



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Atividade antioxidante de extratos de plantas

Diogo Miguel Pereira Nicolau

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Lúcia Almeida da Silva
Co-orientador: Prof. Doutora Carla Gaiolas

Covilhã, Outubro de 2013

*“O cientista não é o
homem que fornece as
verdadeiras respostas,
é quem faz as
verdadeiras perguntas.”*

Claude Lévi-Strauss

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Lúcia Silva, pelo conhecimento que me transmitiu, pelas dúvidas e correções na metodologia do trabalho, por toda a atenção, disponibilidade e simpatia demonstrada neste ano. À minha co-orientadora, Professora Doutora Carla Gaiolas pela disponibilidade e ajuda na realização do trabalho laboratorial.

À Professora Doutora Rosalina Mata da Faculdade de Ciências da Universidade Agostinho Neto em Luanda, pelo envio das amostras de alecrim de Angola, agradeço ainda à Eng.^a Violeta Lopes do Banco Português de Germoplasma Vegetal de Braga, pelo envio das sementes de funcho.

A todos os meus colegas de laboratório por toda a entreaajuda demonstrada.

Aos meus colegas de curso, por todo o apoio, amizade, companheirismo e dúvidas, que surgiram ao longo dos anos nesta instituição.

Aos meus amigos pela amizade e apoio durante vários anos.

À minha mãe, Alice Pereira, pelo amor e por todo o esforço e tempo dedicado; à minha tia, Lídia Sainhas, pela imensa participação na minha educação, pelo apoio sempre demonstrado e por toda a ajuda em variados aspetos, ao meu padrinho; José Sainhas, pelos valores transmitidos, pelo tempo despendido na minha educação, e pela imensa disponibilidade ao longo da minha vida; à minha madrinha, Lurdes Pereira e ao meu tio Nuno Passarinha e à minha avó, Anunciação Mendes, pelo incentivo na realização deste trabalho e por o apoio; à minha afilhada, Beatriz Passarinha, pela vontade que me transmite em ser um exemplo, e pela alegria e ingenuidade da juventude. A todos, um quente obrigado, por todos os valores transmitidos, e por toda a influência positiva que sempre tiveram na minha vida.

A todos, o meu profundo agradecimento, pela conclusão de uma etapa de sucesso na minha vida. Um muito obrigado.

Resumo

Neste trabalho foram estudadas duas plantas, o *Vitex agnus-castus* L., vulgarmente conhecido como alecrim de Angola e o *Foeniculum vulgare* Mill, uma planta muito conhecida pelo seu uso na culinária, cujo nome comum é funcho.

No alecrim de Angola procedeu-se à obtenção de diferentes extratos, aquosos e orgânicos, onde usando um método de polaridade crescente, obteve-se os extratos com hexano, diclorometano, acetato de etilo, e etanol. Foi avaliada a sua ação antioxidante pelo método do DPPH, e quantificou-se os fenóis totais e os flavonoides totais dos extratos de acetato de etilo e etanol por um método colorimétrico.

No funcho apenas foi obtido o extrato aquoso por hidrodestilação e o seu óleo essencial. Foi avaliada a sua ação antioxidante, os fenóis totais e flavonoides totais, tendo em conta a sua origem geográfica. Seguidamente procedeu-se à análise por HPLC-DAD para identificação dos compostos presentes na planta.

A atividade antioxidante no alecrim de Angola foi fraca no extrato de hexano, moderada no de Diclorometano e acetato de etilo e forte no de etanol e no extrato aquoso. Os resultados de fenóis totais para o extrato de acetato de etilo foram 113,15 mg/g e para o etanol 98,99 mg/g, para os flavonoides foi de 75,02 mg/g e 54,71 mg/g respetivamente.

Nos extratos aquosos de funcho a atividade antioxidante foi baixa para todas as amostras, os fenóis totais estiveram entre 36,28 e 48,42 mg/g e os flavonoides totais entre 11,00 e 12,50 mg/g, tendo em conta a origem geográfica das amostras. Na análise por HPLC-DAD foram identificados dois compostos: o ácido cafeico e o ácido tânico.

Palavras-chave

Vitex agnus-castus L., *Foeniculum vulgare* Mill, atividade antioxidante, DPPH, fenóis, flavonoides, HPLC-DAD.

Abstract

In this work, two plants have been studied: *Vitex agnus-castus* L. usually known for agnus castus or monk's pepper, and *Foeniculum vulgare* Mill, a plant well known for the culinary uses, with the common name of fennel.

In the agnus castus, the organic extracts were obtained by a method of growing polarity, using hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and ethanol, and the water extract by hydrodistillation. The antioxidant activity was evaluated by the method of DPPH, and the total phenol and total flavonoids of the ethyl acetate and ethanol were quantified by a colorimetric method.

In fennel, the water extract and essential oil were obtained by hydrodistillation. It was evaluated the antioxidant activity, total phenol and total flavonoids, from different geographic location of the plant. Finally the analysis with HPLC-DAD was made, for identification of the compounds of fennel.

The antioxidant activity of agnus castus was weak in the hexane extract, moderate in dichloromethane and ethyl acetate and strong in the ethanol and water extract. The results for total phenols were 113,15 mg/g for ethyl acetate and 98,99 for the ethanol extract, for total flavonoids were 75,02 mg/g and 54,71 mg/g respectively.

In the aqueous extract of fennel, the antioxidant activity was weak for all the samples, the total phenol were from 36,28 and 48,42 mg/g and total flavonoid between 11,00 and 12,50 mg/g, according to the sample geographic location. In the analysis with HPLC-DAD, two compounds were identified: caffeic acid and tannic acid.

Keywords

Vitex agnus-castus L., *Foeniculum vulgare* Mill, antioxidant activity, DPPH, phenols, flavonoids, HPLC-DAD.

Índice

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - OBJETIVO DO TRABALHO	1
1.2 - PLANTAS USADAS	1
1.2.1 - ALECRIM DE ANGOLA.....	1
1.2.1.1 - Características	1
1.2.1.2 - Uso na Medicina Popular	2
1.2.1.3 - Evidências Experimentais	3
1.2.2 - Funcho	3
1.2.2.1 - Características	3
1.2.2.2 - Uso na Culinária	5
1.2.2.4 - Evidências Experimentais	6
1.3- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	7
1.3.1 RADICAIS LIVRES.....	7
1.3.1.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	8
1.3.1.2 DANOS OXIDATIVOS DE PROTEÍNAS E DNA	9
1.3.2 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	9
1.3.3 STRESSE OXIDATIVO	10
1.3.4 DETERMINAÇÃO LABORATORIAL	10
1.3.4.1 DPPH	10
1.3.4.2 FENÓIS TOTAIS.....	11
1.3.4.3 FLAVONOIDES TOTAIS	12
1.3.5 RELAÇÃO DOS FENÓIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	13
1.4 - ANÁLISE DOS EXTRATOS POR HPLC-DAD.....	14
2 - MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 - COLHEITA.....	15
2.1.1 - Alecrim de Angola	15
2.1.2 - Funcho.....	15
2.2 - SECAGEM	15
2.3 - EXTRATOS ORGÂNICOS	16
2.4 - EXTRATO AQUOSO.....	17
2.5 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS	18
2.6 - DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS.....	19
2.7 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
2.7.1 - Diluições usadas na preparação de extratos de alecrim de Angola	21
2.7.2 - Diluições usadas na preparação de extratos de funcho	21
2.8 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS POR HPLC-DAD	22

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1 - RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES	23
3.1.1 - Alecrim de Angola	23
3.1.2 - Funcho.....	24
3.2 - FENÓIS TOTAIS	25
3.2.1 - Alecrim de Angola	25
3.2.2 - Funcho.....	26
3.2.3 - Comparação de fenóis totais entre os extratos de alecrim de Angola e os de funcho ...	27
3.3 - FLAVONOIDES TOTAIS	27
3.3.1 - Alecrim de Angola	28
3.3.2 - Funcho.....	29
3.3.3 - Comparação de flavonoides totais entre os extratos de alecrim de Angola e os de funcho	29
3.4 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
3.4.1 - Alecrim de Angola	33
3.4.2 - Funcho.....	35
3.4.3 - Correlação entre fenóis, flavonoides e atividade antioxidante	36
3.5 - ANÁLISE POR HPLC-DAD.....	37
4 - CONCLUSÃO.....	38
5 - BIBLIOGRAFIA.....	41
6 - ANEXOS	46
ANEXO 1 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	46
ANEXO 2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
ANEXO 3 - DPPH REMANESCENTE	53
ANEXO 4 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC	58

Lista de Figuras

Figura 1 - Árvore (à esquerda) e flores (à direita) do alecrim de Angola. [6,7]

Figura 2 - Diterpenos com atividade biológica isolados a partir do alecrim de Angola. [8]

Figura 3 - Funcho (em cima), bolbo (em baixo, à direita) e sementes (em baixo, à esquerda). [14-16]

Figura 4 - Alguns compostos presentes no óleo essencial de funcho.

Figura 5 - Etapas da peroxidação lipídica.

Figura 6 - Reações com antioxidantes primários.

Figura 7 - Reação do DPPH na presença de um antioxidante. [43]

Figura 8 - Diferente coloração do radical livre DPPH (1) e do DPPH reduzido (2).

Figura 9 - Algumas classes de flavonoides. [46]

Figura 10 - Montagem laboratorial para as extrações com solventes, usando um extrator de Soxhlet.

Figura 11 - Montagem laboratorial para a hidrodestilação, usando um Clevenger.

Figura 12 - Exemplo de gráfico % inibição vs [amostra].

Figura 13 - Curva de calibração do ácido gálico para a determinação dos fenóis totais.

Figura 14 - Gráfico comparativo dos fenóis totais, entre o alecrim de Angola e o funcho.

Figura 15 - Curva de calibração da quercetina para a determinação dos flavonoides totais.

Figura 16 - Gráfico comparativo dos flavonoides totais, entre o alecrim de Angola e o funcho.

Figura 17 - Curva de calibração do DPPH.

Figura 18 - Exemplo de uma representação % Inibição vs [amostra].

Figura 19 - Exemplo de uma representação do DPPH Remanescente vs concentração da amostra.

Figura 20 - Gráfico com a avaliação das % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH.

Figura 21 - Gráfico comparativo entre os fenóis e flavonoides do alecrim de Angola e do funcho.

Figura 22 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de hexano do alecrim de Angola.

Figura 23 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de diclorometano do alecrim de Angola.

Figura 24 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de etanol do alecrim de Angola.

Figura 25 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de acetato de etilo do alecrim de Angola.

Figura 26 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato aquoso do alecrim de Angola.

Figura 27 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09564 das sementes de funcho.

Figura 28 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09576 das sementes de funcho.

Figura 29 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09578 das sementes de funcho.

Figura 30 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09586 das sementes de funcho.

Figura 31 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09573 das sementes de funcho.

Figura 32 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de hexano do alecrim de Angola.

Figura 33 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de diclorometano do alecrim de Angola.

Figura 34 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de acetato de etilo do alecrim de Angola.

Figura 35 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de etanol do alecrim de Angola.

Figura 36 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso do alecrim de Angola.

Figura 37 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09564 das sementes de funcho.

Figura 38 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09576 das sementes de funcho.

Figura 39 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09578 das sementes de funcho.

Figura 40 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09586 das sementes de funcho.

Figura 41 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09573 das sementes de funcho.

Figura 42 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 254 nm.

Figura 43 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 270 nm.

Figura 44 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 280 nm.

Figura 45 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 329 nm.

Figura 46 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 254 nm.

Figura 47 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 270 nm.

Figura 48 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 280 nm.

Figura 49 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 329 nm.

Figura 50 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 254 nm.

Figura 51 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 270 nm.

Figura 52 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 280 nm.

Figura 53 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 329 nm.

Figura 54 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 254 nm.

Figura 55 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 270 nm.

Figura 56 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 280 nm.

Figura 57 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 329 nm.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Códigos e correspondente origem geográfica das sementes de funcho.

Tabela 2 - Peso das sementes de funcho.

Tabela 3 - Interpretação dos valores de AAI.

Tabela 4 - Rendimentos das extrações no alecrim de Angola.

Tabela 5 - Rendimentos da hidrodestilação para as sementes de funcho.

Tabela 6 - Volumes de óleo essencial recolhido.

Tabela 7 - Fenóis totais para as folhas de alecrim de Angola.

Tabela 8 - Fenóis totais para as sementes de funcho.

Tabela 9 - Flavonoides totais do alecrim de Angola, expressos em equivalentes de quercetina (mg/g).

Tabela 10 - Flavonoides totais para as sementes de funcho, expressos em equivalentes de quercetina (mg/g).

Tabela 11- Valores de IC50 e AAI para todos os extratos de alecrim de Angola e para todas as concentrações de DPPH.

Tabela 12- Valores de IC50 e AAI para todas as amostras de funcho e para todas as concentrações de DPPH.

