja

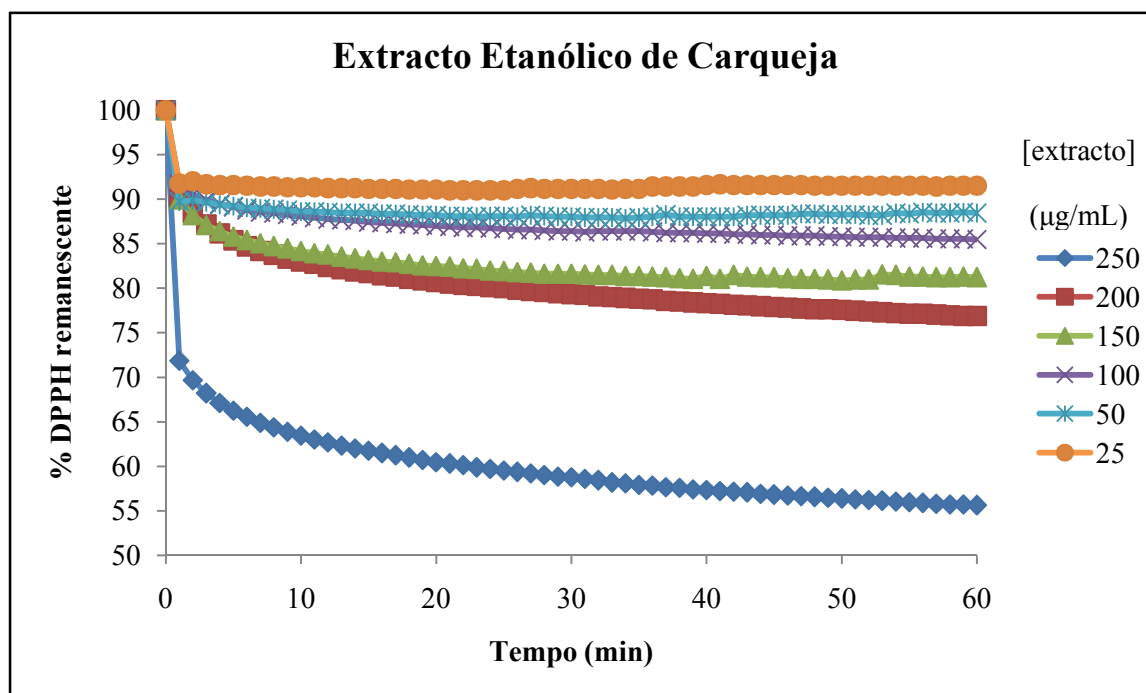
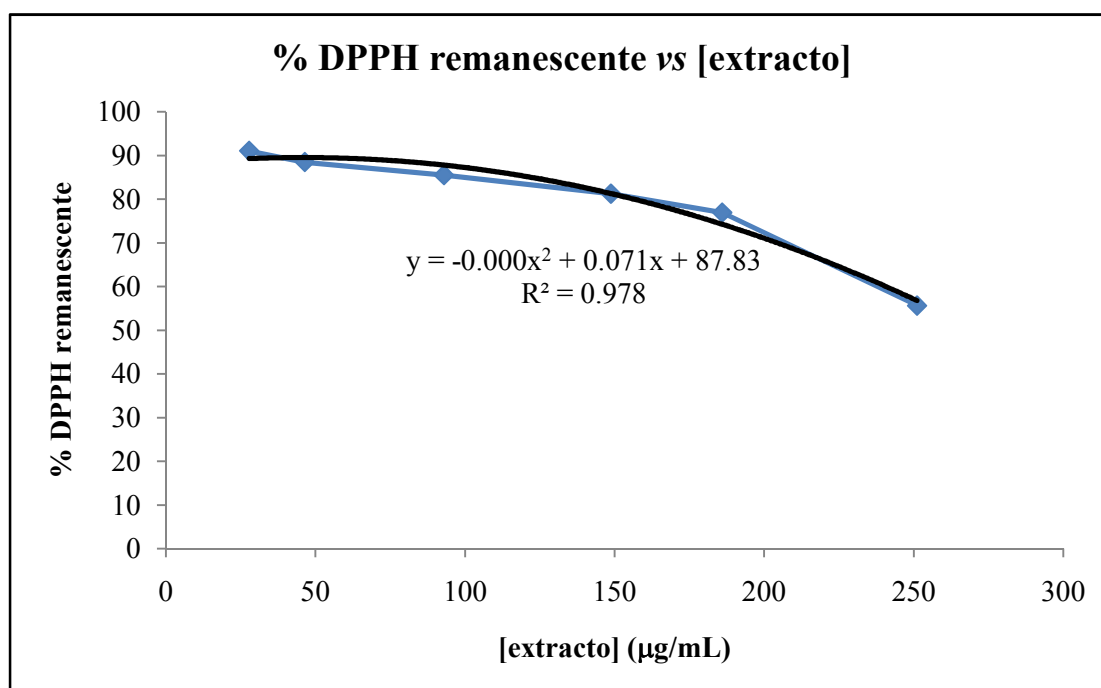


Figura 5: Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto etanólico de carqueja.

Para T = 60 minutos:



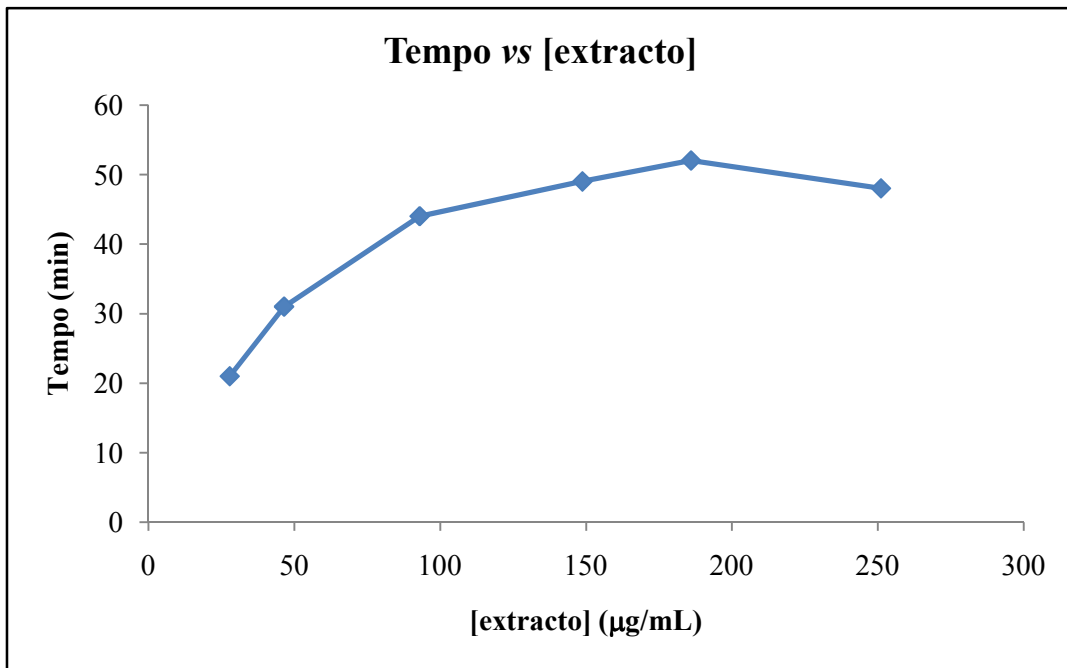
**Figura 6:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

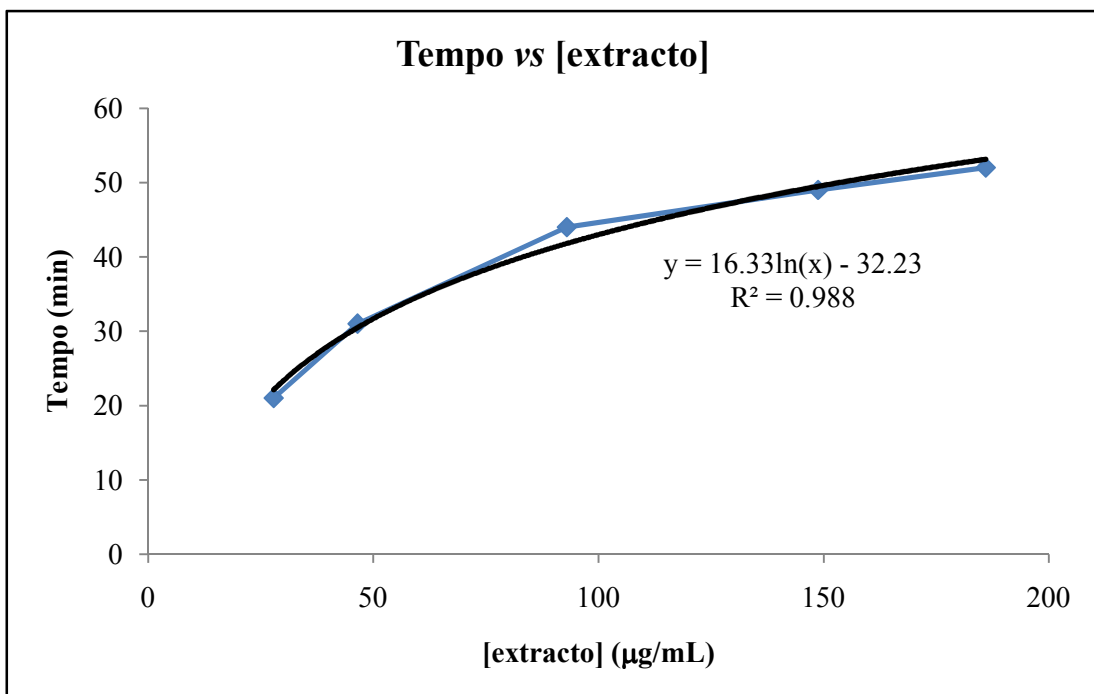
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [\text{extracto}] = 266,394 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 266,394 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto etanólico de carqueja, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 266,394  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 7:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 8:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 58,986 \text{ minutos}$$

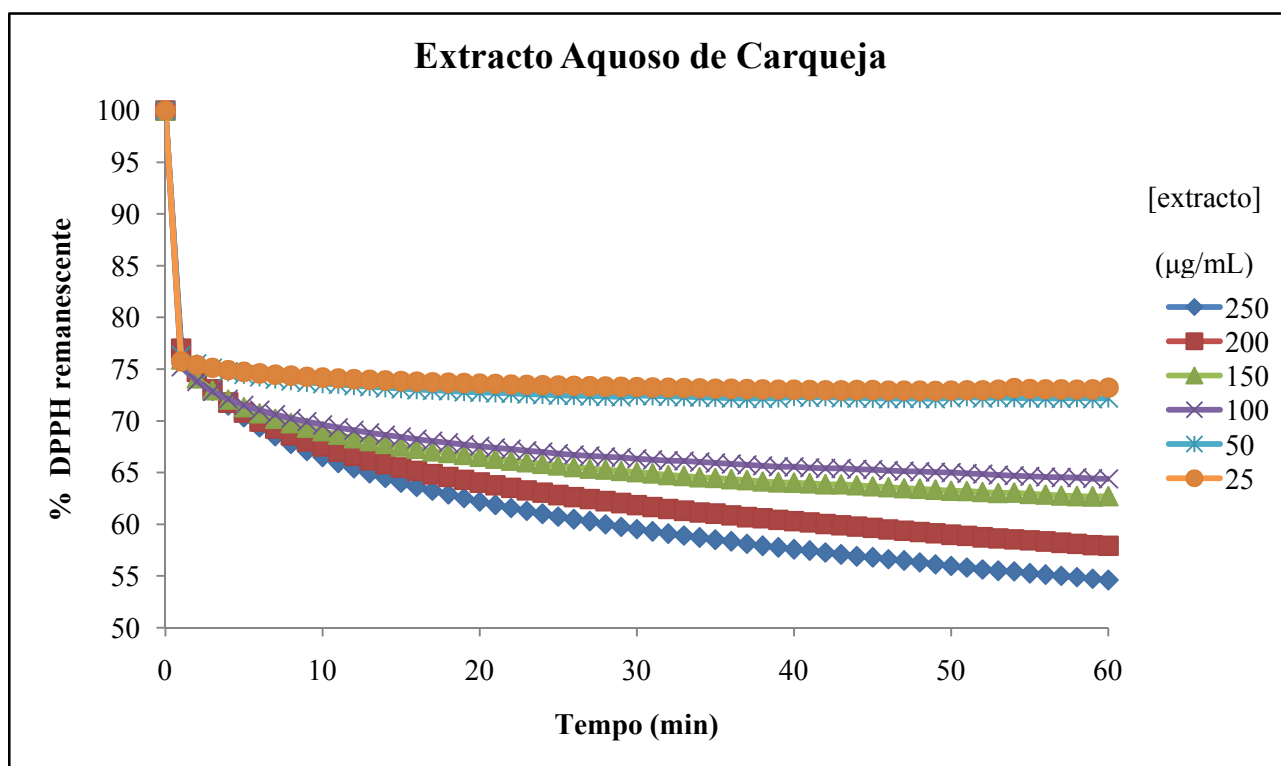
$$T_{EC50} = 58,986 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o extracto etanólico de carqueja é de 58,986 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

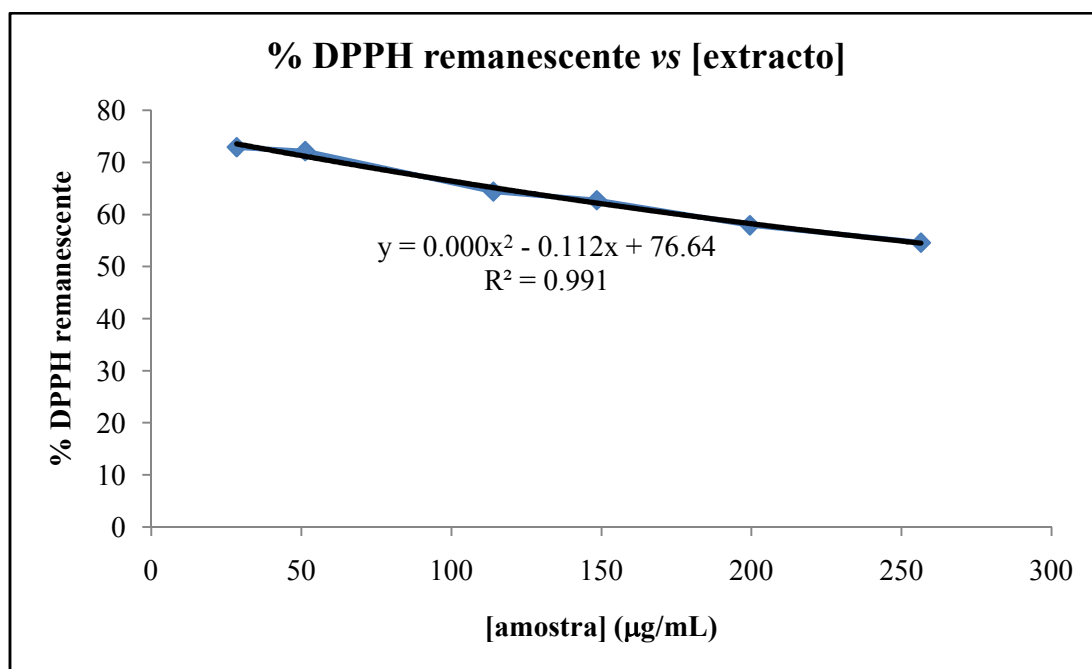
$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{266,394 \times 58,986} = 6,36 \times 10^{-5}$$

### 1.1.3. Extracto aquoso de carqueja



**Figura 9:** Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto aquoso de carqueja.

Para T = 60 minutos:



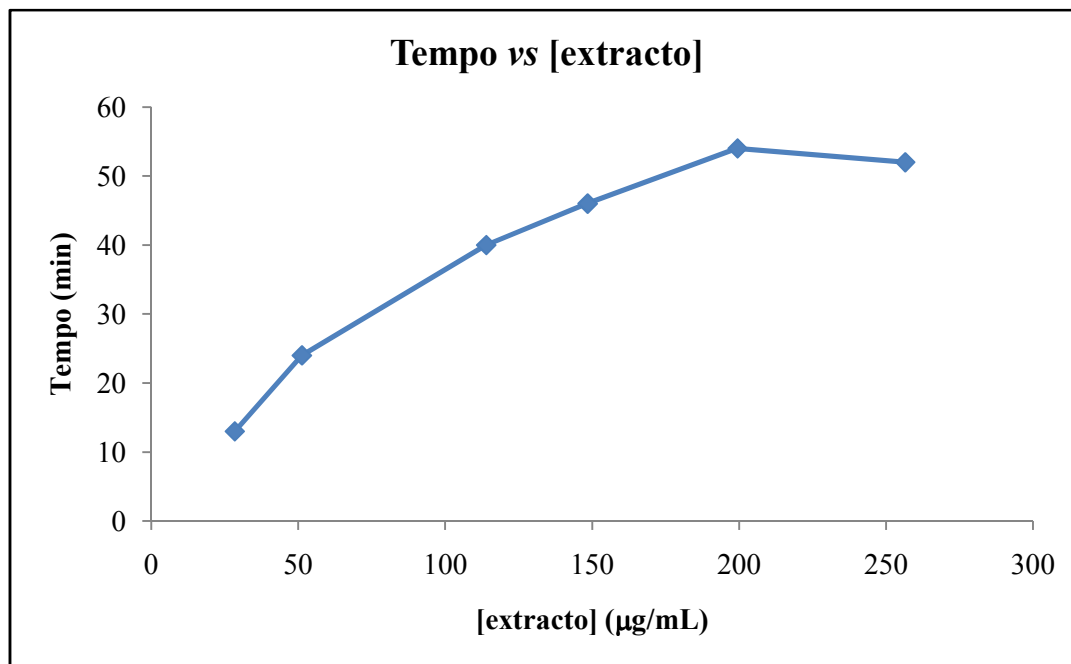
**Figura 10:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

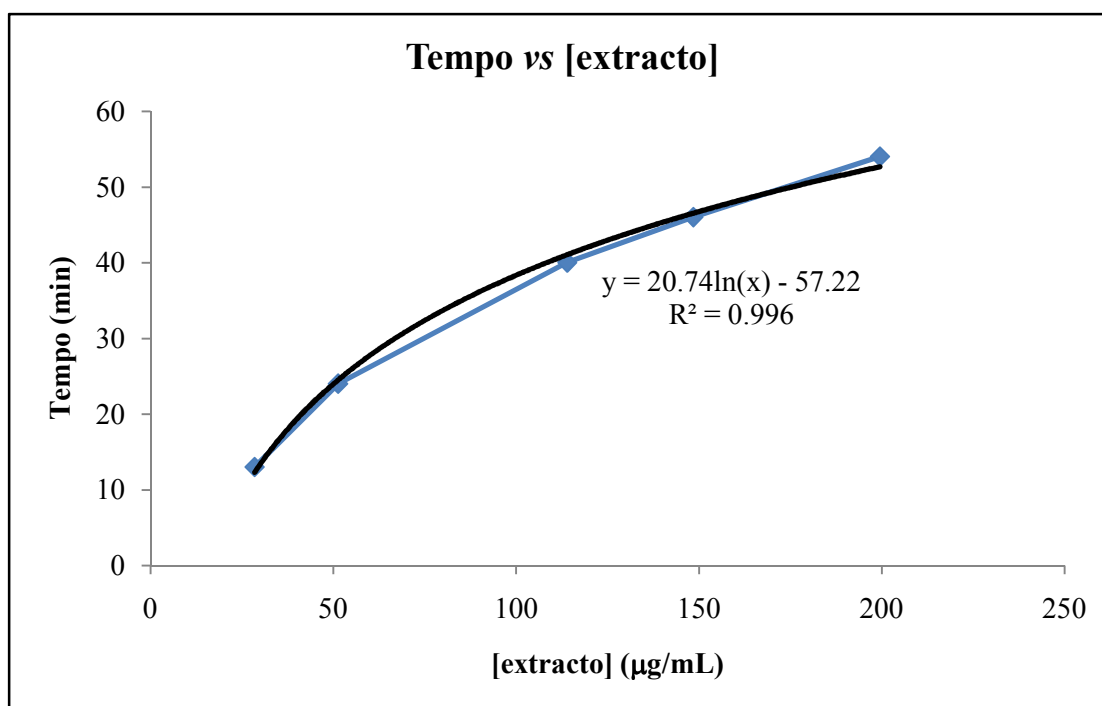
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [\text{extracto}] = 335,982 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 335,982 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto aquoso de carqueja, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 335,982  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 11:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 12:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC_{50}} = 63,471 \text{ minutos}$$

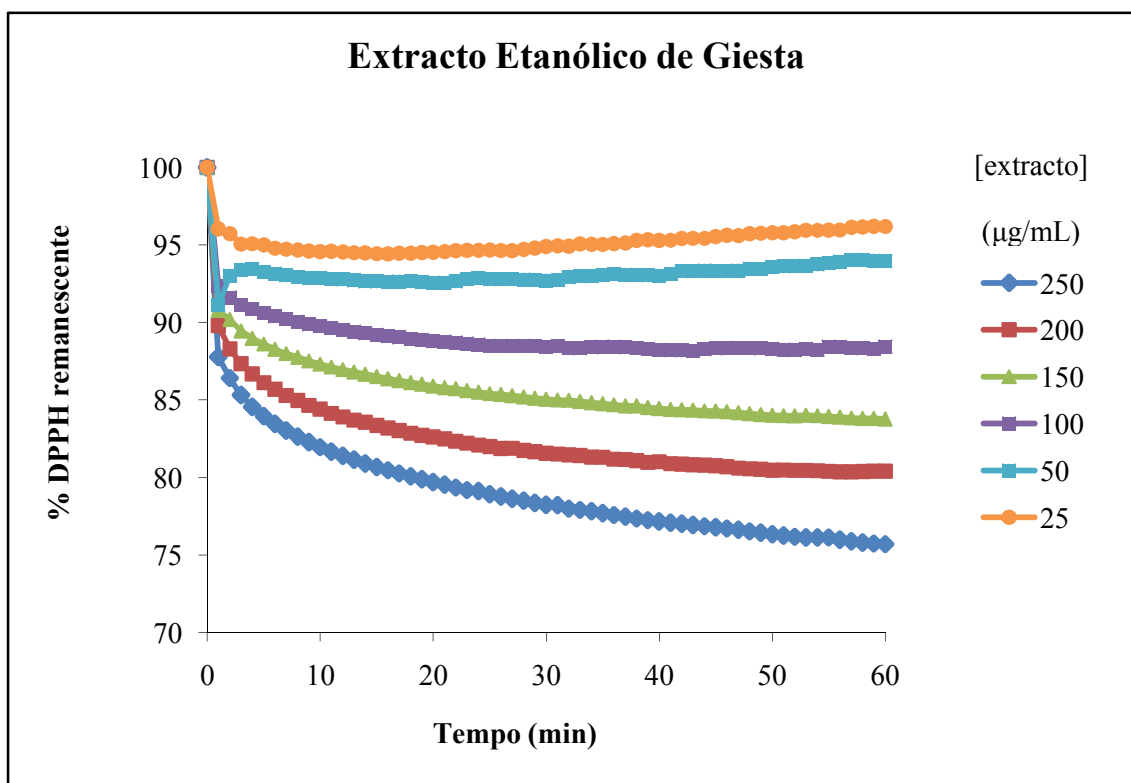
$$T_{EC_{50}} = 63,471 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC_{50}}$ ), para o extracto aquoso de carqueja é de 63,471 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

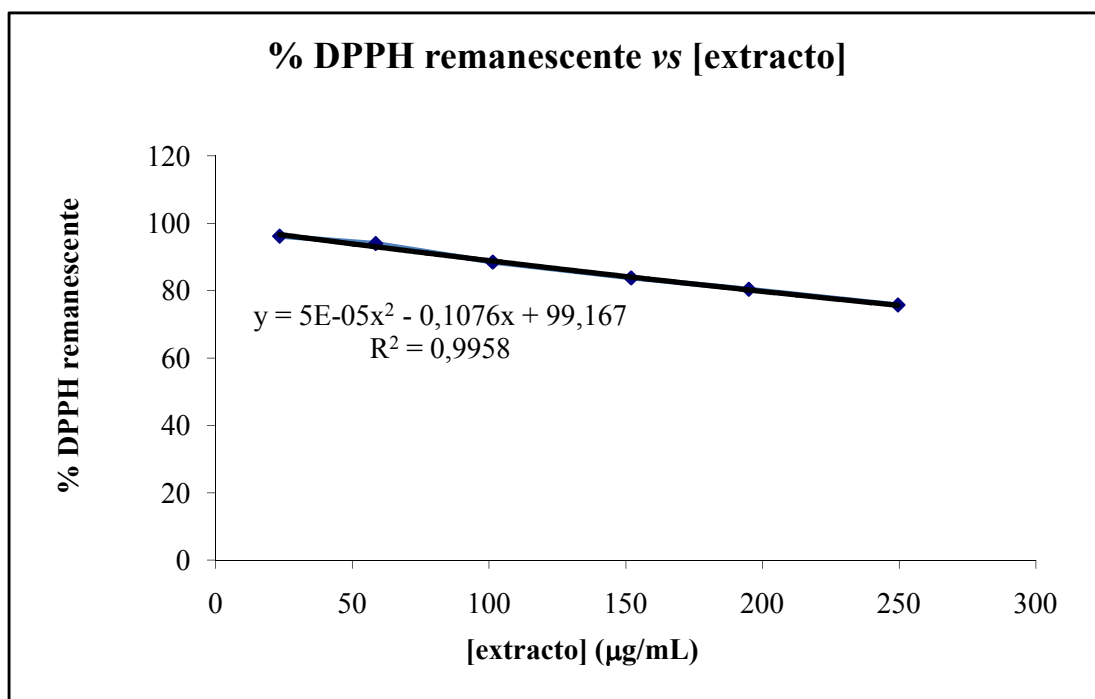
$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC_{50}}} = \frac{1}{335,982 \times 63,471} = 4,69 \times 10^{-5}$$

#### 1.1.4. Extracto etanólico de giesta



**Figura 13:** Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto etanólico de giesta.

Para T = 60 minutos:



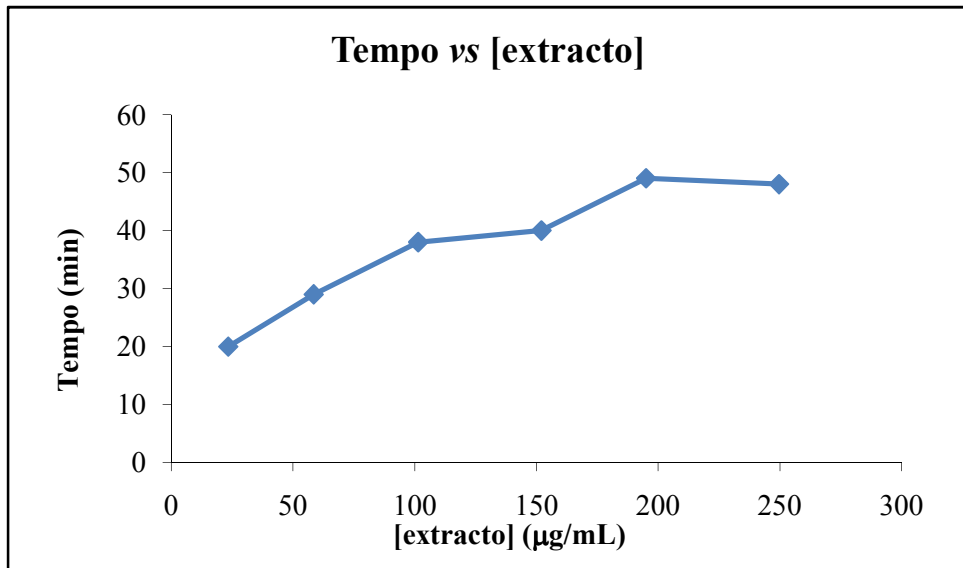
**Figura 14:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

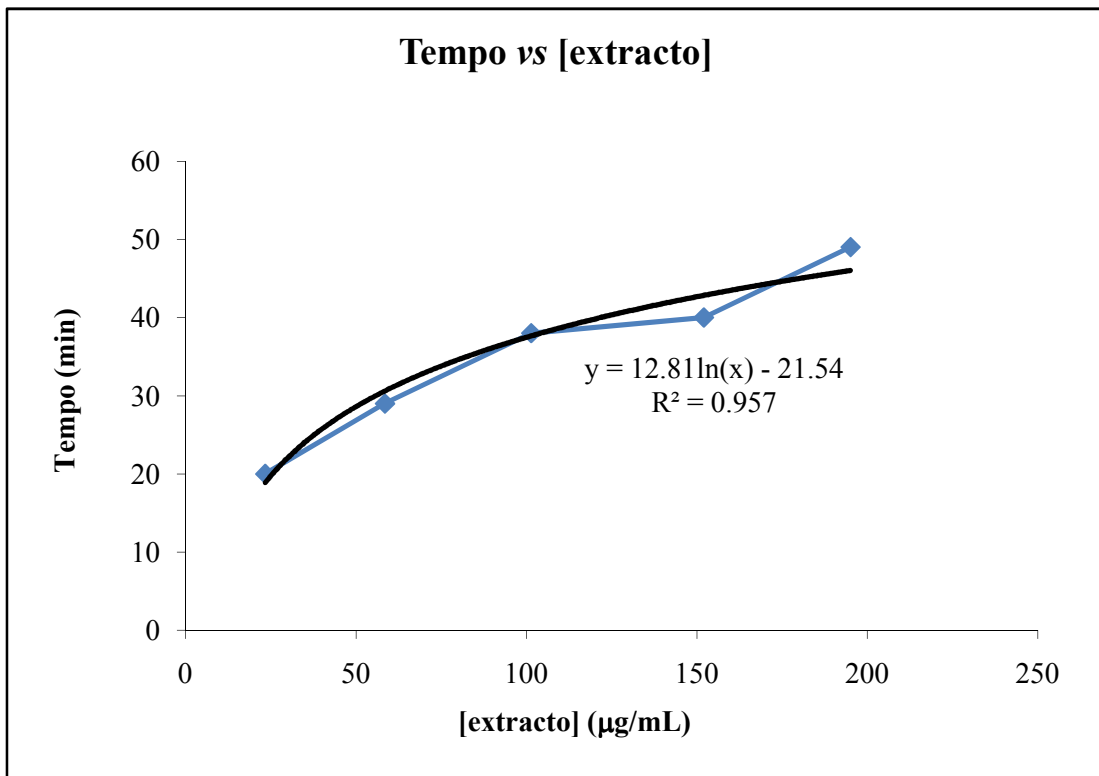
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [extracto] = 658,345 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 658,345 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto etanólico de giesta, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 658,345  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 15:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 16:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 61,632 \text{ minutos}$$