Lista de Acrónimos

AAI	Índice de atividade antioxidante
Abs	Absorvância
DAD	Detetor de rede de díodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
I%	Porcentagem de efeito inibitório
IC ₅₀	Capacidade de inibição de 50% da concentração inicial
ROS/ERO	Espécies reativas de oxigênio
UV	Ultra violeta
PGE ₂	Prostaglandina E2
SPM	Síndrome pré-menstrual
TROLOX	2,5,7,8 tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

1 - Introdução

1.1 - Objetivo do Trabalho

Com a vasta utilização e comercialização de substâncias antioxidantes, todos os dias surgem novos e mais baratos produtos no mercado. Neste estudo pretende-se determinar as atividades antioxidantes das folhas de alecrim de Angola e das sementes de funcho utilizando o método do DPPH. Este mesmo estudo, será complementado com a determinação de fenóis e flavonoides usando métodos colorimétricos.

1.2 - Plantas usadas

Desde os primórdios da civilização e até mesmo no mundo animal, as plantas muitas vezes foram usadas como medicamentos para muitos problemas. Recentemente, o interesse na desmistificação das plantas medicinais tem crescido, o que tem levado a um aumento de artigos científicos na área da investigação de extratos de plantas. As plantas sempre foram utilizadas ao longo do tempo para o tratamento de várias patologias, sendo vulgarmente consumidas como infusões, mas também como xaropes, pastas, cozidas, entre outras formas. Nem sempre as plantas foram usadas para a cura de patologias, o seu uso como veneno, é bastante comum na história, como por exemplo o veneno curare, extraído da planta *Strychnos toxifera* e usado nas pontas das flechas por uma tribo sul-americana. [1,2]

1.2.1 - Alecrim de Angola

1.2.1.1 - Características

O alecrim de Angola, também conhecido por anho-casto, árvore casta e pimenta de monge (*Vitex agnus-castus* L.) é uma planta pertencente à família das *Verbenaceae*. É considerado um grande arbusto, podendo crescer até aos 7 metros, com flores roxas bastante características, como exemplificado na figura 1, e um cheiro parecido a pimenta. [3,4]

É nativo da região do Mediterrâneo e Ásia Ocidental, mas é cultivado em praticamente qualquer área subtropical, encontra-se em Portugal em sebes, margens dos rios e terrenos pantanosos, especialmente na zona de Trás-os-Montes. [5]

Os seus principais constituintes são: casticina (0.02 a 0.20 por cento), um flavonoide lipófilo, flavonas hidrófilas como a orientina, homo-orientina, isovitexina entre outros, agnósido (0.02 a 0.40 por cento), um glucósido de iridóide, aucubina, fitostrogénios, diterpenos dicíclicos, triglicéridos, e o óleo essencial com sabineno, α -pineno, β -pineno, 4-terpineol e sesquiterpenos. Na figura 2, encontram-se alguns diterpenos com atividade biológica, isoladas a partir do alecrim de Angola. [5]



Figura 1 - Árvore (à esquerda) e flores (à direita) do alecrim de Angola. [6,7]

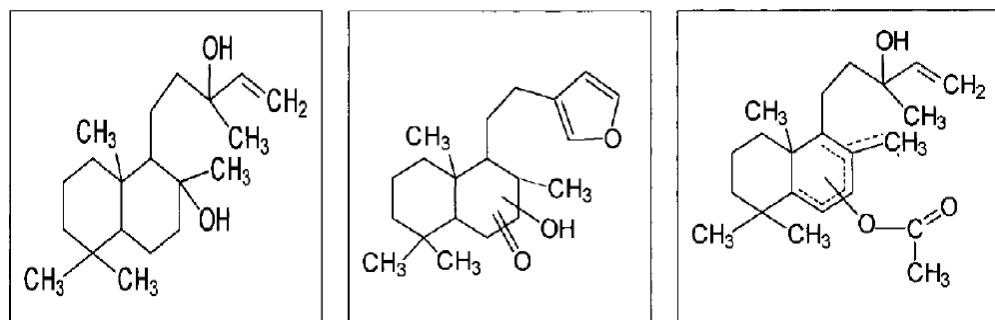


Figura 2 - Diterpenos com atividade biológica isolados a partir do alecrim de Angola. [8]

1.2.1.2 - Uso na Medicina Popular

O alecrim de Angola tem sido muito usado na medicina popular, são utilizados extratos dos frutos, no intuito de tratar problemas menstruais, principalmente em sintomas de pré-menopausa, deficiências do corpo lúteo, são ainda usados em outras patologias como lactação

insuficiente, tratamento do acne e infertilidade. As suas folhas foram, em outros tempos usadas como substituto da pimenta, principalmente em Itália. [9,10]

Na Turquia, um dos países onde o alecrim de Angola tem mais estudos por parte da comunidade científica, é comumente utilizado como diurético, carminativo, sedativo e anafrodisíaco. [3]

1.2.1.3 - Evidências Experimentais

Os frutos, assim como as flores e folhas do alecrim de Angola contêm ácidos fenólicos e derivados, assim como flavonoides, taninos, iridóides e diterpenóides.[4]

Por outro lado, verificou-se que o fracionamento dos extratos aquosos do alecrim de Angola, demonstrou que as frações mais lipofílicas exibiram ações dopaminérgicas, regulando a síntese de prolactina via recetores D2. [11]

A atividade antioxidante dos frutos e folhas também foi avaliada, extraindo com etanol e hexano, e fazendo uma infusão para obter o extrato aquoso. A atividade antioxidante foi medida usando o TROLOX (2,5,7,8 tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) como padrão. Conclui-se que tanto nas folhas como nos frutos, o extrato com maior poder antioxidante é o aquoso, seguindo-se do extrato com etanol e por último do extrato com hexano. [9]

Num estudo envolvendo 217 mulheres com síndrome pré-menstrual, um extrato etanólico de alecrim de Angola, contendo 40mg da planta, demonstrou um potencial efeito no alívio dos sintomas do SPM (síndrome pré-menstrual). [12]

Num estudo de fertilidade em 30 mulheres, mostrou-se que um extrato contendo alecrim de Angola aumentou a probabilidade de gravidez. [13]

1.2.2 - Funcho

1.2.2.1 - Características

O funcho é uma planta pertencente à família *Apiaceae* (Umbelíferas), existem duas variedades: funcho-amargo (*Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *vulgare*) e o funcho doce (*Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var. *dulce*), também conhecido por erva-doce ou anis-doce., originário da bacia do Mediterrâneo, a variedade amarga é espontânea no Norte e Centro de Portugal, a variedade doce é atualmente cultivada em quase todo o mundo. [1]

O funcho é uma erva que cresce até dois metros e meio, com flores amarelas e com folhas grandes até 40 centímetros, o seu fruto é uma semente seca e pequena com cerca de 5 a 10 milímetros. Na figura 3 encontram-se exemplos da planta, do seu bolbo e das suas sementes. Esta planta divide-se em duas espécies, consoante o sabor das sementes, uma vez que as características morfológicas são idênticas: a *F. vulgare*, que tem sementes doces, muito usadas na culinária e a *F. piperitum*, com sementes amargas. [1,10]



Figura 3 - Funcho (em cima), bolbo (em baixo, à direita) e sementes (em baixo, à esquerda). [14-16]

No óleo essencial existem diferenças de composição, o funcho-amargo, o óleo essencial é composto essencialmente por *trans*-anetol (75 por cento), fenchona (15 a 25 por cento) e com menos quantidades de α -pineno, limoneno, mirceno, canfeno, sabineno, β -mirceno, β -pineno, α -felandreno e γ -terpineno aldeído anísico, enquanto no funcho-doce tem um mínimo de 80 por cento de *trans*-anetol, estragol e menores quantidades de monoterpenos face ao óleo essencial de funcho amargo. Ambas as espécies possuem também óleo gordo, fitosteróis (β -sitosterol, estigmasterol) e flavonoides. Na figura 4 encontram-se alguns compostos presentes no óleo essencial de funcho. [1]

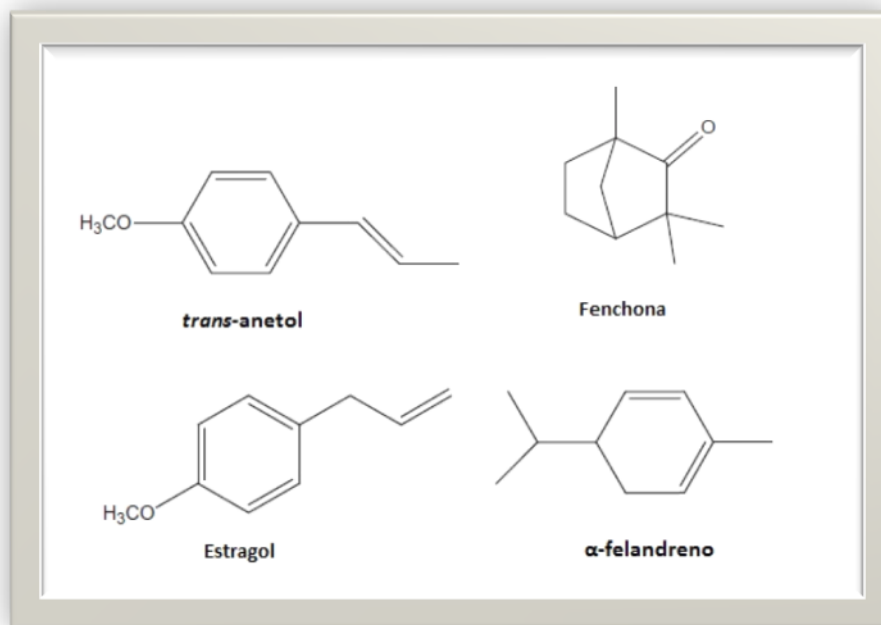


Figura 4 - Alguns compostos presentes no óleo essencial de funcho.

1.2.2.2 - Uso na Culinária

As sementes de funcho são largamente usadas na culinária, como erva aromática em pratos de carne e peixe, são também usadas em gelados, licores e infusões. O bolbo também tem valor gastronômico, sendo guisado, grelhado, ou até mesmo cru.

No Mediterrâneo é muito comum o funcho ser usado em saladas, usando as folhas, o bolbo e até mesmo sementes na confecção das mesmas, também na Índia e no Médio Oriente é muito usado como especiaria. [4,17] Este pode ainda ser usado como corretor de sabor e odor na indústria farmacêutica, em confeitaria e no fabrico de licores, por exemplo, o licor de Mme de Sévigné. [1]

1.2.2.3 - Uso na Medicina Popular

O funcho tem um efeito carminativo, sendo muito usado, realizando uma infusão com as sementes e juntamente com bicarbonato de sódio e açúcar para um xarope caseiro nos gases infantis, também pode ser usado como expetorante. No subcontinente indiano as sementes são consumidas cruas, para melhorar a visão. [5,10,18]

Já em estudos animais, as infusões de sementes de funcho demonstraram um potencial para o tratamento de glaucoma e hipertensão, também foi usado como galactagogo, aumentando o nível de leite na mãe lactante, possivelmente devido à presença de fito estrogénios no funcho, que promove o crescimento do tecido mamário. [19]

1.2.2.4 - Evidências Experimentais

Os extratos aquosos e orgânicos do funcho demonstraram ter um efeito antibacteriano em agentes patogénicos como a *E. Coli*, *Pseudomonas*, agrobactérias, **estafilococos**, o óleo essencial também demonstrou as mesmas propriedades. [20,21]

O óleo essencial e os extratos a partir de sementes demonstraram uma atividade antifúngica contra várias espécies de *Candida*, em especial uma das mais comuns: *Candida albicans*. [22]

Os extratos de acetona, metanol, etanol e extratos aquosos demonstraram atividade antioxidante, tendo o extrato aquoso uma atividade antioxidante mais forte. [23] O funcho selvagem exibe uma atividade antioxidante superior que o funcho cultivado e medicinal. [24]

O óleo essencial resultante das partes áreas do funcho demonstrou uma atividade antioxidante forte, foram também isolados alguns compostos do óleo essencial: ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 15-O-dicafeoilquínico, ácido rosmarínico, eriodictiol-7-rutina, quercetina-3-O-galactosideo, kaempferol-3-O-Rutinosideo e kaempferol-3-O-galactosideo. [25]

O óleo essencial de funcho, e o seu componente maioritário, o anetol demonstraram ter um efeito anti trombótico devido à sua atividade antiplaquetária de largo espectro, anticoagulante e vasorrelaxante. O anetol, assim como o óleo essencial de funcho inibem a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidónico, colagénio e U46619. No mesmo estudo, também demonstraram proteção gástrica contra lesões induzidas pelo etanol. [26]

A administração de um extrato etanólico de frutos de funcho demonstrou uma ação anti-inflamatória em infeções agudas e subagudas, assim como em reações alérgicos tipo IV. [27]

A hepatotoxicidade aguda provocada pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) foi inibida pela administração de óleo essencial de funcho. [28]

Uma atividade antidiabética também foi comprovada no óleo essencial de funcho, num estudo usando ratos com diabetes induzida por streptozotocina. A hiperglicemia desceu para valores normais e a atividade da glutathione peroxidase sérica aumentou. [29]

O extrato metanólico de funcho demonstrou uma atividade cito protetora *in vitro* contra linfócitos humanos e atividade anti tumoral contra uma linhagem celular (B16F10) do

melanoma. Em outro estudo, o extrato metanólico demonstrou uma capacidade repelente contra uma espécie de mosquito *Aedes aegypti*, o conhecido mosquito-da-dengue. [30,31]

O extrato etanólico de funcho demonstrou uma atividade anti-hirutismo, tendo os pacientes tratados com creme 2% de extrato demonstrado uma maior ação que contra cremes 1% e placebo. [32]

Um estudo feito com o óleo essencial de funcho reportou uma ação nas contrações uterinas, reduzindo a intensidade das contrações induzidas pela oxitocina e prostaglandina E2 (PGE₂), na frequência das mesmas contrações apenas reduziu as induzidas pela PGE₂. [33]

Vários compostos isolados do extrato metanólico do funcho, demonstraram uma ação inibitória do citocromo humano P450 3A4. [34]

1.3- Atividade Antioxidante

As reações de oxidação-redução são consideradas reações de transferência de elétrões, ao contrário das reações ácido base, onde ocorre transferência de prótons. O termo oxidação, surgiu inicialmente para representar combinações de elementos com o oxigênio, mas nos tempos atuais, tem um significado bem mais amplo, que pode incluir reações sem qualquer participação do oxigênio. Uma reação que envolva ganho de elétrões denomina-se reação de redução, enquanto, que uma reação que envolva perda de elétrões, denomina-se reação de oxidação. Quando um determinado elemento é oxidado, atua como agente redutor, uma vez que doa elétrões, e causa a redução de uma outra substância assim, por outro lado, quando um agente é reduzido, atua como oxidante, recebe elétrões, causando uma oxidação. [35]

1.3.1 Radicais Livres

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas, ou fragmentos de moléculas que contêm um ou mais elétrões desemparelhados nas orbitais, estes elétrões desemparelhados conferem-lhe uma reatividade alta. Estes podem ser produzidos enzimaticamente, por exemplo na mitocôndria, retículo endoplasmático, em reações redox na cadeia de transporte de elétrões ou não enzimaticamente, através da auto metabolização de várias substâncias como por exemplo: hemoglobina, catecolaminas e ácidos gordos polinsaturados [36]

Os ERO ou ROS (espécies reativas de oxigênio ou reactive oxygen species) tem um enorme valor biológico, sendo o seu desequilíbrio prejudicial para o organismo, levando ao stress oxidativo que pode estar associado a várias doenças. O tratamento com estas espécies tem

aumentado, sendo usados em mais de cem doenças, como malária, insuficiência cardíaca, ataque cardíaco, aterosclerose, diabetes e cancro. [37]

Uma das principais vantagens dos radicais livres naturais é a ausência de efeitos secundários, enquanto nos radicais livres sintéticos, existem dois problemas graves que resultam da sua acumulação no organismo: danos hepáticos e carcinogénese. [38]

1.3.1.1 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica pode ocorrer por três vias, a primeira, denominada por via clássica, é uma reação em cadeia não-enzimática mediada por radicais livres, a segunda não enzimática, sem radicais livres, via foto-oxidação, e a terceira, a via enzimática.

Na via clássica, através de radicais livres, o processo pode ser iniciado por calor, luz, radiação ionizante, ou por iniciação química via iões metálicos ou metaloproteínas. Existem 3 passos, como exemplificado na figura 5.

A iniciação onde LH é o substrato, por exemplo, um lípido, e R• um radical oxidante inicial, a oxidação gera um radical alilo L• que rapidamente reage com o oxigénio, formando o radical peroxil LOO•. Na propagação o radical peroxil oxida os lípidos, produzindo hidroperóxido de lípido LOOH, que é degradado, com a ação de metais de transição, em vários compostos, incluindo o radical alcoxi LO•. Na terminação, ocorre a conjugação dos radicais livres, para a formação de produtos não radicalares. [39]

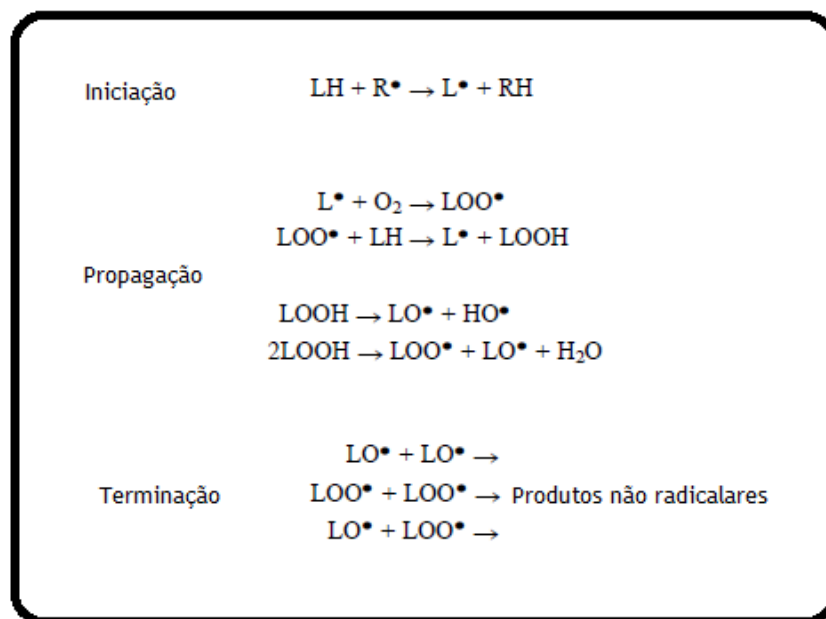


Figura 5 - Etapas da peroxidação lipídica

1.3.1.2 Danos Oxidativos de proteínas e DNA

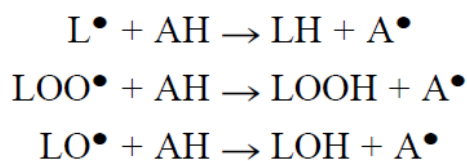
Em altas concentrações, os ROS podem causar grandes danos na estrutura celular, ácidos nucleicos, lípidos e proteínas. O radical hidroxilo reage facilmente com o DNA, causando danos as bases purina e pirimidina. Os danos contínuos no DNA, podem representar o primeiro passo para a mutagénese, carcinogénese e envelhecimento.

As alterações nas proteínas, podem levar à sua degradação, ou alteração de função, mas também à destruição da estrutura terciária, o que origina a agregação proteica e formação da amiloide. [36]

1.3.2 Sistema Antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como uma substância, que em baixa concentração, comparada com os substratos oxidados, inibe ou retarda significativamente a reação de oxidação. Os antioxidantes encontram-se divididos em duas classes, os primários, que quebram a reação ou inibem-na quase totalmente, ou secundários, estes são preventivos, e normalmente apenas reduzem o rácio da oxidação. Os antioxidantes primários, AH podem parar a reação reagindo com um radical lipídico, ou parar a propagação, reagindo neste caso com o radical peroxil ou alcoxi, seguidamente o radical antioxidante pode interferir com a reação em cadeia, formando mais antioxidantes, ambos os passos estão presentes na figura 6. [39]

1º Passo



2º Passo

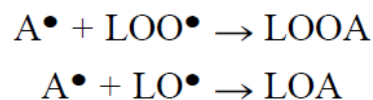


Figura 6 - Reações com antioxidantes primários

1.3.3 Stresse Oxidativo

O stresse oxidativo está diretamente relacionado com várias patologias, a mais comum será o cancro, uma vez que um desequilíbrio na produção de radicais livres, pode desencadear a carcinogénese (por ativação de proto-oncogenes, ou inativação de genes supressores de tumores), mas também doenças cardiovasculares (devido aos danos nas paredes dos vasos sanguíneos, causando aterosclerose), a diabetes (os radicais livres atacam os ilhéus de Langerhans), doenças inflamatórias (os radicais livres podem atuar como segundos mensageiros), infertilidade (com a iniciação da peroxidação lipídica, ocorre acumulação de peróxidos nas membranas dos espermatozoides, reduzindo a sua viabilidade), cataratas (lesão na superfície do cristalino), o envelhecimento, doenças neurológicas (formação da amiloide), hepáticas, pulmonares, entre outras patologias. A inibição da apoptose poderá também ser uma consequência dos radicais livres, que aumentam o cálcio citoplasmático. [36,40]

1.3.4 Determinação Laboratorial

Embora existam vários métodos de determinação laboratorial para a atividade antioxidante, fenóis totais e flavonoides totais, neste trabalho usaram-se três métodos colorimétricos, devido a sua facilidade de execução e fiabilidade dos resultados. Usou-se o método do DPPH para a atividade antioxidante, o método de Folin-Ciocalteu para a quantificação dos fenóis totais e o método do cloreto de alumínio para os flavonoides totais.

1.3.4.1 DPPH

Um dos métodos mais usados na determinação *in vitro* da atividade antioxidante, é o método do DPPH. Este método consiste em avaliar a atividade antioxidante de um radical orgânico estável espectrofotometricamente, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, o DPPH, de coloração roxa que absorve a 515/517 nm. Quando existe um antioxidante ou uma espécie radical, esta vai doar um átomo de hidrogénio ao átomo de azoto que possui um eletrão desemparelhado, formando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil reduzido que tem uma tonalidade amarela, e como consequência irá ocorrer um decréscimo no valor de absorvância, esta reação pode verificar-se na figura 7, e a sua diferença na coloração, presente na figura 8.

No tratamento de resultados, existem algumas diferenças, mas o mais usual é o cálculo da percentagem de inibição e de DPPH remanescente no meio. Seguidamente calcula-se o IC50, percentagem onde ocorre 50% da inibição e o AAI, sendo um índice onde menor que 0,5 considera-se uma atividade antioxidante fraca, entre 0,5 e 1 moderada, de 1 a 2 forte, e acima de 2 muito forte. O método do DPPH tem várias vantagens face a outros métodos, tais como a sua estabilidade, sensibilidade, credibilidade, simples realização e viabilidade. [41,42]

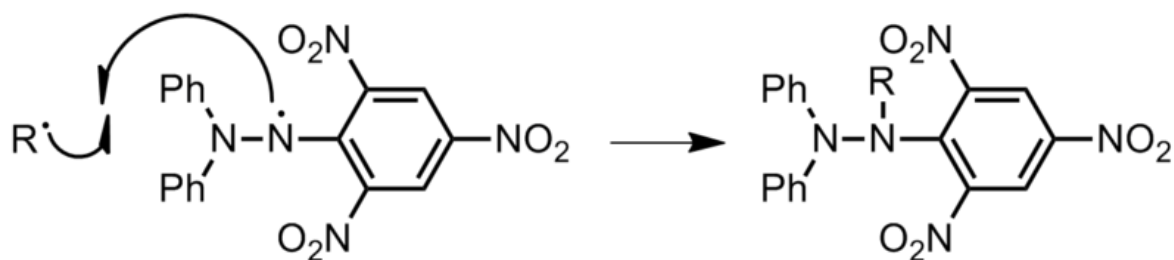


Figura 7 - Reação do DPPH na presença de um antioxidante. [43]

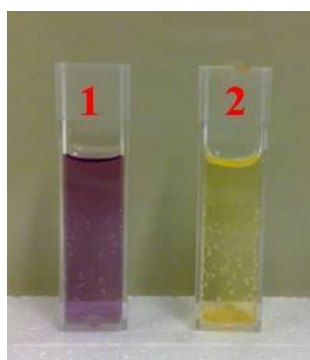


Figura 8 - Diferente coloração do radical livre DPPH (1) e do DPPH reduzido (2). [44]

1.3.4.2 Fenóis totais

Os fenóis são produtos do metabolismo secundário das plantas, obtidos via acetato e via chiquimato, são bastante abundantes no mundo vegetal, principalmente os complexos, uma vez que os simples, são apenas os derivados da hidroquinona. Os fenóis são um grupo de compostos que têm sido muitos investigados, pela comunidade científica, devido ao seu grande poder antioxidante, sendo os principais responsáveis, pela capacidade antioxidante da planta. Estão presentes em quase todos os alimentos, e podem ser consumidos sob a forma de fruta crua, legumes, chás, sementes, ervas aromáticas, vinhos, entre outras formas. O consumo de alimentos ricos em fenóis traduz-se numa diminuição do risco de doenças cardiovasculares e certas formas de cancro. [5,45]

Na quantificação de fenóis totais existem vários métodos, um dos métodos mais extensivamente utilizado é um método colorimétrico, usando o reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico, onde ambos se encontram no estado de oxidação 6⁺, mas na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, a média dos estados de oxidação baixa para

5-6, formando o molibdênio e tungstênio azul, esta alteração de cor, leva a um aumento da absorvância lida a 750 nm, podendo assim ser possível a quantificação dos fenóis totais. O principal problema deste método é que o composto azul, pode ser formado não apenas devido a fenóis mas também a tióis, vitaminas, guanina, trioses de gliceraldeído, dihidroxiacetona e alguns iões inorgânicos. [42]