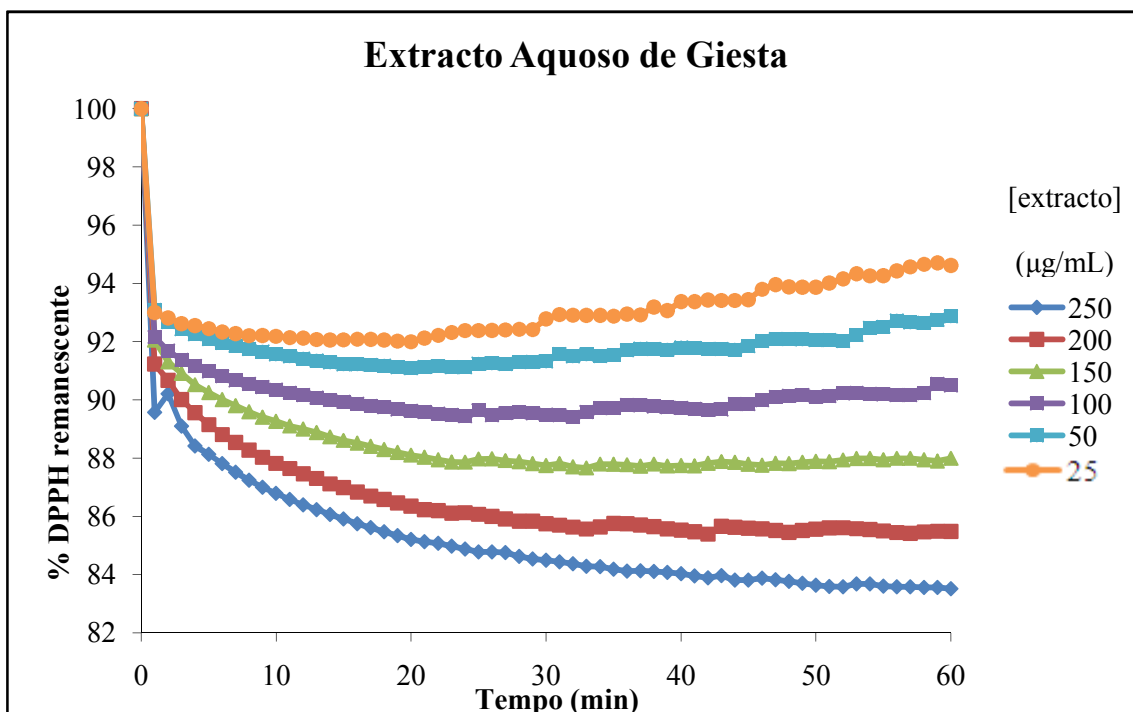
$$T_{EC50} = 61,632 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o extracto etanólico de giesta é de 61,632 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

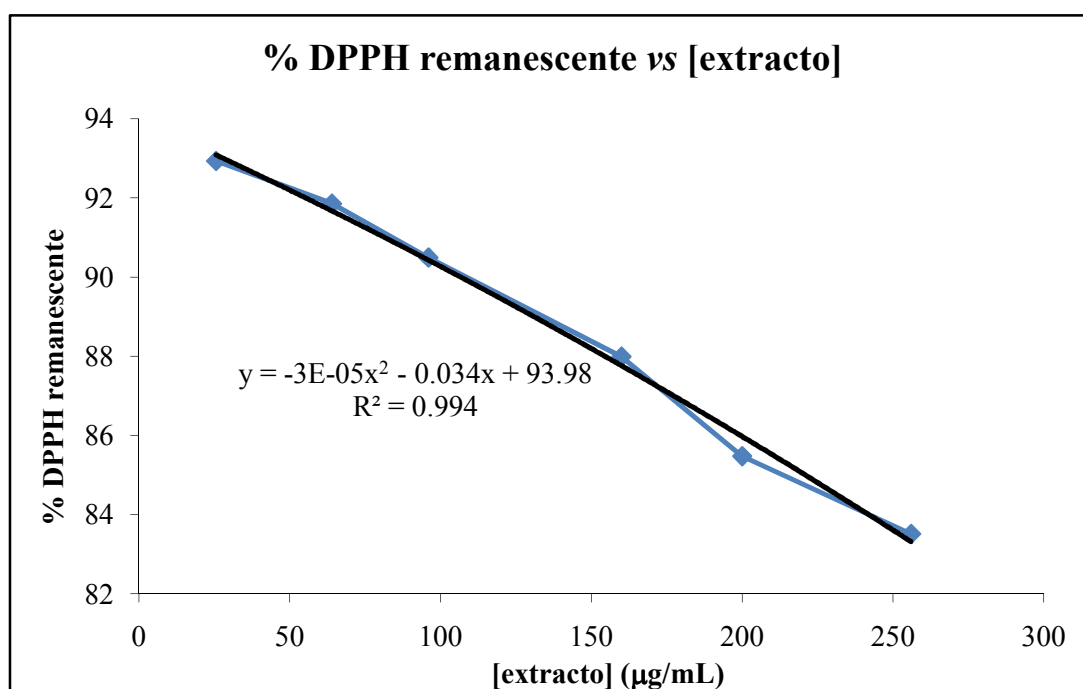
$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{658,345 \times 61,632} = 2,46 \times 10^{-5}$$

### 1.1.5. Extracto aquoso de giesta



**Figura 17:** Comportamento cinético do DPPH na presença do extracto aquoso de giesta.

Para T = 60 minutos:



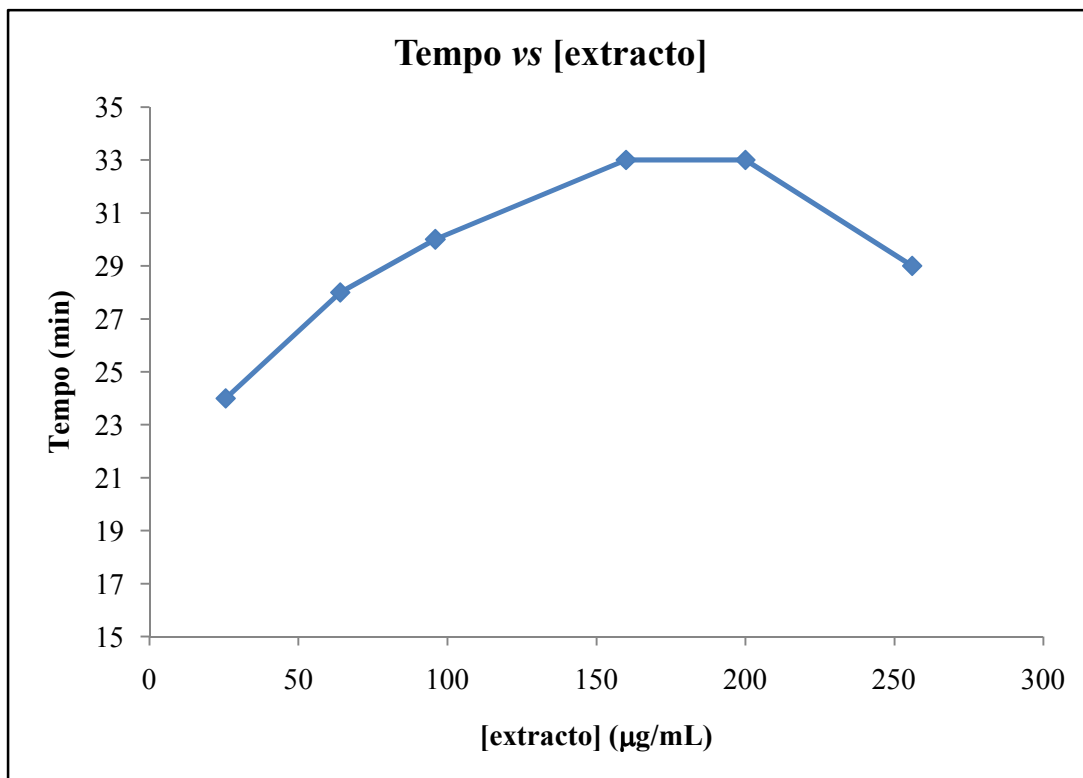
**Figura 18:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de extracto. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de extracto correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

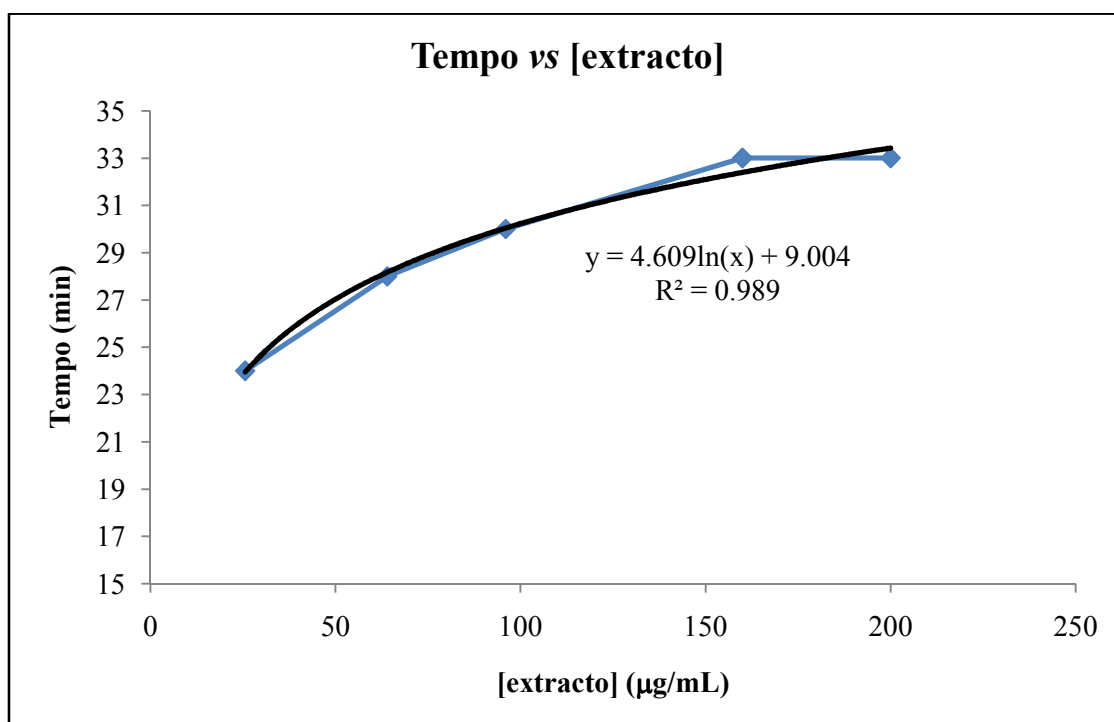
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [extracto] = 768,270 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 768,270 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do extracto aquoso de giesta, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 768,270  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 19:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de extracto.



**Figura 20:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 39,632 \text{ minutos}$$

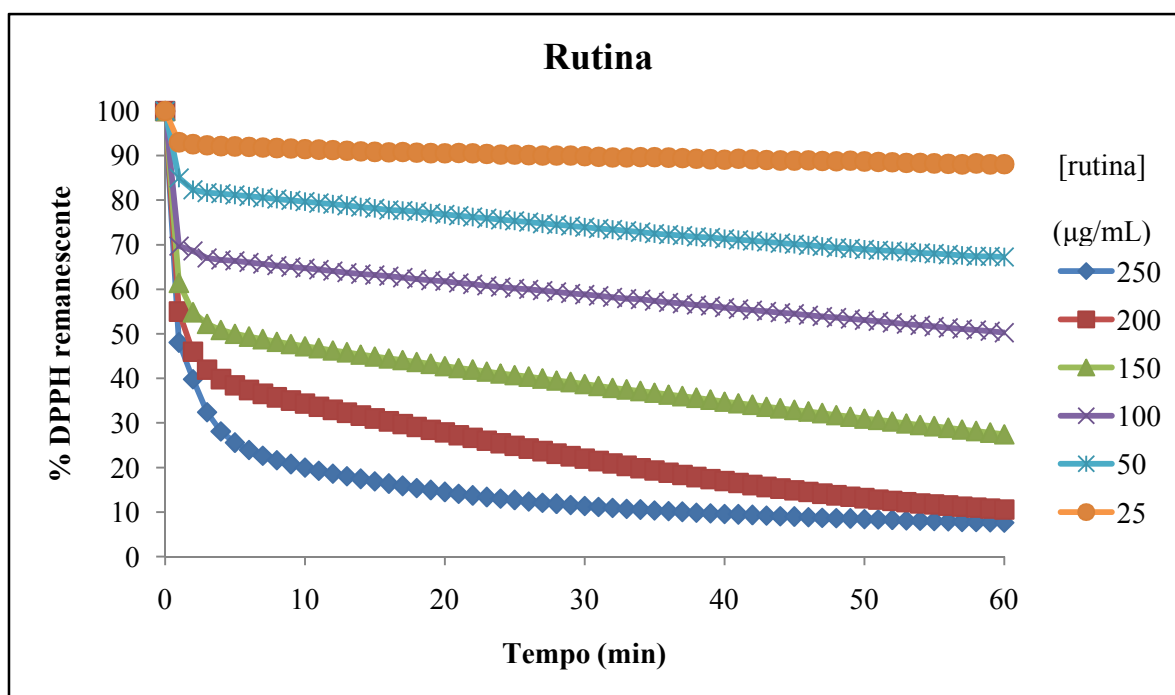
$$T_{EC50} = 39,632 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o extracto aquoso de giesta é de 39,632 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

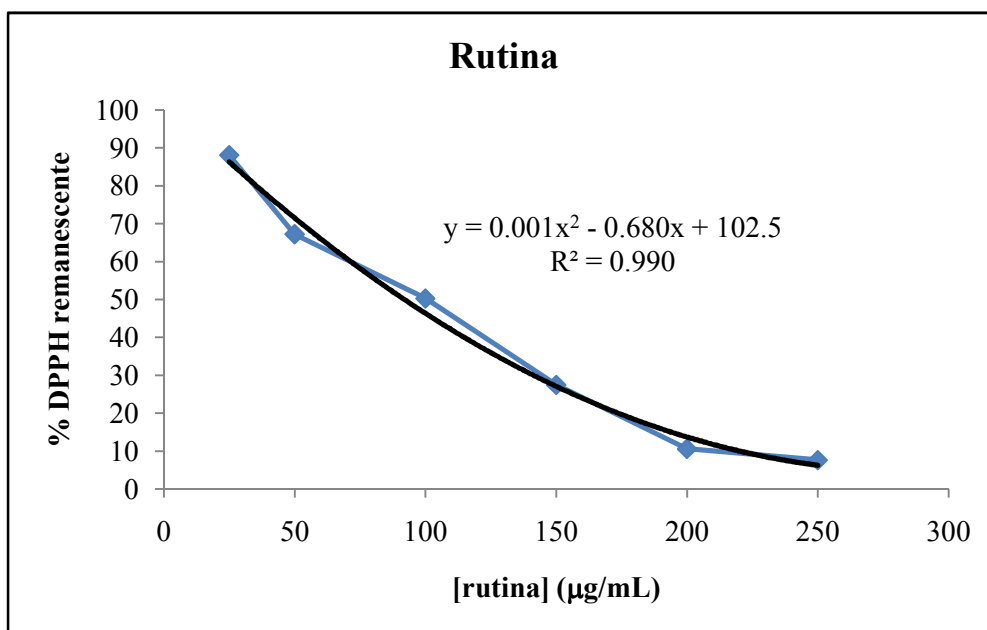
$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{768,270 \times 39,632} = 3,28 \times 10^{-5}$$

### 1.1.6. Rutina



**Figura 21:** Comportamento cinético do DPPH na presença da rutina.

Para T = 60 minutos:



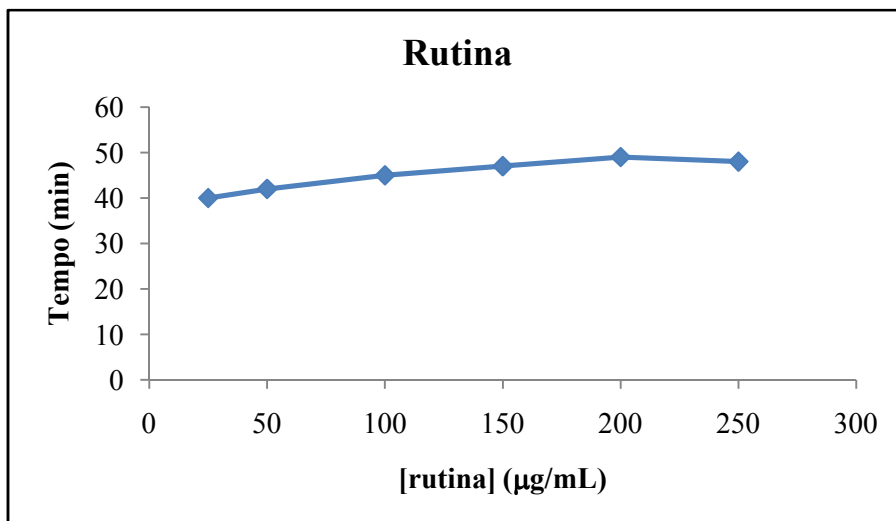
**Figura 22:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de rutina. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de rutina correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

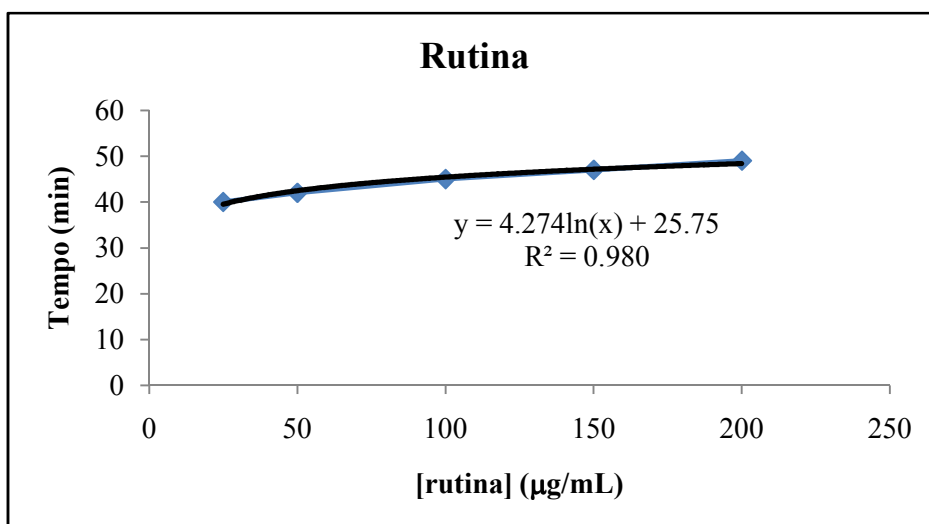
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [rutina] = 92,285 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 92,285 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente da rutina, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 92,285 µg/mL.



**Figura 23:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de rutina.



**Figura 24:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 45,095 \text{ minutos}$$

$$T_{EC50} = 45,095 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para a rotina é de 45,095 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{92,285 \times 45,095} = 2,40 \times 10^{-4}$$

### 1.1.7. Trolox

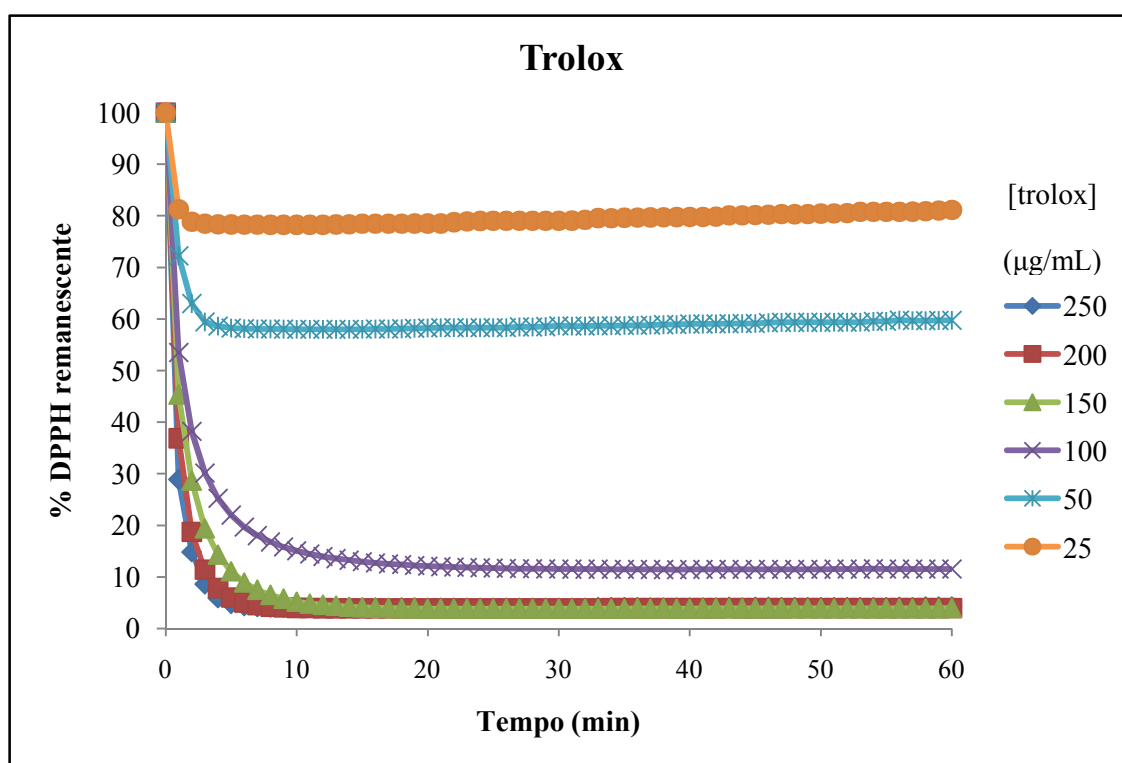
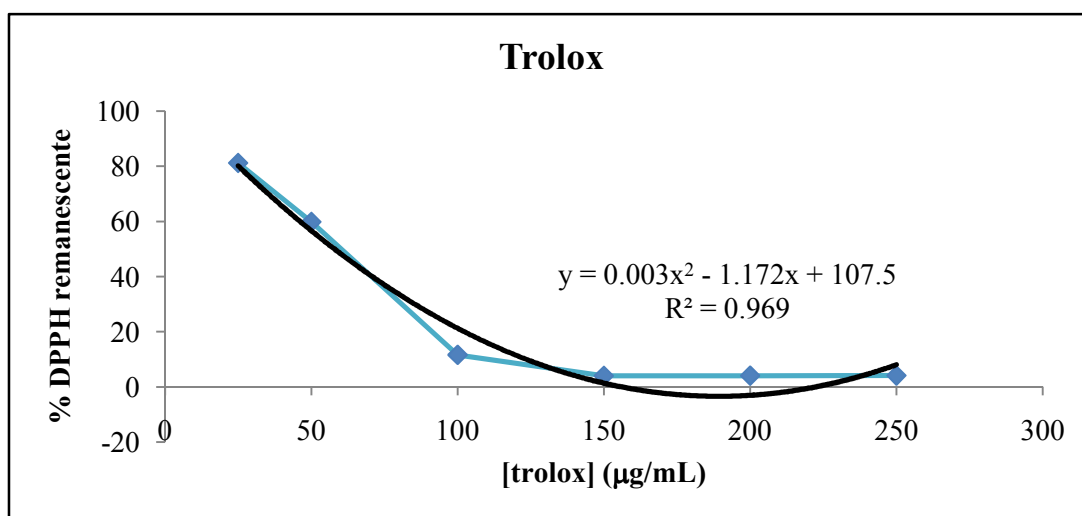


Figura 25: Comportamento cinético do DPPH na presença do trolox.

Para T = 60 minutos:



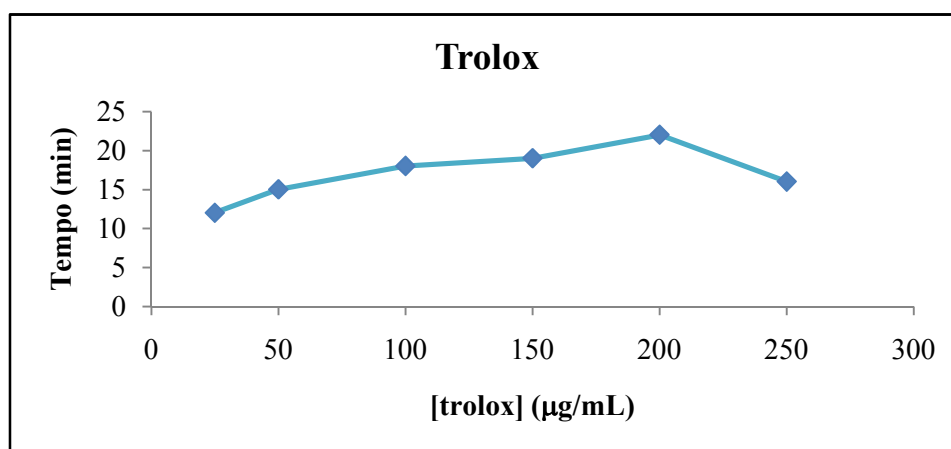
**Figura 26:** % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de trolox. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma  $\% DPPH_{rem} = 50$ , calcula-se a concentração de trolox correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

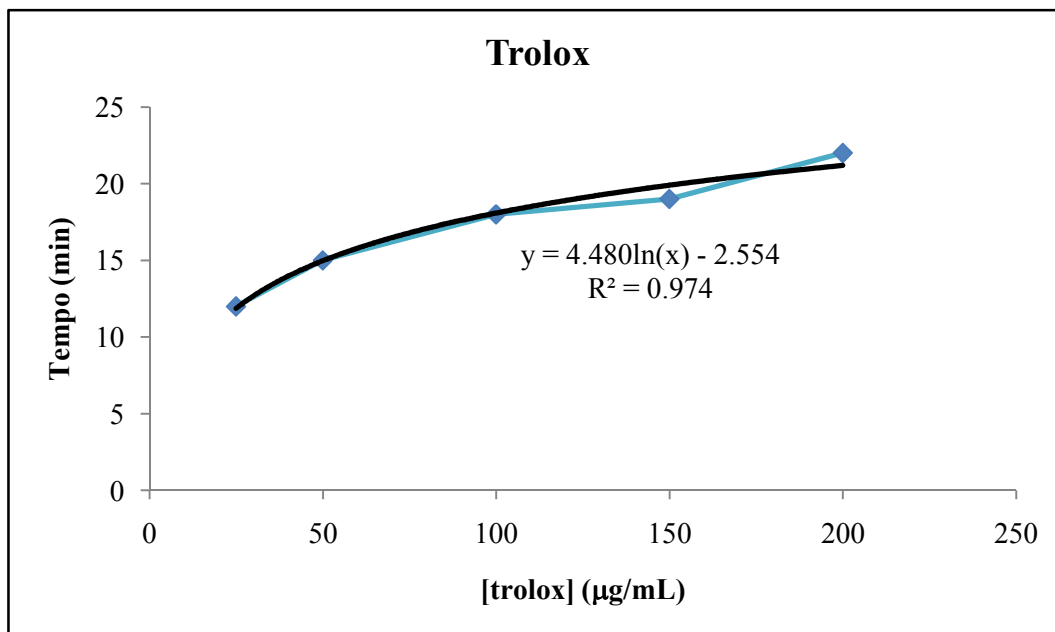
$$\% DPPH_{rem} = 50 \rightarrow [trolox] = 57,925 \mu\text{g/mL}$$

$$EC_{50} = 57,925 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do trolox, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 57,925 µg/mL.



**Figura 27:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de trolox.



**Figura 28:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{EC50}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 15,632 \text{ minutos}$$

$$T_{EC50} = 15,632 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o trolox é de 15,632 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{57,925 \times 15,632} = 1,10 \times 10^{-3}$$

### 1.1.8. Ácido Gálico

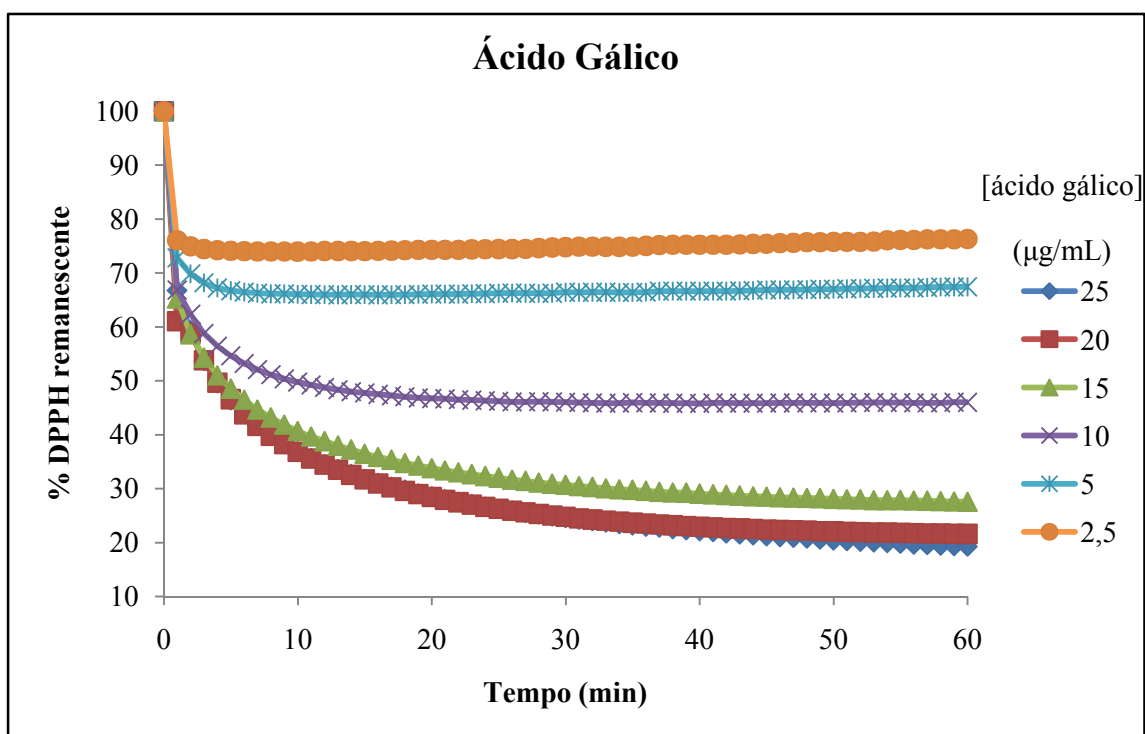


Figura 29: Comportamento cinético do DPPH na presença do ácido gálico.