1.3.4.3 Flavonoides totais

Os flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos com alto nível de atividade antioxidante, são conhecidos não só pela sua capacidade de captura de radicais livres; mas também pela inibição da hidrólise; oxidação de enzima; ação anti-inflamatória; defesa da planta contra radiação UV; barreira química contra microrganismos, insetos, animais herbívoros; mas também na polinização, atraindo insetos. Os flavonoides são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e da ligação de um grupo hidroxilo ao anel. Os flavonoides também desempenham um importante papel na saúde humana, uma vez que são obtidos pela dieta, podendo deste modo minimizar a peroxidação lipídica, e o efeito dos radicais livres. Na figura 9, encontram-se algumas classes de flavonoides. [18,46]

Para a quantificação dos flavonoides totais, foi usado um método colorimétrico, usando o cloreto de alumínio, que na presença de flavonoides vai ganhar uma tonalidade azul, aumentando assim a absorvância lida a 415nm. [47]

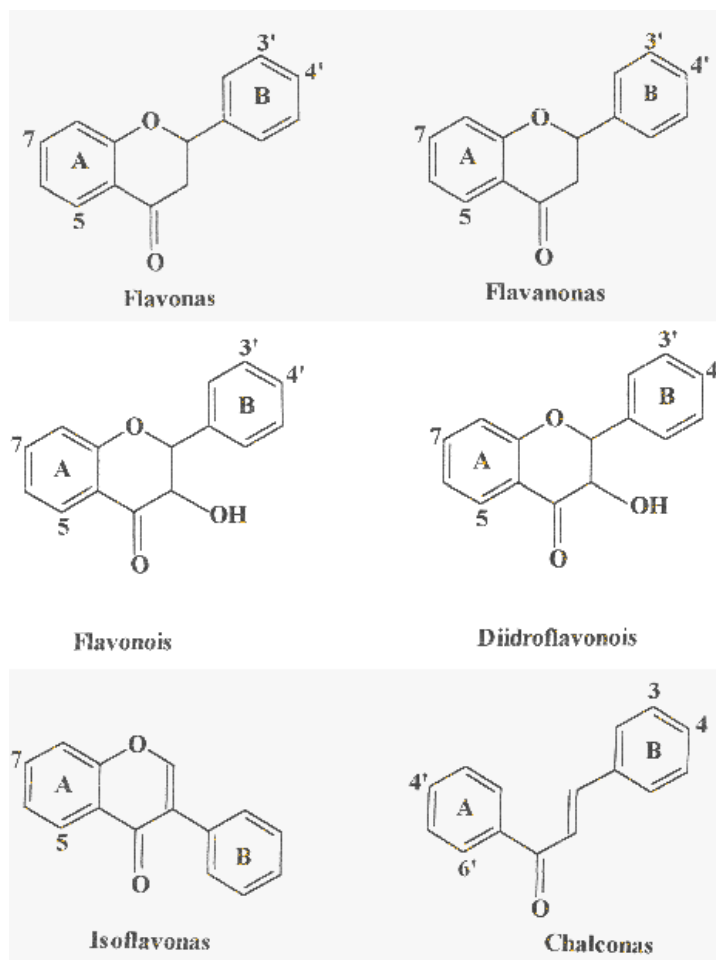


Figura 9 - Algumas classes de flavonoides. [46]

1.3.5 Relação dos fenóis, flavonoides e atividade antioxidante

Uma das principais vantagens do uso de extratos de plantas como antioxidantes, vem na origem destes compostos ser natural, ao contrário de antioxidantes sintéticos, que podem ter efeitos colaterais prejudiciais ao organismo humano, tais como danos hepáticos e início da carcinogênese. Nem todos os antioxidantes naturais, podem ser considerados apenas com efeitos benéficos, uma vez que os flavonoides livres podem ter efeitos mutagênicos, sendo a quercetina, um exemplo disso. [5,38]

Os fenóis e flavonoides, são conhecidos pela sua atividade antioxidante, entre outras funções, mas em estudos *in vitro* de análise da atividade antioxidante na quantificação de fenóis e flavonoides, nem sempre existe uma correlação, talvez pelas interferência que podem ocorrer no caso da quantificação de fenóis pelo método de Folin-Ciocalteu, onde as vitaminas, tióis, guanina, entre outros compostos podem dar um falso positivo. Para cada extrato, amostra, ou até mesmo entre métodos de determinação de atividade antioxidante,

uma maior quantidade de fenóis e flavonoides não implica sempre uma maior capacidade antioxidante. [42,48]

1.4 - Análise dos extratos por HPLC-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência, vulgarmente conhecido por HPLC (High-performance liquid chromatography) é uma das técnicas mais usadas mundialmente, visto a permitir não só a deteção, como a respetiva quantificação de compostos em amostras, como extratos de plantas. Em contraste com métodos colorimétricos, que quantificam os fenóis totais, o HPLC-DAD consegue quantificar separadamente. Este método é considerado muito sensível, preciso, e relativamente de baixo custo. [49]

O aparelho de HPLC é composto por uma coluna, que separa os componentes da amostra, tendo em conta a sua afinidade entre a fase móvel e estacionária, o detetor usado, neste caso, é o detetor de rede de díodos (DAD), oscilando numa comprimento de onda de 190 a 800 nm, com uma elevada sensibilidade para monitorizar a eluição, permitindo assim, a expressão de resultados, sob a forma de cromatogramas. [50]

A eluição dos compostos, pode ser feita com o mesmo eluente, denominando-se eluição isocrática, ou variando a composição do eluente com o tempo, chamada eluição por gradiente, para a otimização do método deve-se variar as concentrações do gradiente e o tempo, de modo a conseguir uma melhor separação, correspondendo a picos de compostos mais definidos. [51]

2 - Material e Métodos

2.1- Colheita

2.1.1 - Alecrim de Angola

As folhas do alecrim de Angola foram colhidas em Angola, e foi guardada uma amostra no Herbário do Centro de botânica da Universidade Agostinho Neto e enviadas para a Universidade da Beira Interior.

2.1.2 - Funcho

As sementes de funcho foram colhidas em Portugal, mudando a sua origem geográfica consoante a tabela 1, e seguidamente, foram depositadas amostras no Banco Português de Germoplasma Vegetal em Braga, e enviadas para a Universidade da Beira Interior.

Tabela 1: Códigos e correspondente origem geográfica das sementes de funcho.

Código	Distrito	Cidade
09564	Guarda	Trancoso
09576	Guarda	Pinhel
09578	Leiria	Leiria
09586	Santarém	Ourém
09873	Évora	Vila Viçosa

2.2- Secagem

As folhas do alecrim de Angola e as sementes de funcho foram secas ao ar e temperatura ambiente.

2.3- Extratos orgânicos

Para este estudo fez-se uma extração orgânica utilizando o extrator de Soxhlet, como se pode verificar na figura 10. Foram pesadas 20 gramas de folhas de alecrim de Angola. E seguidamente colocadas em cartuchos de papel de filtro e introduzidas no extrator.

Foram usados quatro solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etilo e por último etanol. Usou-se 300ml para todos os solventes. Pode verificar-se que a extração se encontra completa quando o solvente em contacto com a planta fica incolor.

Após a extração, evaporou-se o solvente usando um evaporador rotativo, pesou-se a matéria seca obtida, e calculou-se o rendimento da extração.

Os extratos foram conservados no congelador para posterior utilização.

Neste sentido para determinar as concentrações do extrato, procedeu-se a uma diluição em metanol para cada extrato e foram retiradas duas alíquotas (5ml) para placas de Petri. As placas de Petri foram pesadas previamente e depois de depositado 5ml do extrato foram colocadas na estufa a 100°C por várias horas, seguidamente foram retiradas e pesadas.



Figura 10 - Montagem laboratorial para as extrações com solventes, usando um extrator de Soxhlet.

2.4 - Extrato aquoso

De acordo com os objetivos o extrato aquoso foi obtido por hidrodestilação, usando um Clevenger, representado na figura 11. Usou-se 500 ml de água destilada que após 2 horas em ebulição deixou-se repousar, de onde se recolheu a água após filtração em vácuo (extrato aquoso) e o óleo essencial. Para o alecrim de Angola foram usadas 30,67 gramas de folhas e para o funcho os valores variaram com a amostra como elucidado na tabela 2.

Após a extração foram retiradas duas alíquotas (5ml) para placas de Petri, para posterior determinação da concentração do extrato. As placas de Petri foram pesadas previamente, e depois de depositado 5ml do extrato foram colocadas na estufa a 100°C por várias horas, seguidamente foram retiradas e pesadas.

Tabela 2: Peso das sementes de funcho.

Código	Sementes (g)
09564	52,2
09576	54,34
09578	42,78
09586	78,2
09873	47,77



Figura 11- Montagem laboratorial para a hidrodestilação, usando um Clevenger.

2.5- Determinação dos fenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais usou-se um método colorimétrico, usando o ácido gálico como padrão.

Para a construção de uma curva de calibração preparam-se várias diluições do ácido gálico em metanol (0,050, 0,100, 0,125, 0,150, 0,250, 0,300, 0,400 e 0,500 $\mu\text{g/ml}$). A 50 μL das soluções anteriores, adicionou-se 50 μL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2N, deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 5 minutos, de seguida adicionou-se 2ml de uma solução de carbonato de cálcio (75 g/L) e deixou-se reagir num banho a 30°C com agitação durante 90min. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado e para o banco foi usado 50 μL de metanol, uma vez que é o solvente usado nas amostras.

As absorvâncias foram lidas a 765nm num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, usando uma célula de quartzo.

Para a determinação dos fenóis totais nos extratos, procedeu-se como descrito para a curva de calibração, substituindo os 50 μL das soluções padrão pela amostra

A quantidade de fenóis totais na amostra é expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico por gramas de matéria seca do extrato.

2.6 - Determinação dos flavonoides totais

Para a determinação dos flavonoides totais usou-se um método colorimétrico, usando a quercetina como padrão.

Para a construção de uma curva de calibração prepararam-se várias diluições de quercetina em metanol (12,5, 30,0, 50,0, 70,0, 100,0, 130,0, 150,0 e 200,0 µg/ml). A 500 µL das soluções anteriores, adicionou-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 finalmente, 2,8 ml de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente, durante 30 minutos com agitação intermitente. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado e para o banco foi usado 500 µL de metanol, uma vez que é o solvente usado nas amostras.

As absorvâncias foram lidas a 415nm num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, usando uma célula de quartzo.

Para a determinação dos flavonoides totais nos extratos, procedeu-se como descrito para a curva de calibração, substituindo os 500 µL das soluções padrão pela amostra

A quantidade de flavonoides totais na amostra é expressa em miligramas de equivalentes de quercetina por gramas de matéria seca do extrato.

2.7 - Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, usou-se um método colorimétrico com o DPPH.

Para a construção de uma curva de calibração, prepararam-se várias soluções, em metanol, de DPPH com diferentes concentrações (0, 4,28, 8,56, 17,12, 25,68 e 42,80 µg/ml). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, utilizando o metanol como branco. As absorvâncias foram lidas a 515nm.

Preparou-se uma solução mãe de DPPH 0,2 mM, dissolvendo 19,7 mg de DPPH em 250 ml de metanol. Com esta solução prepararam-se por diluição quatro soluções diluídas de DPPH: 0,04mM, 0,06 mM, 0,08 mM e 0,1 mM. Efetuou-se várias diluições consoante a amostra usada, e a 0,1ml da amostra de extrato adicionou-se 3,9 ml de DPPH, para o controlo usa-se 3,9ml de DPPH e 0.1 metanol. Deixou-se reagir no escuro durante 90 minutos. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado, usando o metanol como branco, e realizando a correção da cor com 0,1mL da amostra e 3,9 ml de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

As absorvâncias foram lidas a 517nm num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, usando uma célula de quartzo.

Para a medição da atividade antioxidante das amostras ser comparada com compostos-padrão preparou-se várias diluições de 3 compostos padrão: quercetina, rutina e ácido gálico. As diluições usadas (50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/ml) para a quercetina e rutina foram mais elevadas que as do ácido gálico (10, 25, 50, 75, 100, 150 µg/ml).

Para o tratamento de resultados, calculou-se a percentagem de inibição para cada amostra, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs controlo} - \text{Média Abs amostra}}{\text{Abs controlo}} \times 100$$

Representou-se graficamente nas ordenadas a percentagem de inibição e nas abcissas a concentração da amostra, como demonstrado na figura 12, a título de exemplo.