Para T = 60 minutos:

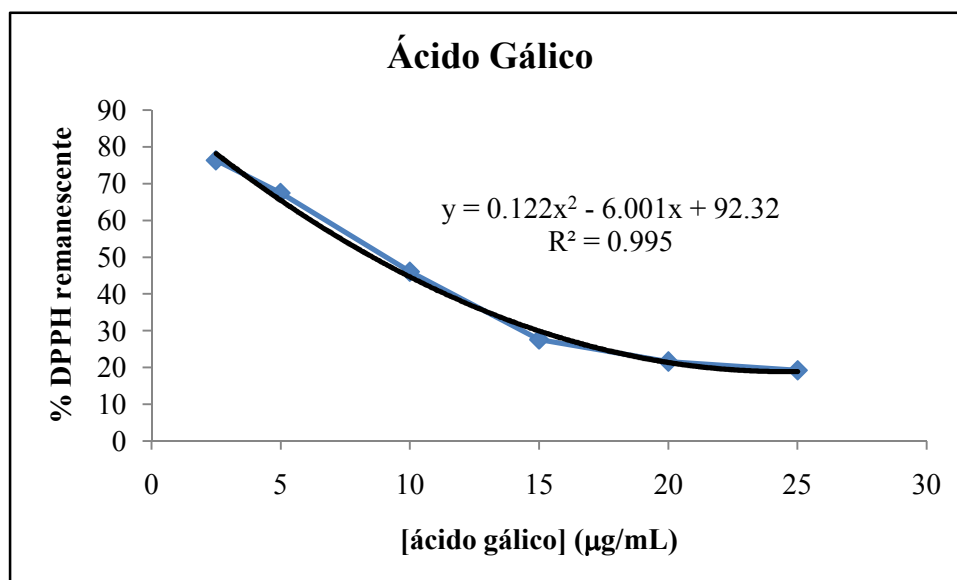


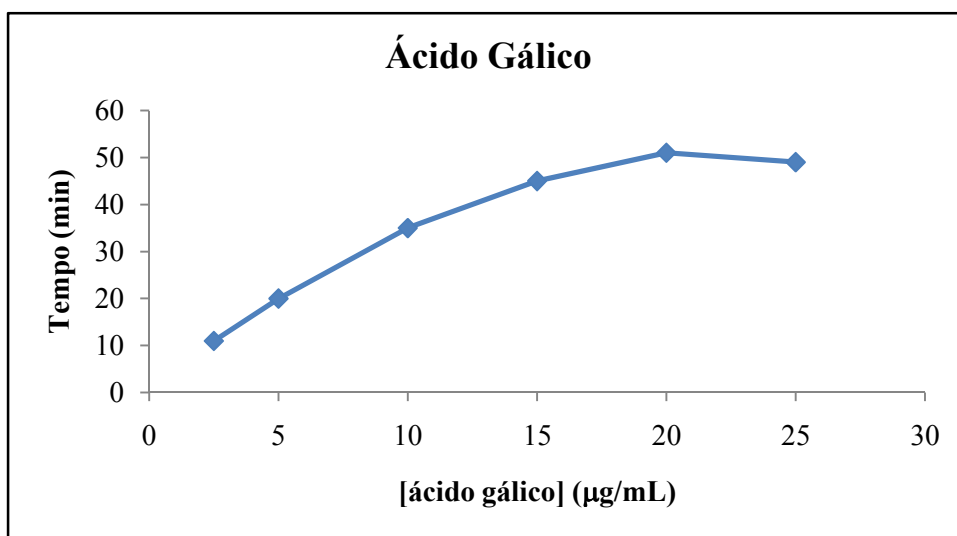
Figura 30: % DPPH remanescente, para tempo reaccional igual a 60 minutos, em função da concentração de ácido gálico. Este gráfico permite calcular  $EC_{50}$ .

Para uma % DPPH<sub>rem</sub> = 50, calcula-se a concentração de ácido gálico correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

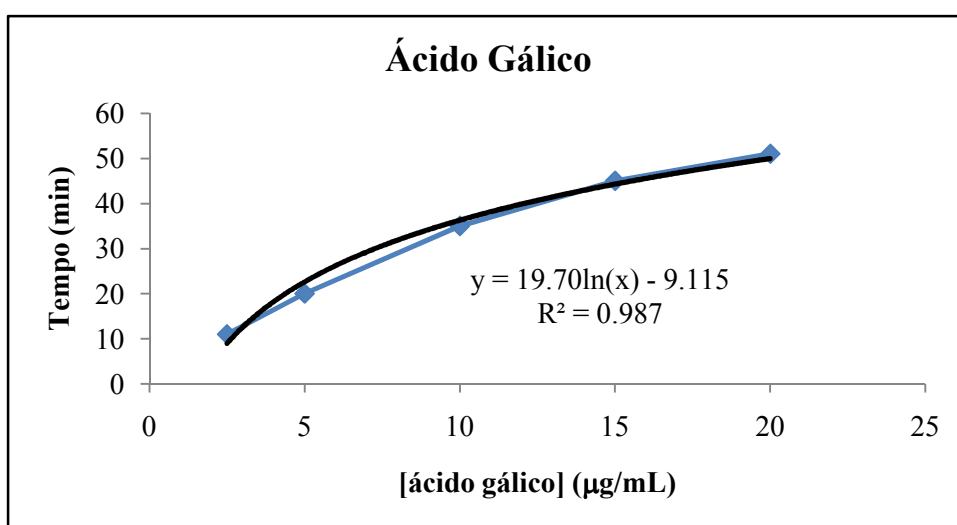
$$\% \text{DPPH}_{\text{rem}} = 50 \rightarrow [\text{trolox}] = 8,542 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{EC}_{50} = 8,542 \mu\text{g/mL}$$

Assim sendo, a concentração eficiente do ácido gálico, isto é, a concentração necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é 8,542  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 31:** Tempo reaccional, ao qual se atinge o estado estacionário, em função da concentração de ácido gálico.



**Figura 32:** Zona crescente do gráfico anterior. Este gráfico permite calcular  $T_{\text{EC}_{50}}$ .

Para a concentração eficiente,  $EC_{50}$ , calcula-se o tempo reaccional correspondente, a partir da equação da curva do gráfico anterior:

$$EC_{50} \rightarrow T_{EC50} = 33,160 \text{ minutos}$$

$$T_{EC50} = 33,160 \text{ minutos}$$

Assim sendo, o tempo necessário para que a concentração inicial de DPPH decresça 50 % (tempo eficiente –  $T_{EC50}$ ), para o ácido gálico é de 33,160 minutos.

Cálculo da eficiência antirradicalar (AE):

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \times T_{EC50}} = \frac{1}{8,542 \times 33,160} = 3,53 \times 10^{-3}$$

## 1.2. Método do DPPH – Versão 2

Como no ponto 4.2. (Método do DPPH – Versão 2) do capítulo III. (Resultados e Discussão) só são apresentados os cálculos da actividade antioxidante do Extracto Etanólico de Urze, são aqui apresentados os gráficos e os cálculos necessários para a determinação dos parâmetros da actividade antioxidante para os restantes extractos e para as substâncias utilizadas como padrão, segundo o método 2 do DPPH.

### 1.2.1. Extracto aquoso de urze

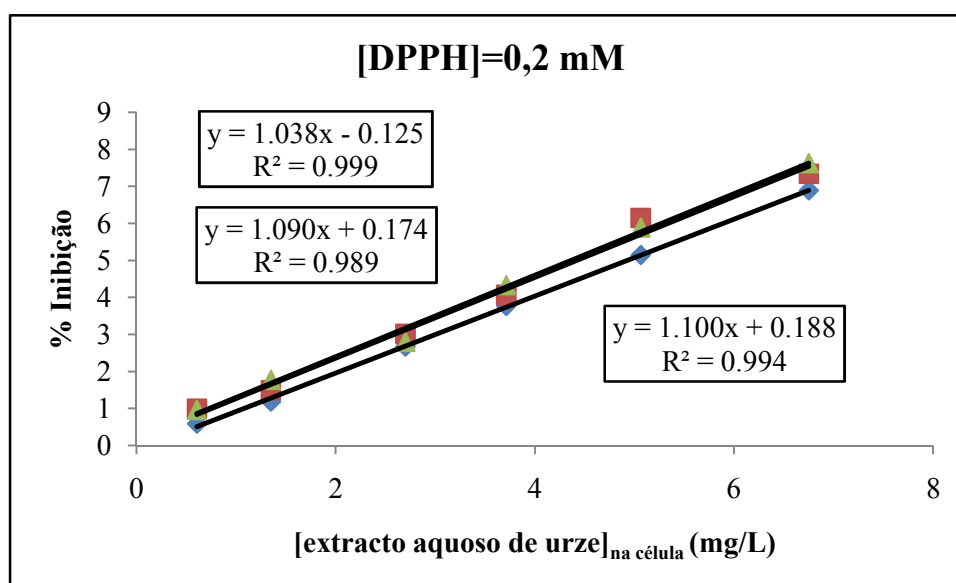
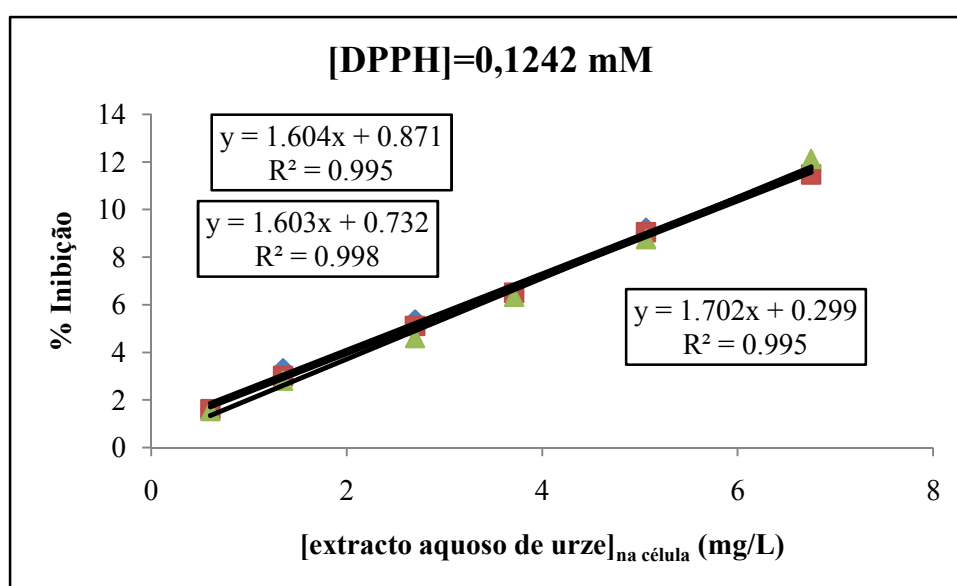


Figura 33: Extracto aquoso de urze, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 1:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de urze para  $[DPPH]=0,2$  mM.

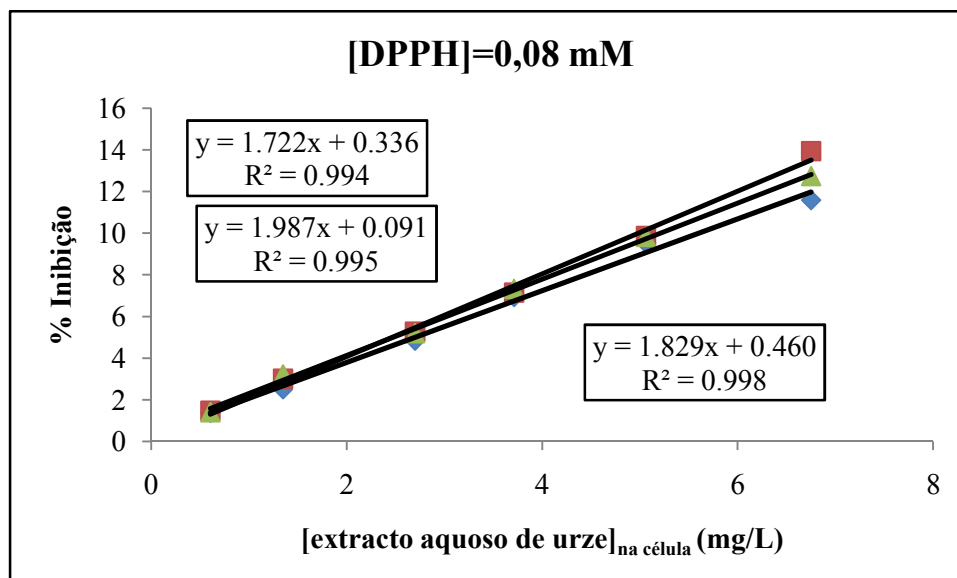
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
48,258	45,707	45,246	46,404 ± 1,622
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,739	1,841	1,861	1,814 ± 0,065



**Figura 34:** Extracto aquoso de urze, para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

**Tabela 2:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de urze para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
30,613	30,734	29,192	30,180 ± 0,857
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,607	1,599	1,680	1,629 ± 0,045



**Figura 35:** Extracto aquoso de urze, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 3:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de urze para [DPPH]=0,08 mM.

$IC_{50}$ – A (mg/L)	$IC_{50}$ – B (mg/L)	$IC_{50}$ – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
28,841	25,116	27,086	27,014 ± 1,863
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
1,609	1,852	1,716	1,726 ± 0,121

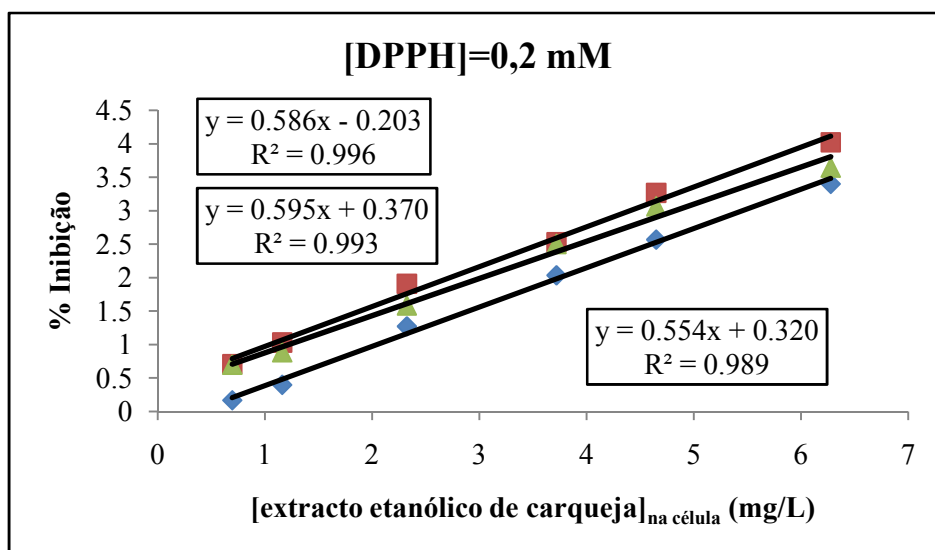
**Tabela 4:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do aquoso de urze.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	34,533 ± 1,448	FORTE
AAI	1,723 ± 0,077	

É necessária uma concentração de 34,533 mg/L de extracto aquoso de urze para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto aquoso de urze tem uma actividade antioxidante forte.

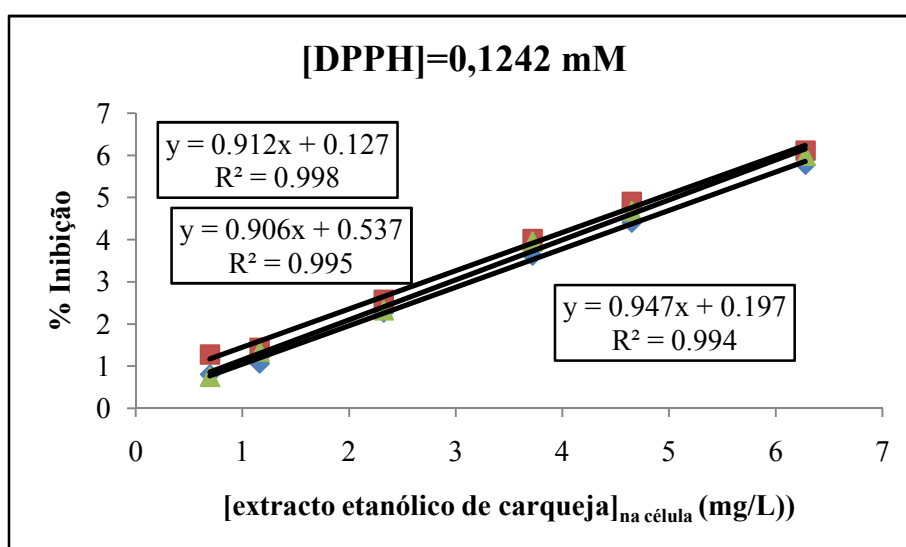
### 1.2.2. Extracto etanólico de carqueja



**Figura 36:** Extracto etanólico de carqueja, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 5:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de carqueja para [DPPH]=0,2 mM.