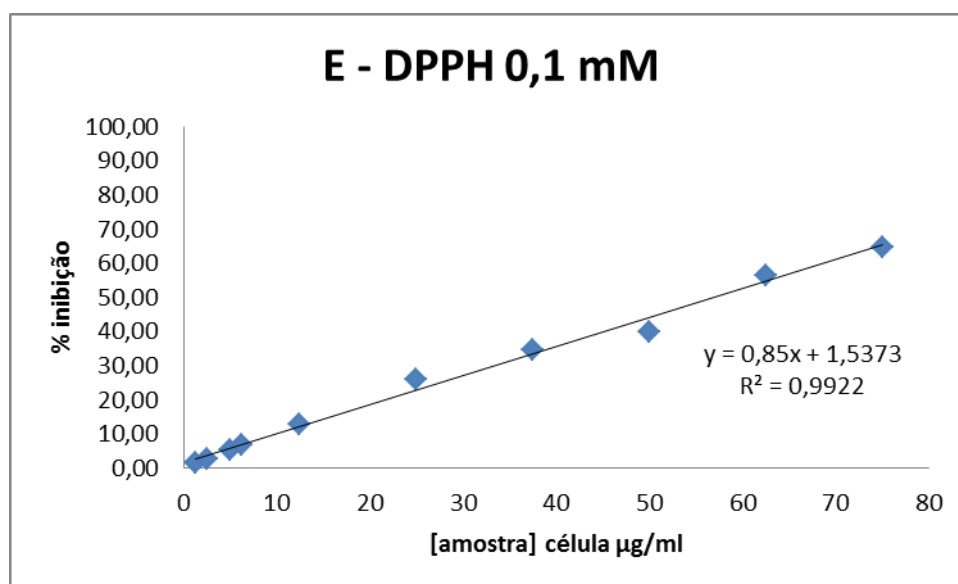


Figura 12 - Exemplo de gráfico % inibição vs [amostra].

Para comparar a atividade dos extratos, usa-se o AAI (índice de atividade antioxidante) calculado pela seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g.ml})}{IC\ 50 (\mu\text{g.ml})}$$

Onde IC50 é calculada graficamente, corresponde à concentração de amostra que exibe 50% de inibição. Os valores de AAI são interpretados de acordo com a tabela 3:

Tabela 3: Interpretação dos valores de AAI

AAI	Atividade Antioxidante
<0,5	Fraca
0,5 a 1	Moderada
1 a 2	Forte
>2	Muito forte

Para a verificação do método, representou-se a concentração da amostra vs quantidade de DPPH remanescente, analisando a linearidade do gráfico

2.7.1 - Diluições usadas na preparação de extratos de alecrim de Angola

Preparou-se uma solução-mãe a partir do extrato inicial com a concentração de 2000 µg/ml, seguidamente prepararam-se sete diluições a partir da solução-mãe (50, 100, 200, 250, 500, 1000 e 1500 µg/ml). Em alguns extratos e para algumas concentrações de DPPH usou-se a solução mãe uma vez que a percentagem de inibição para a diluição mais concentrada não passou os 50%.

2.7.2 - Diluições usadas na preparação de extratos de funcho

Uma vez que as sementes de funcho têm uma atividade antioxidante mais fraca, usaram-se soluções mais concentradas. Prepararam-se soluções com sete diferentes concentrações (500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 e 5000 µg/ml).

2.8 - Análise cromatográfica dos extratos por HPLC-DAD

Analisou-se ainda por HPLC-DAD os extratos aquosos das sementes de funcho. O equipamento usado para as análises cromatográficas (VWR-Hitachi Elite LabChrom) é composto por 3 módulos: forno (L-2300), bomba (L-2130) e detetor de rede de díodos (L-2455).

Realizaram-se diluições do extrato original para 500 µg/ml numa mistura de água e metanol (40/60), de seguida filtrou-se usando um filtro de polipropileno de 0.45 µm.

Posteriormente injetaram-se, a 25°C, 3 x 20 µL das soluções em estudo, para garantir a correta limpeza do loop e certificar que não havia resíduos de amostras prévias, numa coluna de fase reversa Lichospher® RP-18, (250 x 4 mm) com um diâmetro de partícula de 5 µm (Merk).

A eluição foi realizada com um sistema binário de solventes, o metanol (A) e a água destilada (B) com o seguinte gradiente: nos primeiros 5 minutos A:B (10:90); alterando para A:B (50:50) em 30 minutos, mantendo o A:B (50:50) durante 8 minutos; alterando para A:B (90:10) durante 1 minuto e mantendo por 16 minutos. O fluxo foi de 1.0 ml/min.

A fase móvel foi acidificada com 0,01% de ácido acético (Fluka 49199) para garantir a total protonação dos compostos estudados.

A identificação dos compostos existentes na amostra foi efetuada por comparação do tempo de retenção de cada pico cromatográfico da amostra com o de padrões conhecidos e também pela comparação dos espectros de ultravioleta dos padrões com os da amostra. Seguidamente procedeu-se à sua quantificação, usando retas de calibração dos compostos padrão.

3 - Resultados e Discussão

3.1- Rendimentos das extrações

3.1.1 - Alecrim de Angola

Neste contexto, os rendimentos das extrações com solventes e com água (hidrodestilação) estão presentes na tabela 4. As extrações com solventes orgânicos, foram efetuadas usando os solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etilo e etanol. Os rendimentos obtidos foram respetivamente: 8,4, 0,5, 5,4 e 3,7%. Para a hidrodestilação o rendimento obtido foi de 1,6%, sendo recolhido 0,5 ml de óleo essencial.

No entanto, os rendimentos obtidos não vão de acordo aos descritos nem por Saglam e seus colaboradores nem por Sarikurkcu e seus colaboradores, tendo sido obtidos rendimentos inferiores por Saglam e seus colaboradores na ordem de 1,67%, 1,09%, 0,95%, 0,97% e 1,00% para os extratos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, etanol e água respetivamente, enquanto por Sarikurkcu e seus colaboradores os rendimentos foram de 38,06% para a água, 13,06% para o etanol e 3,42% para o hexano. A discrepância nestes valores pode ter origem numa metodologia diferente, e a amostra pode variar consoante a parte da planta usada, ou até mesmo o seu país de origem e consequentemente clima. [4,9]

Tabela 4: Rendimentos das extrações no alecrim de Angola

Extração	Rendimento (%)
Hexano	8,4
Diclorometano	0,5
Acetato de etilo	5,4
Etanol	3,7
Água	1,6

3.1.2 - Funcho

Os rendimentos para a hidrodestilação usando várias amostras de sementes de funcho, estão presentes na tabela 5. As diferenças nos rendimentos são explicáveis, devido às amostras, terem a sua origem geográfica diferente, logo, pode-se verificar que os compostos presentes podem alterar devido a vários fatores, como clima, altitude e constituição do solo.

Tabela 5: Rendimentos da hidrodestilação para as sementes de funcho

Amostra	Rendimento (%)
09564	15,6
09576	13,6
09578	14,5
09586	10,9
09873	12,0

Para as sementes de funcho, também foi recolhido o óleo essencial, os volumes encontram-se na tabela 6:

Tabela 6: Volumes de óleo essencial recolhido

Amostra	Óleo Essencial (ml)
09564	1,3
09576	1,3
09578	0,7
09586	1,7
09873	1,2

3.2 - Fenóis totais

A determinação dos fenóis totais é de extrema importância, uma vez que representam um dos maiores grupos de compostos com atividade antioxidante nas plantas. A sua principal ação é a proteção da planta contra leveduras e bolores através da sua ação antimicrobiana. [52]

A constante procura de redução do uso de aditivos alimentares, principalmente os químicos sintéticos, eleva os fenóis, e os constituintes com atividades antimicrobiana para um novo patamar de pesquisa. [53]

Para a construção de uma curva de calibração, presente na figura 13, procedeu-se à preparação de várias diluições do ácido gálico em metanol (0,050, 0,100, 0,125, 0,150, 0,250, 0,300, 0,400 e 0,500 µg/ml).

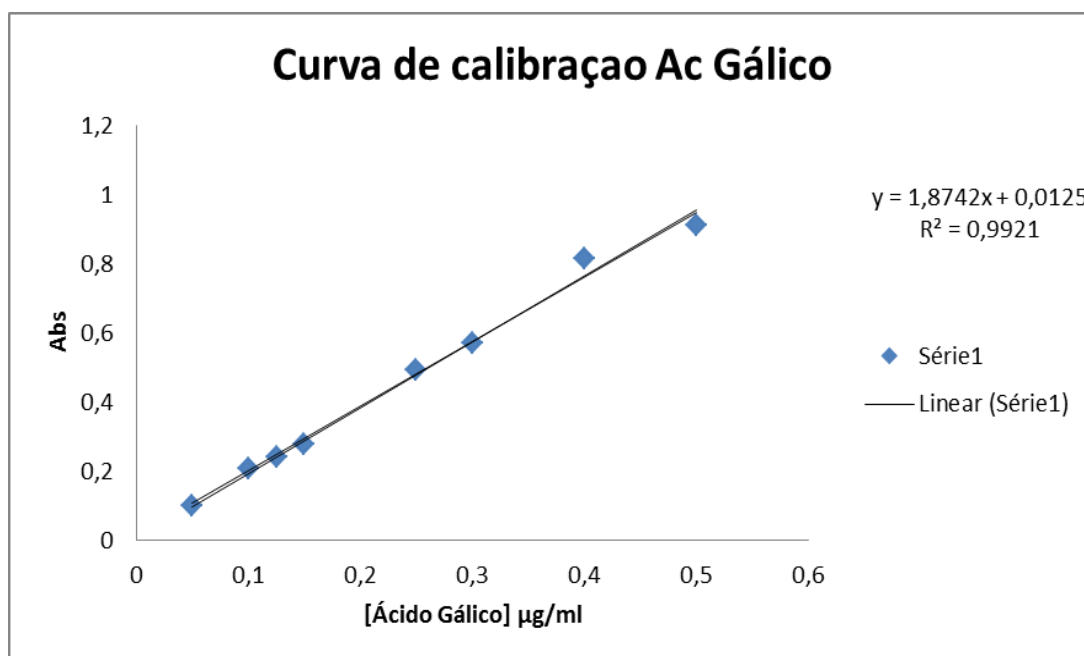


Figura 13 - Curva de calibração do ácido gálico para a determinação dos fenóis totais.

3.2.1 - Alecrim de Angola

Na tabela 7, encontram-se os resultados para os extratos de acetato de etilo e de etanol do alecrim de Angola. Apenas foram avaliados estes dois, devido a serem os dois extratos com maior capacidade antioxidante.

Tabela 7: Fenóis totais para as folhas de alecrim de Angola.

Extrato	Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g)	Desvio Padrão (\pm)
Acetato de etilo	113,115	0,018
Etanol	98,988	0,027

O extrato de acetato de etilo é o que contém mais fenóis totais, enquanto que o extrato etanólico tem um pouco menos.

3.2.2 - Funcho

Na tabela 8, encontram-se os resultados dos fenóis totais para as sementes de funcho, consoante o seu código (localização).

Tabela 8: Fenóis totais para as sementes de funcho

Amostra	Equivalentes de Ácido Gálico (mg/g)	Desvio Padrão (\pm)
09564	36,282	0,001
09576	48,421	0,011
09578	41,040	0,005
09586	41,662	0,008
09873	42,018	0,006

Nas sementes de funcho, o extrato aquoso que apresentou maior quantidade de fenóis totais foi a amostra 09576, oriunda de Pinhel, Guarda, em contraste, a que apresentou menos quantidade foi a 09564, oriunda do mesmo distrito, mas de Trancoso, ainda assim os valores são muito semelhantes, indicando que os fatores inerentes à localização, não afetam muito a quantidade de fenóis totais.

Estes valores são superiores aos reportados por Oktay e seus colaboradores, possivelmente devido à extração ser feita por um método diferente, triturando previamente as sementes, e apenas deixando a hidrodestilação ocorrer durante 15 minutos. [54]

3.2.3 - Comparação de fenóis totais entre os extratos de alecrim de Angola e os de funcho

Na figura 14, pode-se observar a diferença da quantidade de fenóis totais entre os extratos das folhas do alecrim de Angola e o extrato das sementes de funcho. Os extratos orgânicos do alecrim de Angola têm resultados praticamente com o dobro dos fenóis totais dos extratos aquosos das sementes de funcho.

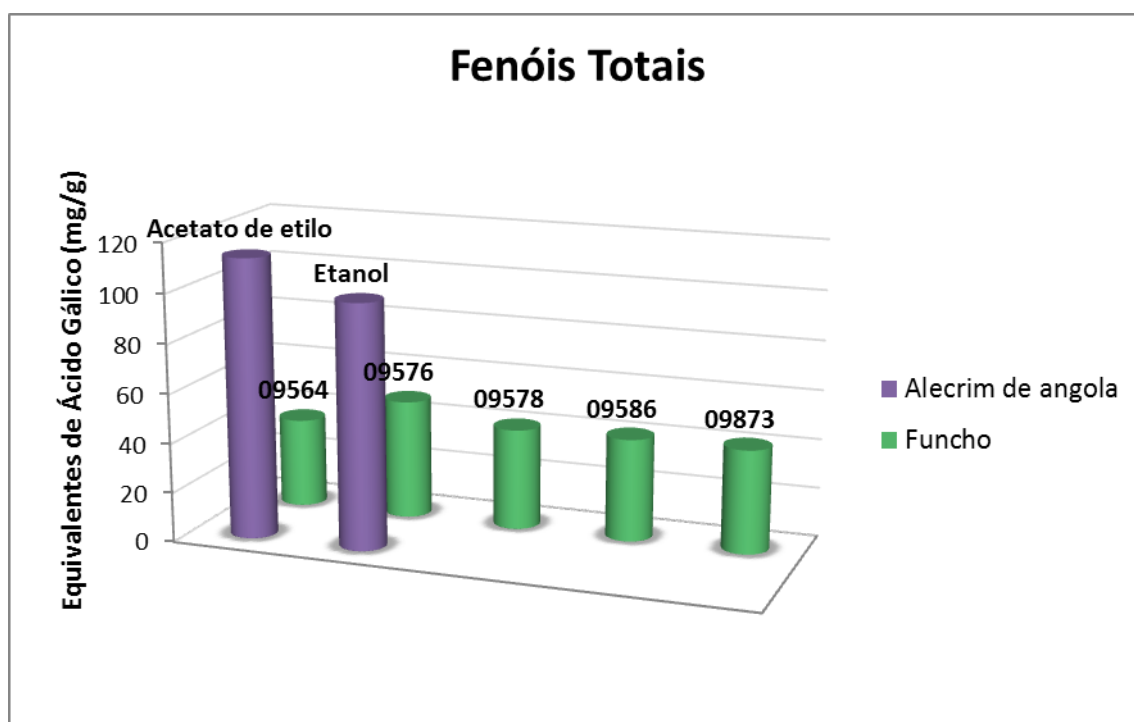


Figura 14 - Gráfico comparativo dos fenóis totais, entre o alecrim de Angola e o funcho.

3.3 - Flavonoides totais

Os flavonoides estão presentes nas plantas como metabolitos secundários e são poderosos antioxidantes e captadores de radicais livres. [9] Nas plantas, os flavonoides têm uma ação protetora contra os raios ultravioleta, agentes patogênicos e herbívoros, já nos humanos têm uma proteção a nível dos enfartes de miocárdio, de doença coronária, diabetes e até mesmo cancro. [52,55]

Para a construção de uma curva de calibração, presente na figura 15, prepararam-se várias diluições de quercetina em metanol (12,5, 30, 50, 70, 100, 130, 150 e 200 µg/ml).

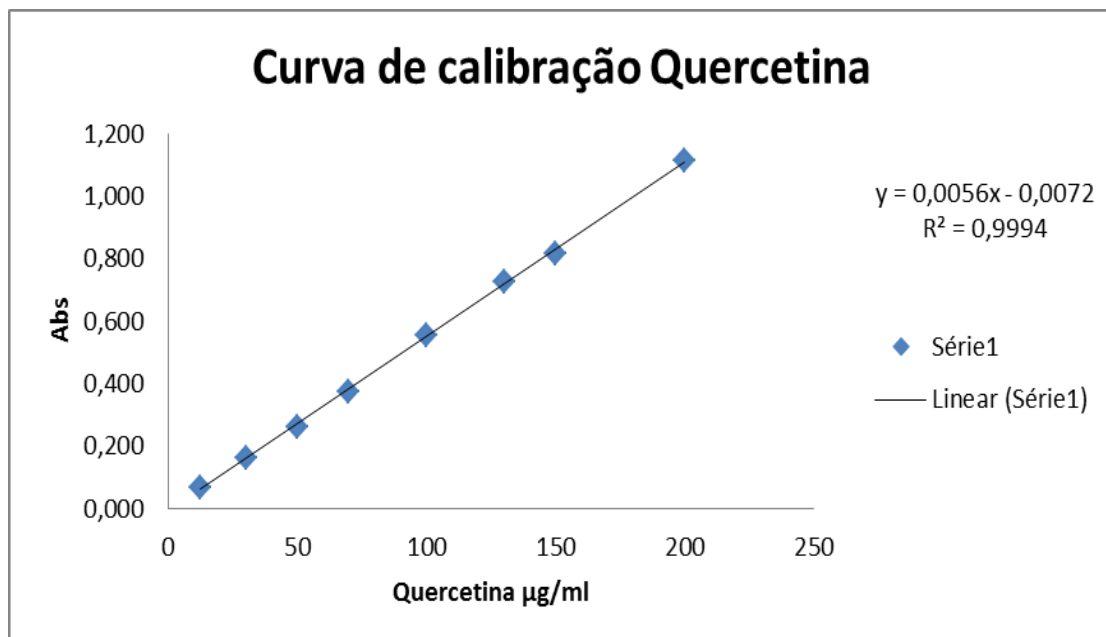


Figura 15 - Curva de calibração da quercetina para a determinação dos flavonoides totais.

3.3.1 - Alecrim de Angola

Na tabela 9, encontram-se os resultados para os extratos de acetato de etilo e de etanol do alecrim de Angola. No entanto, só foram avaliados estes dois, devido a serem os dois extratos com maior capacidade antioxidante.

Tabela 9: Flavonoides totais do alecrim de Angola, expressos em equivalentes de quercetina (mg/g)

Extrato	Equivalentes de Quercetina (mg/g)	± Desvio Padrão
Acetato de etilo	75,024	0,006
Etanol	54,705	0,002

O extrato de acetato de etilo, demonstrou uma concentração maior de flavonoides totais em relação ao extrato de etanol, o que vem de acordo, com experiências prévias em que a concentração de fenóis totais é superior no mesmo extrato de acetato de etilo.

3.3.2 - Funcho

Na tabela 10, encontram-se os resultados dos flavonoides totais para as sementes de funcho, consoante o seu código (localização).

Tabela 10: Flavonoides totais para as sementes de funcho, expressos em equivalentes de quercetina (mg/g)

Amostra	Equivalentes de Quercetina (mg/g)	± Desvio Padrão
09564	11,721	0,064
09573	11,281	0,006
09576	12,495	0,018
09578	12,031	0,004
09586	10,995	0,022

Todos os valores são muito equivalentes, o que indicam que a região de origem das sementes de funcho, não tem qualquer ação sobre a quantidade de flavonoides totais da planta.

3.3.3 - Comparação de flavonoides totais entre os extratos de alecrim de Angola e os de funcho

Na figura 16, pode-se observar a diferença da quantidade de flavonoides totais entre os extratos das folhas do alecrim de Angola e o extrato das sementes de funcho. Os extratos orgânicos do alecrim de Angola têm resultados muito superiores, cerca de cinco vezes mais que os flavonoides totais dos extratos aquosos das sementes de funcho.

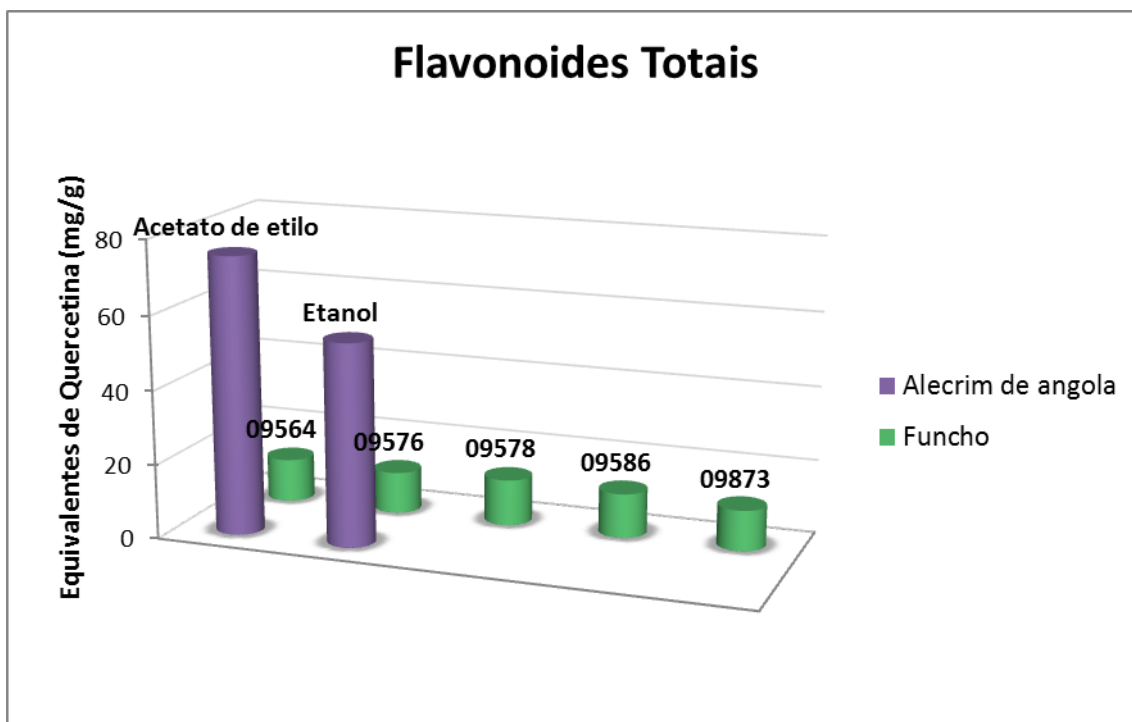


Figura 16 - Gráfico comparativo dos flavonoides totais, entre o alecrim de Angola e o funcho.

3.4 - Atividade Antioxidante

Existem vários métodos para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra ou de um extrato de plantas. Um dos métodos mais usuais é o método colorimétrico usando DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), todavia, mesmo dentro deste método existem várias variações do mesmo, consoante à expressão de resultados, concentrações usadas, tempo e condições de incubação, entre outros. O método do DPPH baseia-se na alteração de cor, de roxo para amarelo, quando o eletrão impar do átomo de nitrogénio é reduzido por um átomo de hidrogénio de um composto antioxidante. O DPPH é um radical estável, mas sensível à luz, oxigénio, pH e tipo de solvente usado. [41,56]

Para a construção de uma curva de calibração, presente na figura 17, prepararam-se várias diluições do ácido gálico em metanol (0,050, 0,100, 0,125, 0,150, 0,250, 0,300, 0,400 e 0,500 µg/ml).

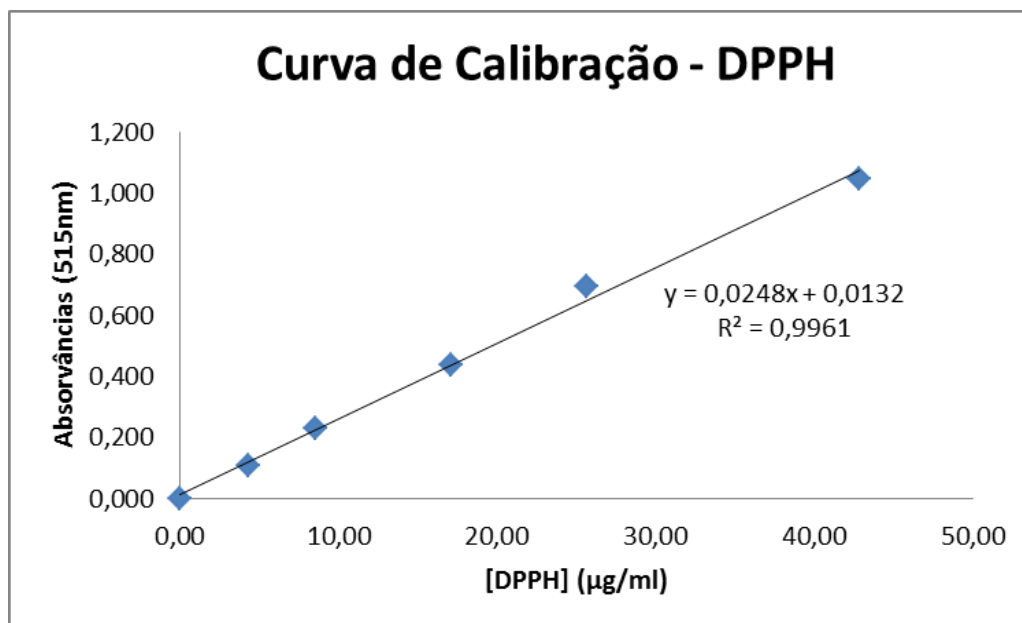


Figura 17 - Curva de calibração do DPPH.

Para a medição da atividade antioxidante das amostras ser comparada com compostos-padrão preparou-se várias diluições de 3 compostos padrão: quercetina, rutina e ácido gálico. As diluições usadas (50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/ml) para a quercetina e rutina foram mais elevadas que as do ácido gálico (10, 25, 50, 75, 100, 150) devido ao ácido gálico ser um poderoso antioxidante.

Para a medição da atividade antioxidante das amostras, prepararam-se quatro concentrações de DPPH em metanol com as seguintes concentrações: 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 mM.

De seguida, e, para cada solução de DPPH adicionou-se a 0,1ml da amostra, 3,9ml da solução de DPPH e após incubação a 90min, no escuro com temperatura ambiente foram lidas as absorvâncias a 517nm. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado e o branco consiste em 3,9ml de DPPH com 0,1ml de metanol, para os extratos com cor foi realizado o controlo da cor, que consiste em 3,9ml de metanol e 0,1ml da diluição correspondente.

Calculou-se a percentagem de inibição (%) pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Média Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Construíram-se vários gráficos com a percentagem de inibição no eixo das ordenadas e as concentrações das amostras no eixo das abcissas, como serve de exemplo o gráfico, presente na figura 18.