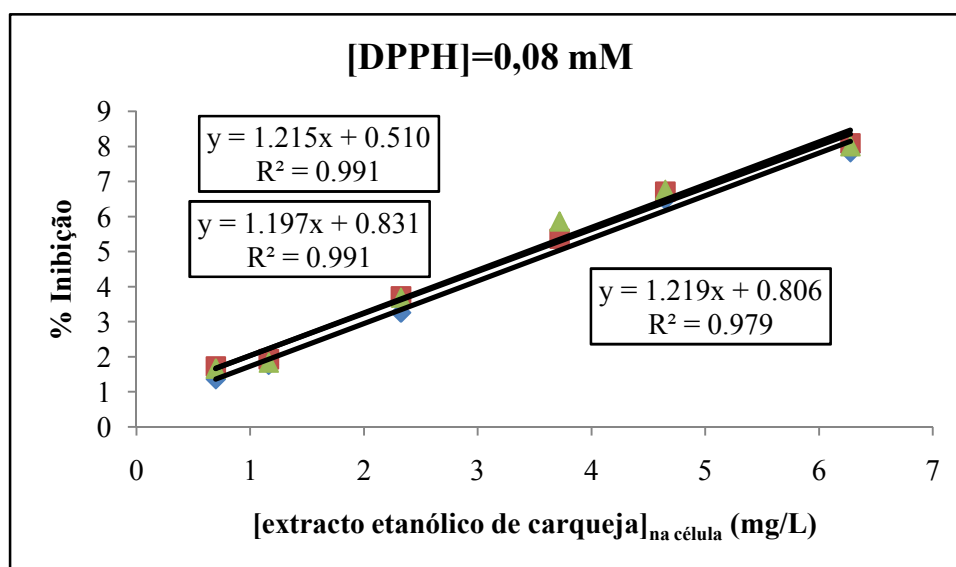
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
85,570	83,285	90,700	86,518 ± 3,797
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
1,028	1,061	0,973	1,021 ± 0,044



**Figura 37:** Extracto etanólico de carqueja, para [DPPH]=0,1242 mM.

**Tabela 6:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de carqueja para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
54,679	54,576	52,573	53,943 ± 1,188
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
0,970	0,974	1,011	0,985 ± 0,023



**Figura 38:** Extracto etanólico de carqueja, para  $[DPPH]=0,08$  mM.

**Tabela 7:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de carqueja para  $[DPPH]=0,08$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
40,709	41,053	40,349	40,704 ± 0,352
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
0,911	0,906	0,920	0,912 ± 0,007

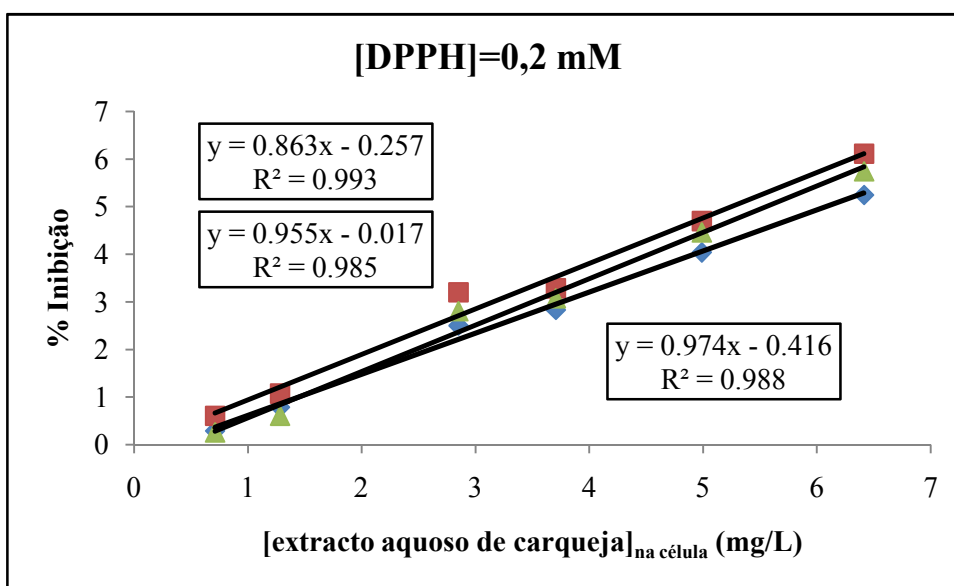
**Tabela 8:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de carqueja.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	60,388 ± 1,779	MODERADA
AAI	0,973 ± 0,025	

É necessária uma concentração de 60,388 mg/L de extracto etanólico de carqueja para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto etanólico de carqueja tem uma actividade antioxidante moderada.

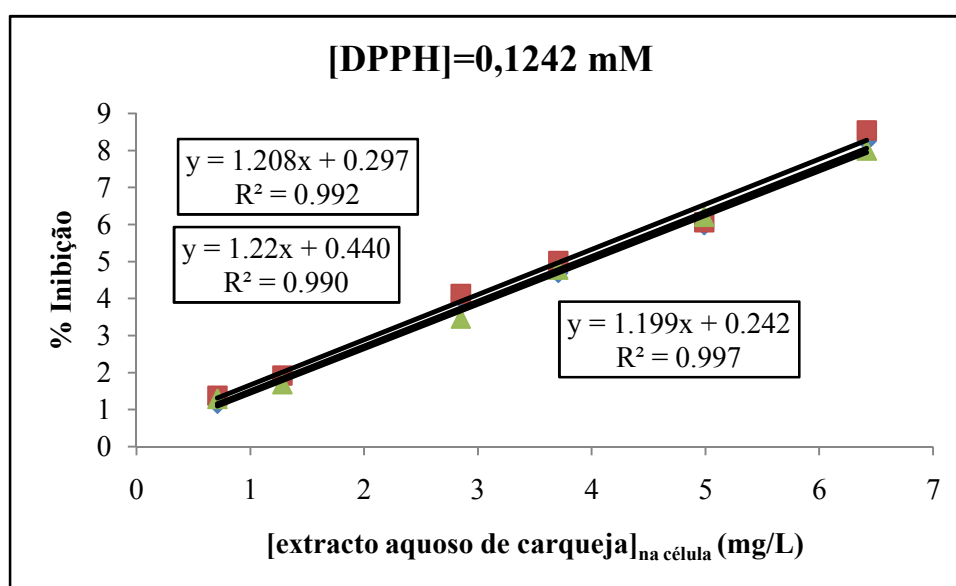
### 1.2.3. Extracto aquoso de carqueja



**Figura 39:** Extracto aquoso de carqueja, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 9:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do extracto aquoso de carqueja para [DPPH]=0,2 mM.

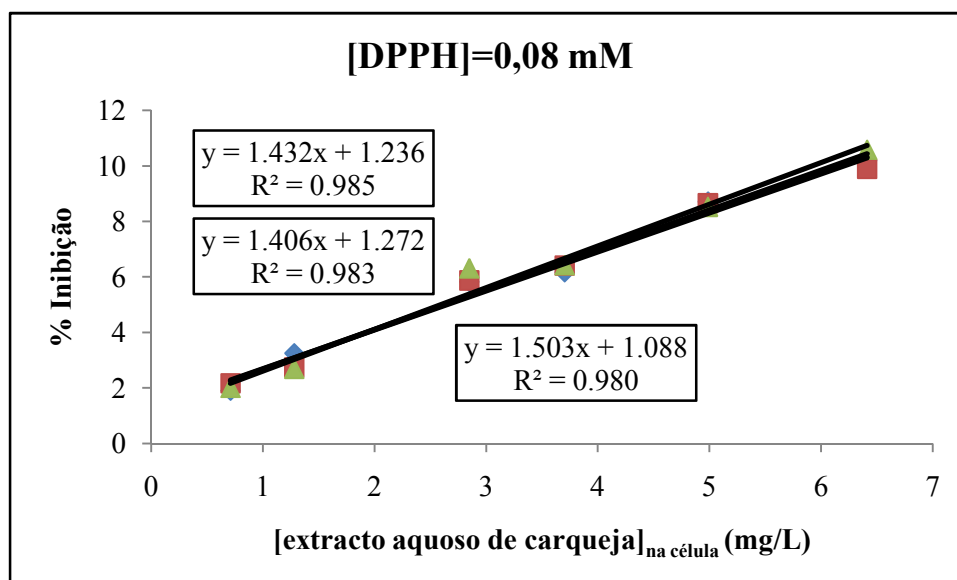
IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
58,195	52,330	51,735	54,087 ± 3,570
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
1,291	1,442	1,453	1,395 ± 0,091



**Figura 40:** Extracto aquoso de carqueja, para [DPPH]=0,1242 mM.

**Tabela 10:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do extracto aquoso de carqueja para [DPPH]=0,1242 mM.

IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
41,124	40,623	41,472	41,073 ± 0,427
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
1,340	1,360	1,330	1,344 ± 0,015



**Figura 41:** Extracto aquoso de carqueja, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 11:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de carqueja para [DPPH]=0,08 mM.

$IC_{50}$ – A (mg/L)	$IC_{50}$ – B (mg/L)	$IC_{50}$ – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
34,032	34,634	32,543	33,736 ± 1,077
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
1,138	1,119	1,189	1,148 ± 0,036

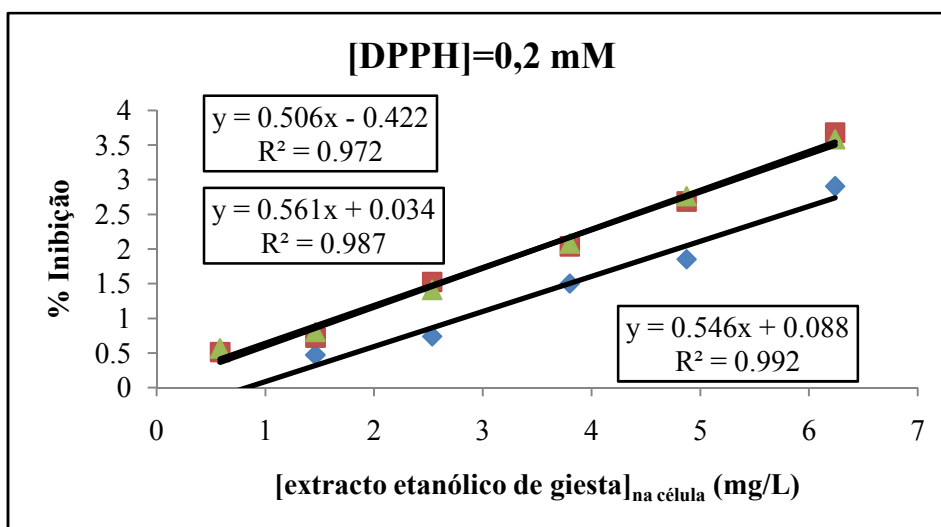
**Tabela 12:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de carqueja.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	42,965 ± 1,691	FORTE
AAI	1,296 ± 0,047	

É necessária uma concentração de 42,965 mg/L de extracto aquoso de carqueja para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto aquoso de carqueja tem uma actividade antioxidante forte.

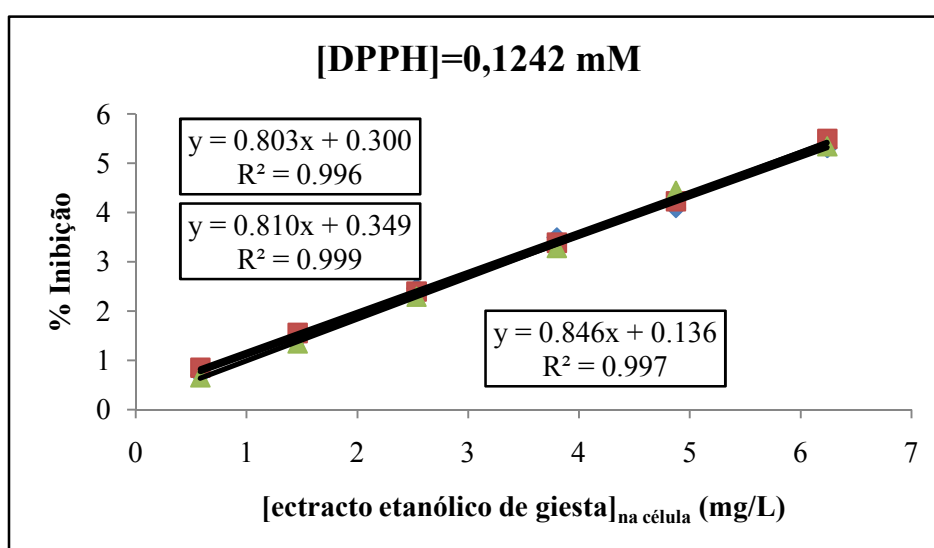
### 1.2.4. Extracto etanólico de giesta



**Figura 42:** Extracto etanólico de giesta, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 13:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto etanólico de giesta para [DPPH]=0,2 mM.

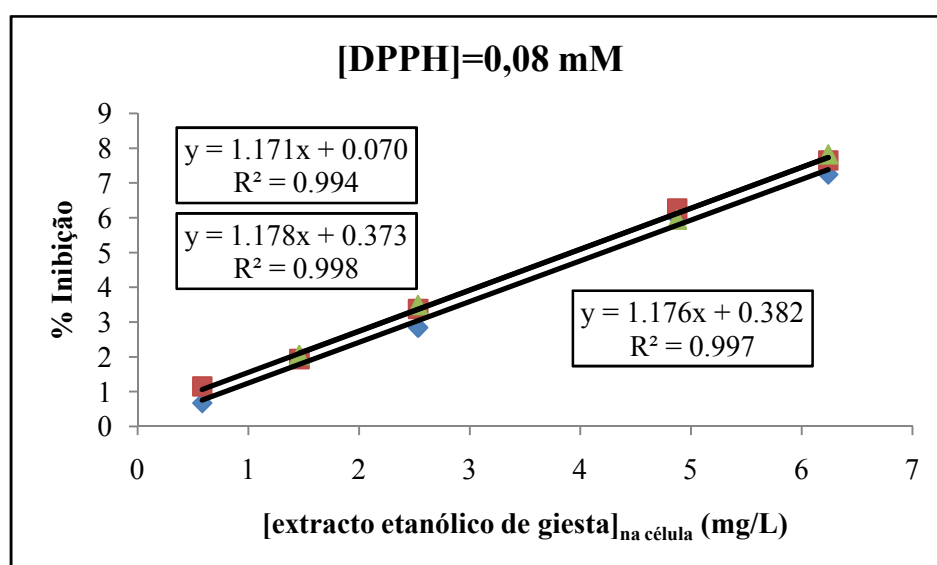
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
99,609	88,970	91,314	93,298 ± 5,590
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
0,824	0,927	0,904	0,885 ± 0,054



**Figura 43:** Extracto etanólico de giesta, para [DPPH]=0,1242 mM.

**Tabela 14:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do extracto etanólico de giesta para [DPPH]=0,1242 mM.

IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
61,838	61,267	58,905	60,670 ± 1,555
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
0,851	0,860	0,892	0,867 ± 0,022



**Figura 44:** Extracto etanólico de giesta, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 15:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do extracto etanólico de giesta para [DPPH]=0,08 mM.

IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
42,620	42,117	42,184	42,307 ± 0,273
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
0,831	0,842	0,842	0,838 ± 0,006

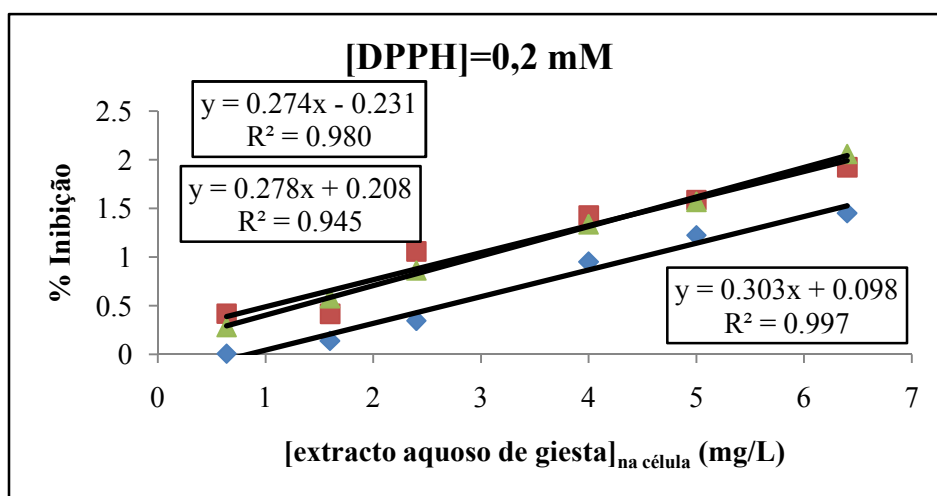
**Tabela 16:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do extracto etanólico de giesta.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
IC <sub>50</sub> (mg/L)	65,425 ± 2,473	MODERADA
AAI	0,863 ± 0,027	

É necessária uma concentração de 65,425 mg/L de extracto etanólico de giesta para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto etanólico de giesta tem uma actividade antioxidante moderada.

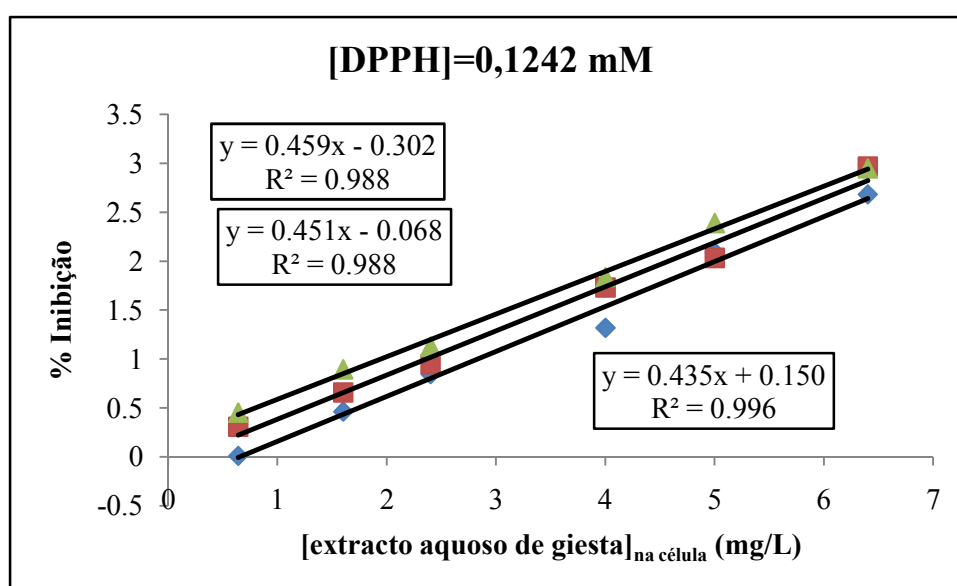
### 1.2.5. Extracto aquoso de giesta



**Figura 45:** Extracto aquoso de giesta, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 17:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de giesta para  $[DPPH]=0,2$  mM.

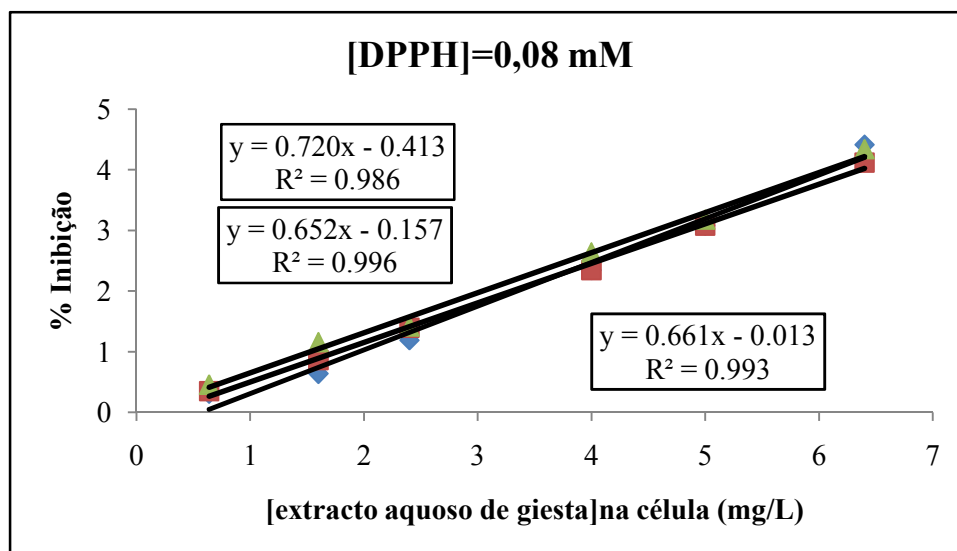
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
183,059	179,106	164,421	175,529 ± 9,821
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
0,429	0,440	0,480	0,450 ± 0,027



**Figura 46:** Extracto aquoso de giesta, para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

**Tabela 18:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de giesta para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
109,495	110,869	114,360	111,575 ± 2,508
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
0,458	0,453	0,439	0,450 ± 0,010



**Figura 47:** Extracto aquoso de giesta, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 19:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de giesta para [DPPH]=0,08 mM.

$IC_{50}$ – A (mg/L)	$IC_{50}$ – B (mg/L)	$IC_{50}$ – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
69,961	76,834	75,641	74,145 ± 3,672
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
0,483	0,440	0,448	0,457 ± 0,023

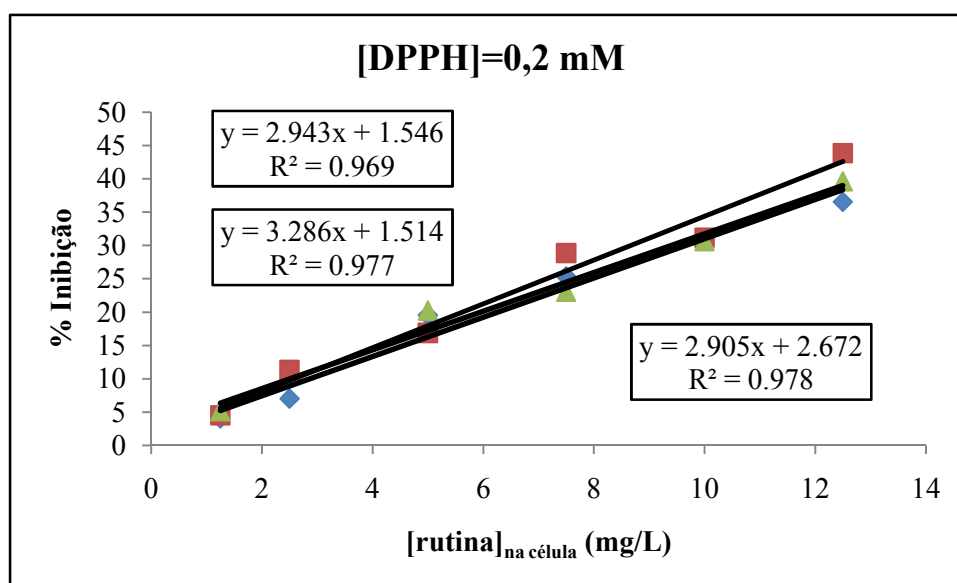
**Tabela 20:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do extracto aquoso de giesta.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	120,416 ± 5,334	POBRE
AAI	0,452 ± 0,020	

É necessária uma concentração de 120,416 mg/L de extracto aquoso de giesta para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o extracto aquoso de giesta tem uma actividade antioxidante pobre.

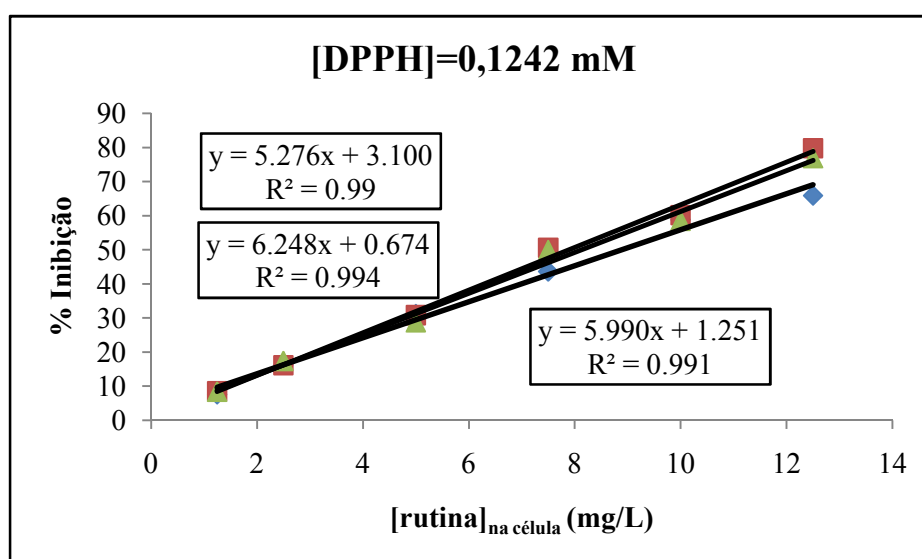
### 1.2.6. Rutina



**Figura 48:** Rutina, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 21:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) da rutina para [DPPH]=0,2mM.

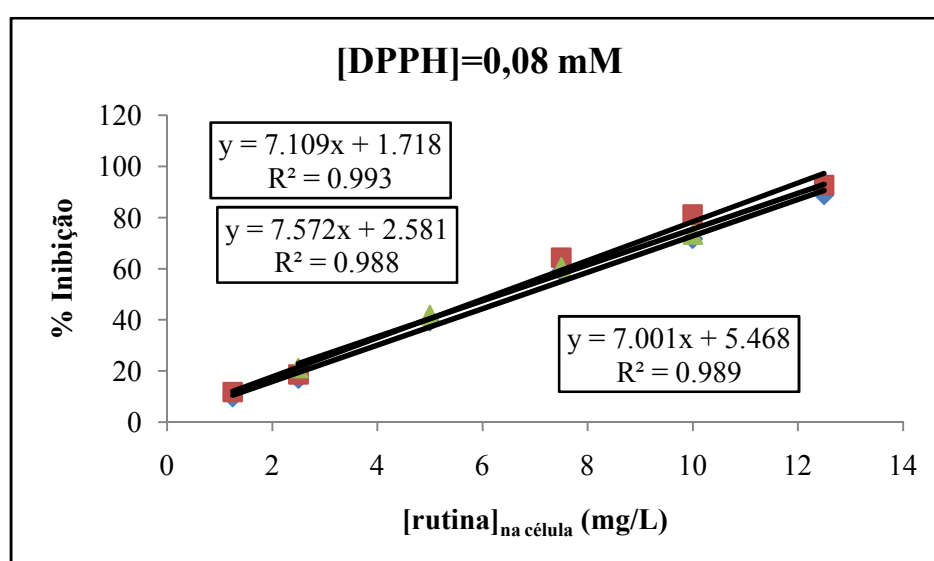
IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
16,462	14,755	16,291	15,836 ± 0,940
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
4,509	5,047	4,576	4,711 ± 0,293



**Figura 49:** Rutina, para [DPPH]=0,1242 mM.

**Tabela 22:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da rutina para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
8,888	7,895	8,138	8,307 ± 0,518
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
5,454	6,153	5,976	5,861 ± 0,363



**Figura 50:** Rutina, para  $[DPPH]=0,08$  mM.

**Tabela 23:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da rutina para  $[DPPH]=0,08$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
6,792	6,262	6,360	6,471 ± 0,282
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
5,539	6,005	5,906	5,817 ± 0,246

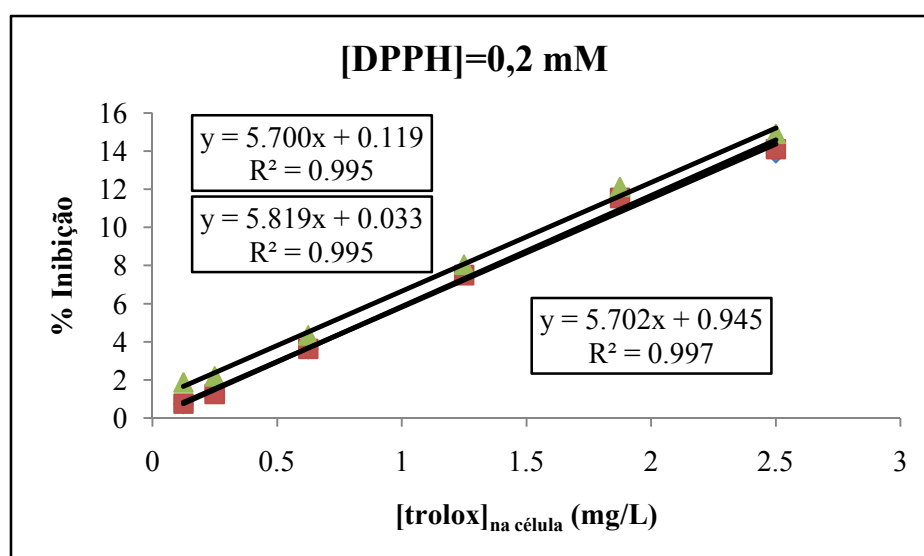
**Tabela 24:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) da rutina.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
IC <sub>50</sub> (mg/L)	10,205 ± 0,580	MUITO FORTE
AAI	5,463 ± 0,301	

É necessária uma concentração de 10,205 mg/L de rutina para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que a rutina tem uma actividade antioxidante muito forte.

### 1.2.7. Trolox



**Figura 51:** Trolox, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 25:** Parâmetros da actividade antioxidante (IC<sub>50</sub> e AAI) do trolox para [DPPH]=0,2 mM.

IC <sub>50</sub> – A (mg/L)	IC <sub>50</sub> – B (mg/L)	IC <sub>50</sub> – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
8,750	8,585	8,603	8,646 ± 0,090
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
7,295	7,442	7,483	7,407 ± 0,099

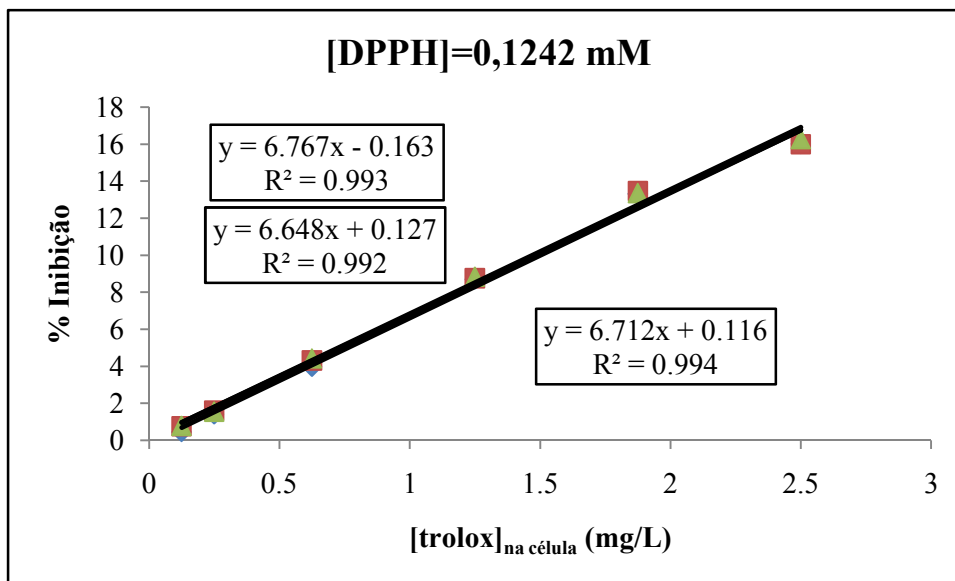


Figura 52: Trolox, para [DPPH]=0,1242 mM.

Tabela 26: Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do trolox para [DPPH]=0,1242 mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
7,412	7,502	7,431	7,448 ± 0,047
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
7,186	7,106	7,175	7,156 ± 0,043

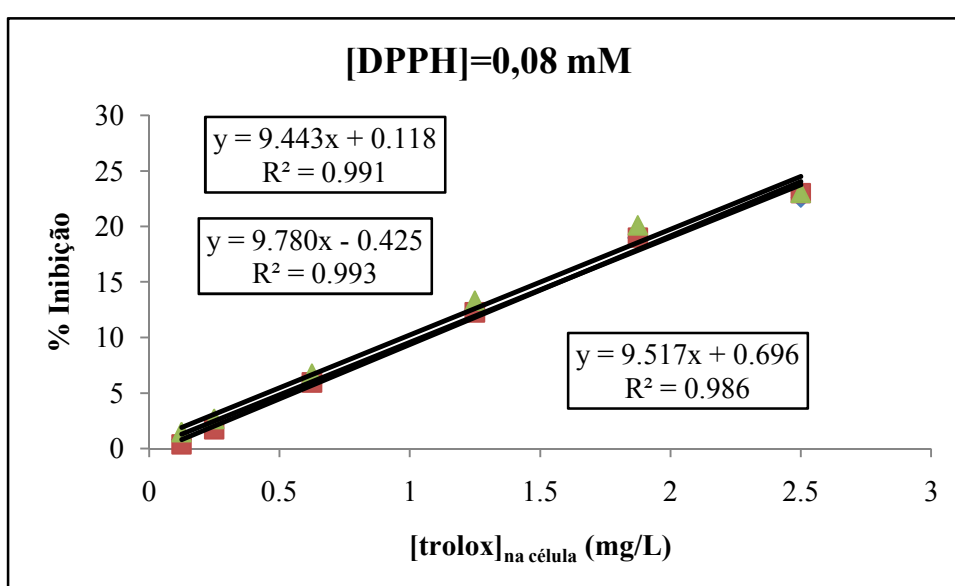


Figura 53: Trolox, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 27:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do trolox para  $[DPPH]=0,08$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
5,282	5,156	5,180	5,206 ± 0,067
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
6,879	7,019	7,058	6,985 ± 0,094

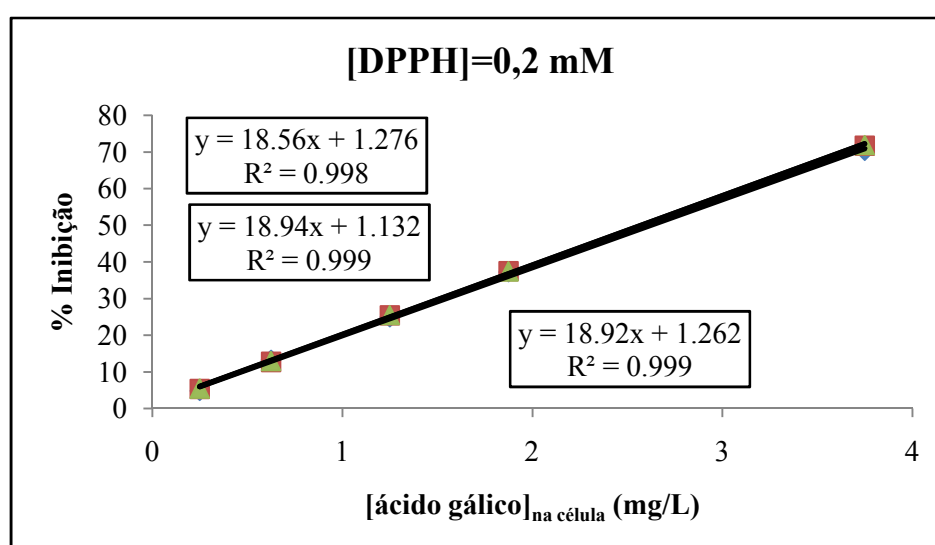
**Tabela 28:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do trolox.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	7,100 ± 0,083	MUITO FORTE
AAI	7,183 ± 0,079	

É necessária uma concentração de 7,100 mg/L de trolox para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o trolox tem uma actividade antioxidante muito forte.

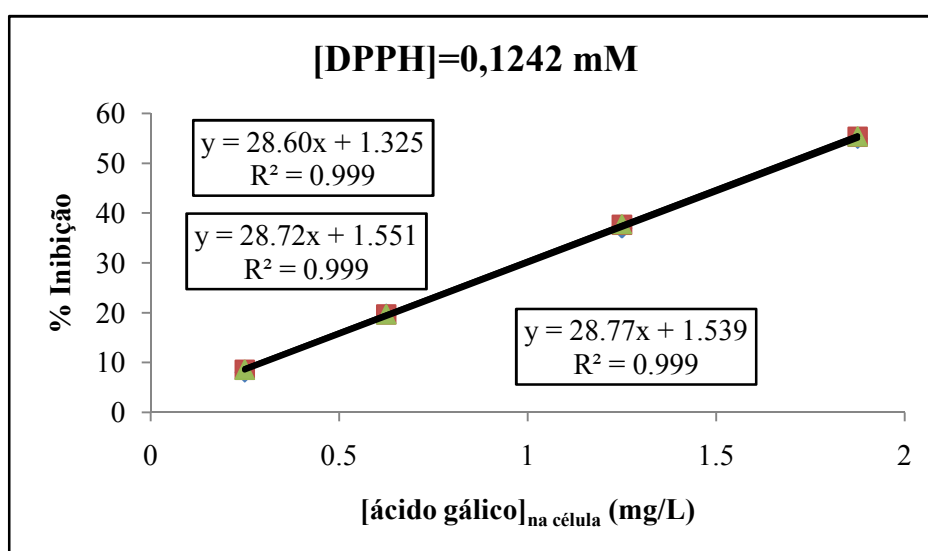
### 1.2.8. Ácido Gálico



**Figura 54:** Ácido gálico, para  $[DPPH]=0,2$  mM.

**Tabela 29:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do ácido gálico para  $[DPPH]=0,2$  mM.

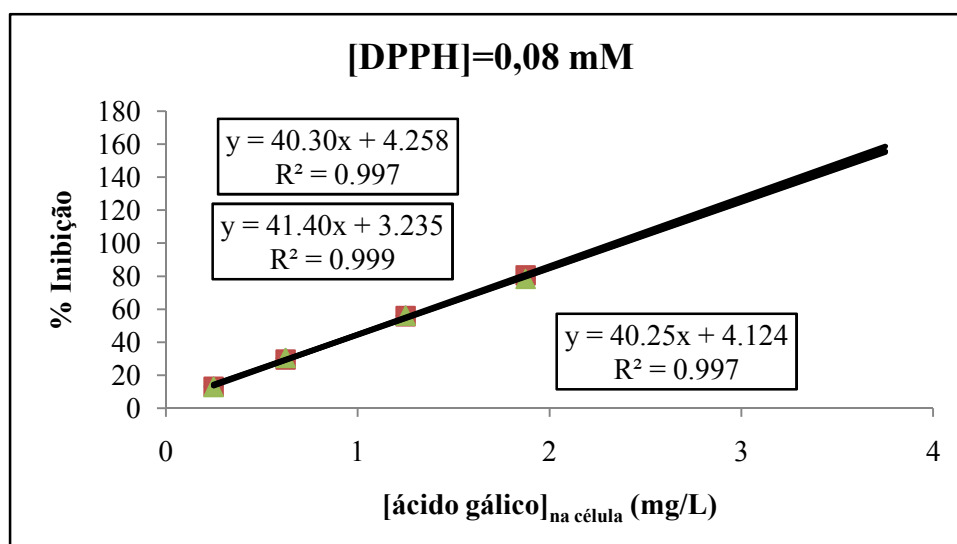
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
2,624	2,579	2,576	2,593 ± 0,027
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
30,512	31,237	31,340	31,030 ± 0,452



**Figura 55:** Ácido gálico, para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

**Tabela 30:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do ácido gálico para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
1,702	1,687	1,684	1,691 ± 0,009
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
31,525	31,819	31,922	31,755 ± 0,206



**Figura 56:** Ácido gálico, para [DPPH]=0,08 mM.

**Tabela 31:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do ácido gálico para [DPPH]=0,08 mM.

$IC_{50}$ – A (mg/L)	$IC_{50}$ – B (mg/L)	$IC_{50}$ – C (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
1,135	1,129	1,140	1,135 ± 0,005
AAI – A	AAI – B	AAI – C	Média ± Desvio Padrão
29,493	29,434	29,227	29,385 ± 0,140

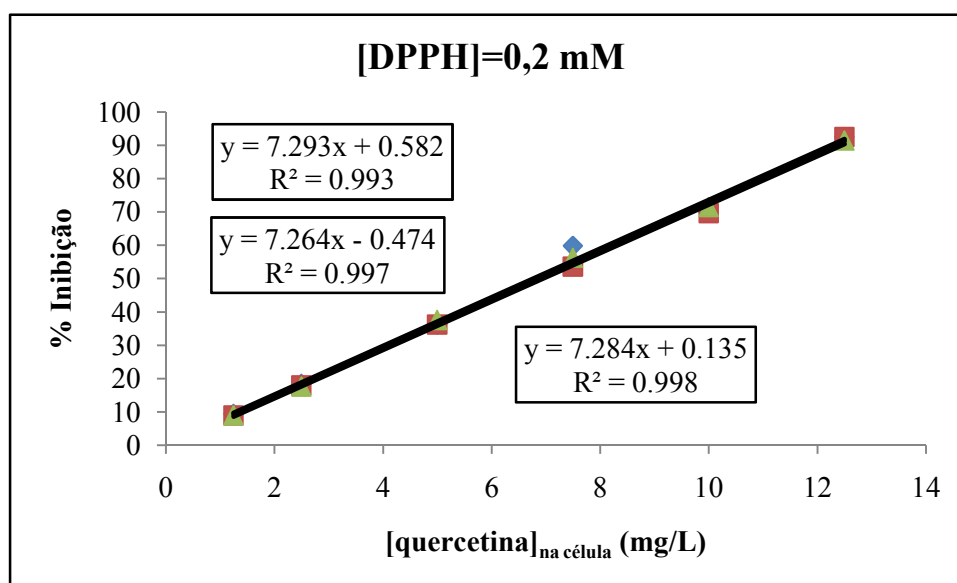
**Tabela 32:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) do ácido gálico.

	Média ± Desvio Padrão	Actividade antioxidante
$IC_{50}$ (mg/L)	1,806 ± 0,020	MUITO FORTE
AAI	30,723 ± 0,266	

É necessária uma concentração de 1,806 mg/L de ácido gálico para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que o ácido gálico tem uma actividade antioxidante muito forte.

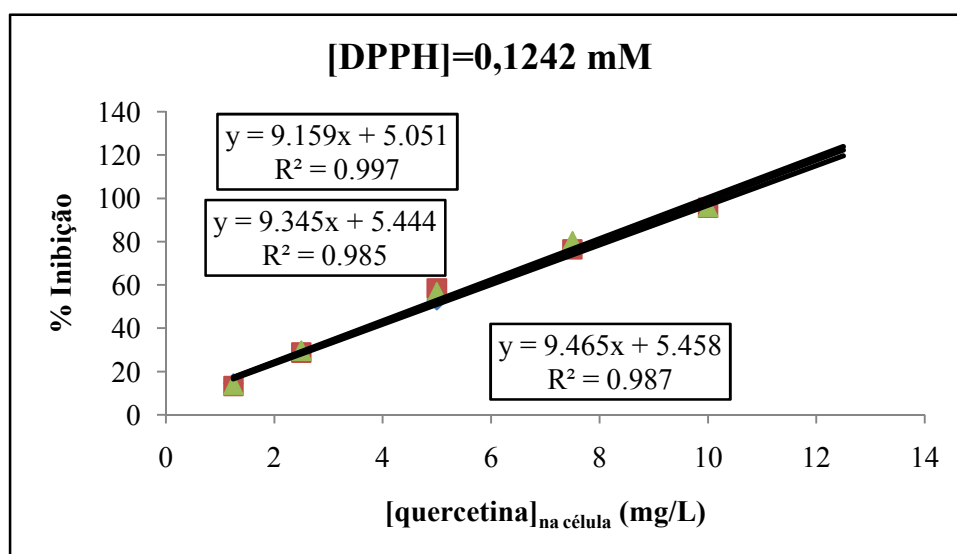
### 1.2.9. Quercetina



**Figura 57:** Quercetina, para [DPPH]=0,2 mM.

**Tabela 33:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da quercetina para [DPPH]=0,2 mM.

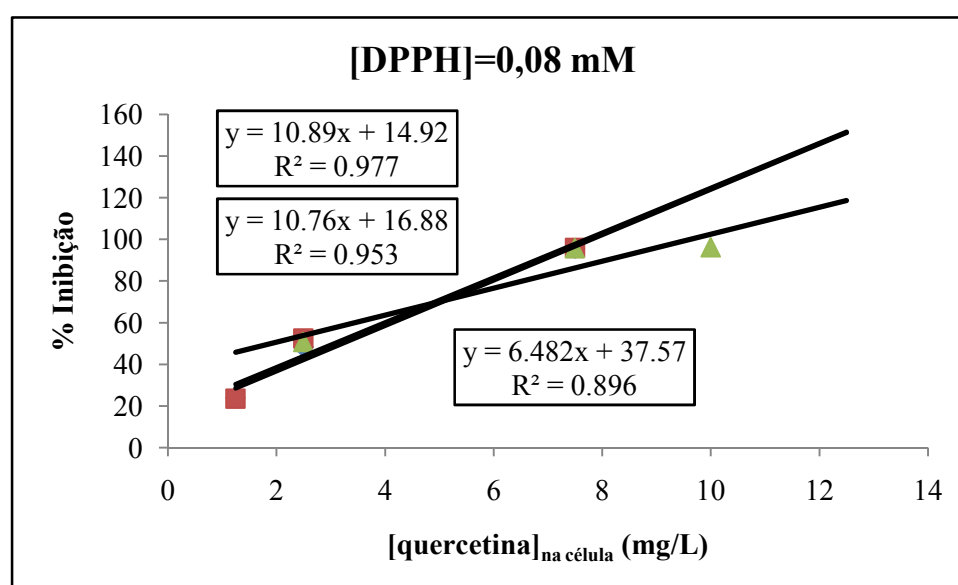
$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
6,775	6,949	6,845	6,856 ± 0,087
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
12,938	12,655	12,828	12,807 ± 0,143



**Figura 58:** Quercetina, para [DPPH]=0,1242 mM.

**Tabela 34:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da quercetina para  $[DPPH]=0,1242$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
4,908	4,768	4,706	4,794 ± 0,103
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
12,648	13,025	13,180	12,951 ± 0,274



**Figura 59:** Quercetina, para  $[DPPH]=0,08$  mM.

**Tabela 35:** Parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da quercetina para  $[DPPH]=0,08$  mM.

$IC_{50} - A$ (mg/L)	$IC_{50} - B$ (mg/L)	$IC_{50} - C$ (mg/L)	Média ± Desvio Padrão (mg/L)
3,218	3,077	1,917	2,737 ± 0,714
AAI - A	AAI - B	AAI - C	Média ± Desvio Padrão
10,482	10,964	17,489	12,978 ± 3,914

**Tabela 36:** Resumo dos parâmetros da actividade antioxidante ( $IC_{50}$  e AAI) da quercetina.

	<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>	<b>Actividade antioxidante</b>
<b><math>IC_{50}</math> (mg/L)</b>	4,796 $\pm$ 0,505	MUITO FORTE
<b>AAI</b>	12,912 $\pm$ 1,443	

É necessária uma concentração de 4,796 mg/L de quercetina para promover 50 % de percentagem de inibição.

Como base no AAI, conclui-se que quercetina tem uma actividade antioxidante muito forte.