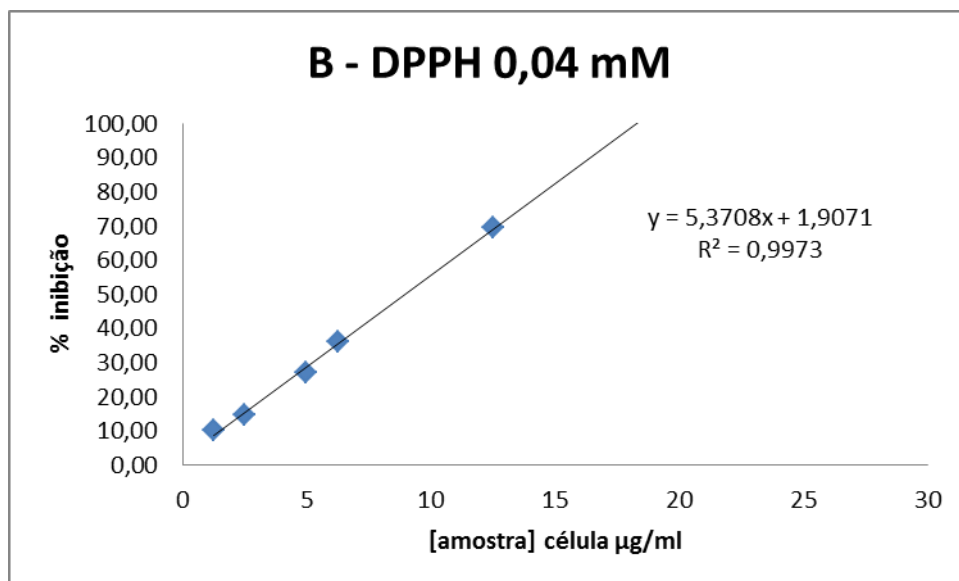


Figura 18 - Exemplo de uma representação % Inibição vs [amostra].

Posteriormente calculou-se o IC50, substituindo a porcentagem de inibição, $y=50$, e com este valor calculou-se o AAI (índice de atividade antioxidante) pela seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g.ml})}{IC\ 50\ (\mu\text{g.ml})}$$

O DPPH remanescente também foi calculado, para verificar a linearidade do método usando os valores de absorvância e a curva de calibração. O seguinte gráfico, presente na figura 19 serve de exemplo:

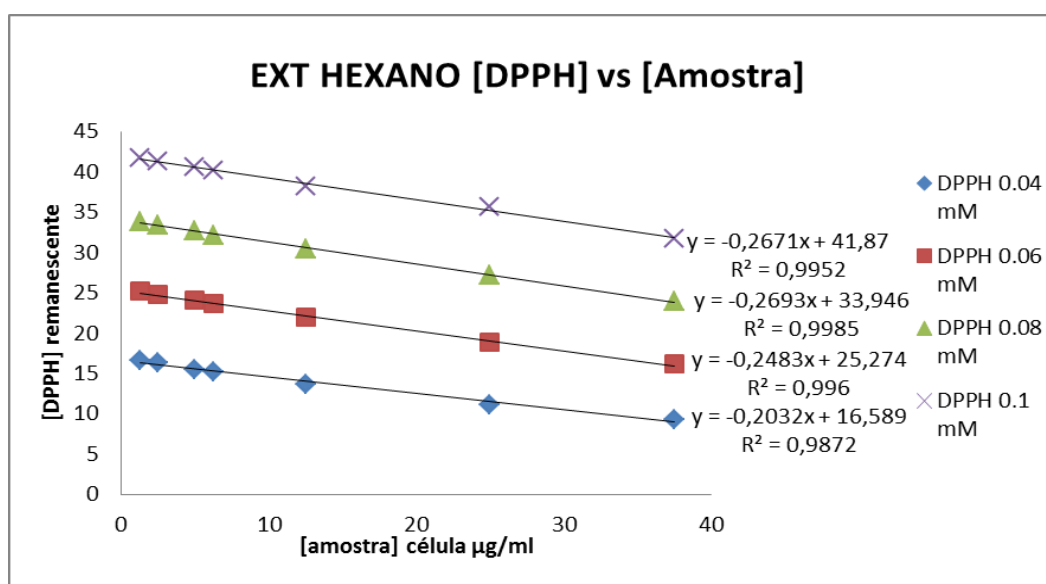


Figura 19 - Exemplo de uma representação do DPPH Remanescente vs concentração da amostra.

3.4.1 - Alecrim de Angola

Para a medição da atividade antioxidante das folhas de alecrim de Angola efetuaram-se várias diluições em metanol para cada extrato com as seguintes concentrações: 1,25, 2,5, 5, 6,25, 12,5, 25 e 37,5 µg/ml, e quando necessário para superar os 50% de inibição necessários para calcular o IC50, usaram-se mais três concentrações: 50, 62,5 e 75 µg/ml.

O gráfico seguinte, presente na figura 20 mostra um exemplo das quatro concentrações de DPPH num gráfico % Inibição vs Concentração Amostra.

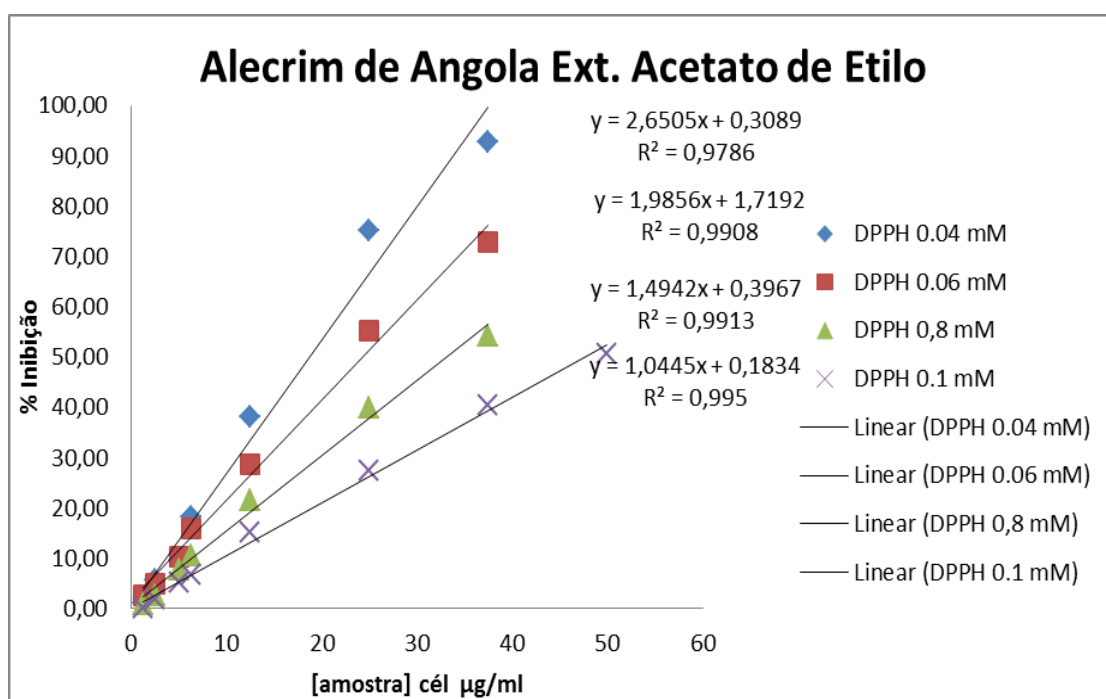


Figura 20 - Gráfico com a avaliação das % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH.

Na tabela 11 estão presentes os valores de IC50, AAI e o efeito antioxidante para cada extrato e concentração de DPPH.

Tabela 11: Valores de IC50 e AAI para todos os extratos de alecrim de Angola e para todas as concentrações de DPPH.

	Concentração de DPPH (mM)	IC50	AA1	Atividade Antioxidante
Hexano	0,04	45,254	0,348	Fraca
	0,06	55,517	0,426	Fraca
	0,08	68,579	0,460	Fraca
	0,1	83,335	0,473	Fraca
Diclorometano	0,04	34,496	0,457	Fraca
	0,06	41,776	0,566	Moderada
	0,08	48,700	0,647	Moderada
	0,1	57,015	0,691	Moderada
Acetato de Etilo	0,04	18,748	0,841	Moderada
	0,06	24,315	0,972	Moderada
	0,08	33,197	0,949	Moderada
	0,1	47,694	0,826	Moderada
Etanol	0,04	16,417	0,960	Moderada
	0,06	20,022	1,181	Forte
	0,08	24,187	1,303	Forte
	0,1	27,537	1,431	Forte
Água	0,04	8,955	1,760	Forte
	0,06	14,252	1,659	Forte
	0,08	19,012	1,658	Forte
	0,1	21,318	1,848	Forte

Os extratos obtidos pelo método de extração com polaridade crescente mostram uma atividade antioxidante variável, sendo fraca no extrato de hexano, moderada nos extratos de diclorometano e acetato de etilo e por ultimo forte no extrato etanólico. O extrato aquoso apresenta uma atividade antioxidante forte, sendo a mais forte entre todos os extratos.

3.4.2 - Funcho

Para a medição da atividade antioxidante das sementes de funcho efetuaram-se várias diluições em metanol para cada extrato com as seguintes concentrações: 12,5, 25, 37,5, 50, 75, 100 e 125 µg/ml.

Na tabela 12 estão presentes os valores de IC50, AAI e o efeito antioxidante para cada amostra de sementes de funcho e concentração de DPPH. Todos os extratos utilizados são aquosos

Tabela 12: Valores de IC50 e AAI para todas as amostras de funcho e para todas as concentrações de DPPH.

	Concentração de DPPH (mM)	IC50	AAI	Atividade Antioxidante
09586	0,04	40,502	0,389	Fraca
	0,06	55,638	0,425	Fraca
	0,08	68,475	0,460	Fraca
	0,1	79,820	0,494	Fraca
09578	0,04	50,299	0,313	Fraca
	0,06	69,318	0,341	Fraca
	0,08	84,443	0,373	Fraca
	0,1	96,479	0,408	Fraca
09576	0,04	51,786	0,304	Fraca
	0,06	71,979	0,328	Fraca
	0,08	86,415	0,365	Fraca
	0,1	104,935	0,375	Fraca
09573	0,04	40,502	0,389	Fraca
	0,06	55,638	0,425	Fraca
	0,08	68,475	0,460	Fraca
	0,1	79,820	0,494	Fraca
09564	0,04	53,915	0,292	Fraca
	0,06	71,514	0,331	Fraca
	0,08	86,409	0,365	Fraca
	0,1	92,576	0,426	Fraca

Os extratos aquosos de sementes de funcho apresentam todos uma atividade antioxidante fraca, havendo ligeiras variações consoante a geografia da planta. As amostras 09586 e 09573 apresentam uma atividade antioxidante ligeiramente superior às restantes.

3.4.3 - Correlação entre fenóis, flavonoides e atividade antioxidante

Na quantificação dos fenóis totais e flavonoides os resultados estão expressos na figura 21, existindo uma correlação entre os fenóis totais e flavonoides. No alecrim de Angola, o extrato de etanol demonstrou uma atividade antioxidante forte, mas em valores de fenóis e flavonoides ficou abaixo dos valores do extrato de acetato de etilo, este, que demonstrou uma atividade antioxidante moderada.

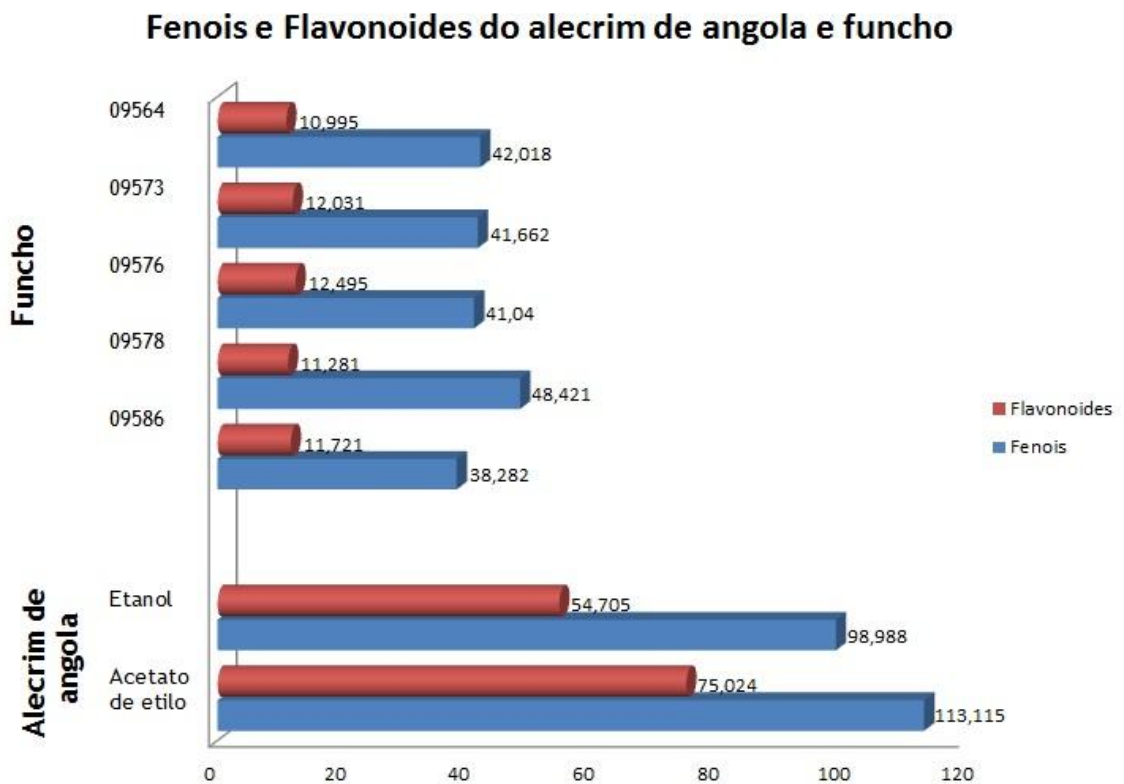


Figura 21 - Gráfico comparativo entre os fenóis e flavonoides do alecrim de Angola e do funcho.

3.5 - Análise por HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD apenas foi efetuada nos extratos aquosos de sementes de funcho, para as amostras 09586, 09578, 09573 e 09564, a diferentes comprimentos de onda: 254, 270, 280 e 329 nm.

Com a análise dos cromatogramas, encontraram-se vários picos coincidentes em todas as amostras de sementes de funcho, destes picos foram identificados por comparação com padrões dois compostos: ácido tânico e ácido cafeico.

Na identificação dos compostos foi tido em conta o seu tempo de retenção, que para o ácido cafeico é de $\pm 23,5$ minutos e para o ácido tânico é de $\pm 47,8$ minutos, assim como o seu espectro UV característico.

4 - Conclusão

O consumo de antioxidantes, tem vindo a aumentar nos últimos anos, quer por uma maior divulgação dos seus efeitos, ou até mesmo por medicação alternativa a algumas patologias. O seu consumo pode ser feito de inúmeras maneiras, mais recentemente surgiram suplementos com antioxidantes, assim como alimentos enriquecidos, principalmente os sumos naturais de fruta.

O principal problema no consumo de antioxidantes é a origem dos mesmos, no caso de antioxidantes sintéticos, o seu consumo pode levar a outras doenças, uma vez que o seu consumo prolongado, leva à acumulação nas células, o que pode causar danos hepáticos e ainda iniciar a carcinogénese.

Os problemas referidos nos antioxidantes sintéticos, levaram à procura de antioxidantes naturais, presentes nas plantas. Nas plantas, podemos encontrar poder antioxidante principalmente em dois compostos bioativos: os fenóis, e os flavonoides. A atividade antioxidante destes dois grupos de compostos, pode ser benéfica para os seres humanos, com a sequestração de radicais livres, assim como a inibição da peroxidação lipídica e prevenção de outras patologias, tais como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e até mesmo alguns tipos de cancro.

Neste trabalho, pretendia-se avaliar a atividade antioxidante, assim como quantificar os fenóis e flavonoides totais de duas plantas, o alecrim de Angola e o funcho, embora o primeiro seja menos conhecido e com menos aplicações, demonstrou ter um efeito antioxidante mais promissor que o funcho, uma erva bastante conhecida por uso no fabrico de licores e em vários pratos tradicionais.

No alecrim de Angola, fez-se uma hidrodestilação usando um Clevenger, recolhendo o extrato aquoso e o óleo essencial, e fez-se uma extração com solventes orgânicos usando um Soxhlet, com o método de polaridade crescente, usando respetivamente quatro solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo e etanol. Seguidamente procedeu-se à quantificação dos fenóis e flavonoides totais.

No funcho, recolheram-se cinco amostras de sementes de funcho, mudando a sua origem geográfica. Fez-se uma hidrodestilação usando um Clevenger, e foi recolhido o extrato aquoso e o óleo essencial para cada amostra. Por fim foram determinados os fenóis e flavonoides totais, seguida de uma análise por HPLC-DAD para identificação de compostos.

O método usado para a determinação da atividade antioxidante foi o método colorimétrico do DPPH, baseando-se na reação entre uma espécie antioxidante ou uma espécie radical, esta vai doar um átomo de hidrogénio ao átomo de azoto que possui um eletrão desemparelhado,

formando DPPH reduzido que tem uma tonalidade amarela, e como consequência irá ocorrer um decréscimo no valor de absorvância.

Para a determinação dos fenóis totais, usou-se o método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste na formação de um pigmento azul devido aos mais baixos estados de oxidação dos ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico causado pelos fenóis. Este método tem a desvantagem de poder dar falsos positivos para tióis, vitaminas, guanina, trioses de gliceraldeído, dihidroxiacetona e alguns iões inorgânicos. Para a quantificação dos flavonoides totais, foi usado um método colorimétrico, usando o cloreto de alumínio, que na presença de flavonoides vai ganhar uma tonalidade azul.

No funcho também se procedeu à análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD), para a identificação e quantificação de compostos.

Os extratos do alecrim de Angola demonstraram uma variedade de atividade antioxidante consoante a sua polaridade, o extrato do hexano demonstrou uma atividade fraca, o diclorometano e o acetato de etilo uma atividade moderada, tendo o acetato de etilo valores superiores de AAI, aproximando-se de uma atividade forte, como foi demonstrada pelo extrato do etanol e extrato aquoso. Para o funcho, todas as amostras demonstraram uma fraca atividade antioxidante.

Na quantificação dos fenóis totais e flavonoides os resultados demonstraram uma existência de uma correlação entre os fenóis totais e flavonoides. No alecrim de Angola, o extrato de etanol demonstrou uma atividade antioxidante forte, mas em valores de fenóis e flavonoides ficou abaixo dos valores do extrato de acetato de etilo, este, que demonstrou uma atividade antioxidante moderada, devido a presença de outros compostos com atividade antioxidante.

Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD), os cromatogramas revelaram uma imensidade de compostos, mas por comparação aos compostos padrão, apenas foram identificados dois compostos, o ácido tânico e o ácido cafeico, mas como se encontravam em quantidades muito baixas, não foi possível quantificar.

Em suma, das duas plantas analisadas neste trabalho, o alecrim de Angola demonstra um potencial muito superior para ser usado como antioxidante, tanto nos extratos orgânicos, no caso do acetato de etilo e etanol, mas principalmente no extrato aquoso, este, que demonstrou uma atividade antioxidante superior a todos os extratos orgânicos. Os extratos aquosos das sementes de funcho demonstraram uma baixa atividade antioxidante.

A baixa atividade antioxidante do funcho, pode dever-se a neste trabalho, apenas serem analisadas as sementes, num futuro trabalho, a análise das folhas, assim como a extração com solventes orgânicos, poderá ter resultados diferentes.

A análise do óleo essencial, também deveria ter sido em conta, uma vez que pode conter muitos compostos responsáveis por atividade antioxidante, e neste caso, não foram analisados, devido a grande quantidade de planta requerida para a extração de quantidade suficiente de óleo essencial.

5 - Bibliografia

1. Proença da Cunha, A., Roque, O.D., (2011) Plantas medicinais da farmacopeia portuguesa, 2º Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
2. Philippe, G., Angenot, L., Tits, M., Frederich, M., (2004) About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids, *Toxicon* 44 (2004) 405-416.
3. Sarer, E., Gökbulut, A., (2008) Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of *Vitex agnus castus*, *Tur. J. Pharm. Sci.* 5 (3), 167-174.
4. Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., Mete, E., (2009) Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey, *Food and Chemical Toxicology* 47 2479-2483.
5. Proença da Cunha, A., Teixeira, F., Pereira da Silva, A., Roque, O.D., (2010) Plantas na terapêutica farmacologia e ensaios clínicos, 2º Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
6. <http://www.vilmorin-tree-seeds.com/seeds/shrubs/entry-13138-vitex-agnus-castus.html> (consultado a 14/06/2013)
7. http://www.saws.org/conservation/outdoor/plants/PlantDrill.cfm?Plant_id=60&Plant_G_ID=2 (consultado a 14/06/2013)
8. Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., (2003) Seidlová-Wuttke, D., Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) -Pharmacology and clinical indications, *Phytomedicine* 10: 348-357.
9. Saglam,H., Pabuçcuo, A., Kivçak,B., (2007) Antioxidant Activity of *Vitex agnus-castus* L. Extracts, *Phytother. Res.*, 21, 1059-1060.
10. Hanelt, P., (2001) Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals). Berlin: Springer.
11. Meier, B.,Berger, D., Hoberg, E., Sticher, O., Schaffner, W., (2000) Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro, *Phytomedicine Vol.* 7(5), pp. 373-381.
12. He, Z., Chen, R., Zhou, Y., Geng, L., Zhang, Z., Chen, S., Yao, Y., Lu, J., Lin, S., (2009) Treatment for premenstrual syndrome with *Vitex agnus castus*: A prospective, randomized, multi-center placebo controlled study in China, *Maturitas* 63 (2009) 99-103.

13. Westphal, L.M., Polan, M.L., Trant,A.S., Mooney, S.B., (2004) *Vitex agnus castus* extract in the treatment of luteal phase defects due to latent hyperprolactinemia. Results of a randomized placebo-controlled double-blind study: a pilot study. *J.Reprod. Med.* 49:289-93.
14. http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Foeniculum_vulgare.JPG (consultado a 16/08/2013)
15. http://gardener.wikia.com/wiki/Florence_fennel (consultado a 16/08/2013)
16. http://www.salomonsl.com/en/productos_categoria.aspx?nom=Fennel%20Seeds&frmid=15&idsubcat=81&idprod=144 (consultado a 16/08/2013)
17. Diaz-Maroto, M.C., Hidalgo, I.J.D., Saanchez-Palomo, E., Peñerez-Coello, M.S., (2005) Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5385-5389.
18. Proença da Cunha, A., (2010) “Farmacognosia e fitoquímica”, 3ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
19. Agarwal, R., Gupta, S.K., Agarwal, S.S., Srivastava, S., Saxena, R., (2008) Oculohypotensive effects of *Foeniculum vulgare* in experimental models of glaucoma. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 52, 77-83.
20. Cantore, P.L., Iacobelli, N.S., Marco, A.D., Capasso, F., Senatore, F., (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller). Essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7862-7866.
21. Kaur, G.J., Arora, D.S., (2008) In-vitro antibacterial activity of three plants belonging to the family *Umbelliferae*. *Int. J. Antimicrob Agents* 31, 393-395.
22. Abed, K.F., (2007) Antimicrobial activity of essential oils of some medicinal plants from Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 14, 53-60.
23. Rather, M. A., Dar, B.A., Sofi, S.N., Bhat, B.A, Qurishi, M.A., (2012) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety, *Arabian Journal of Chemistry*, (in press).
24. Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina, C., (2008) Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different mediterranean countries. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1912-1920.

25. Parejo, I., Jauregui, O., Saáñchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., (2004) Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3679-3687.
26. Tognolini, M., Ballabeni, V., Bertoni, S., Bruni, R., Impicciatore, M., Barocelli, E., (2007) Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol. Res.* 56, 254-260.
27. Choi, E.M., Hwang, J.K., (2004) Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75, 557-565.
28. Ozbek, H., Ugras, S., Dulger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Ozturk, G., Ozturk, A., (2003) Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia* 74, 317-319.
29. El-Soud, N.A., El-Laithy, N., El-Saeed, G., Wahby, M.S., Khalil, M., Morsy, F., Shaffie, N., (2011) Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. Essential oil in Streptozotocin induced diabetic rats. *Macedonian, J. Med. Sci.* 173, 1857-5773.
30. Pradhan, M., Sribhuwaneswari, S., Karthikeyan, D., Minz, S., Sure, P., Chandu, A.N., Mishra, U., Kamalakannan, K., Saravanankumar, A., Sivakumar, T., (2008) In-vitro cytoprotection activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in cultured human blood lymphocytes and antitumour activity against B16F10 melanoma cell line. *Res. J. Pharm. Technol.* 1 (14), 450-452.
31. Kim, D.H., Kim, S.I., Chang, K.S., Ahn, Y.J., (2002) Repellent activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Agric. Food Chem.* 50, 6993-6996.
32. Javidnia, K., Dastgheib, L., Samani, S.M., Nasiri, A., (2003) Antihirsutism activity of Fennel (fruits of *Foeniculum vulgare*) extract: a double-blind placebo controlled study. *Phytomedicine* 10, 455-458.
33. Ostad, S.N., Soodi, M., Shariffzadeh, M., Khorshidi, N., Marzban, H., (2001) The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study. *J. Ethnopharmacol* 76, 299-304.
34. Subehan, Zaidi, S.F.H., Kadota, S., Tezuka, Y., (2007) Inhibition on human liver cytochrome P450 3A4 by constituents of fennel (*Foeniculum vulgare*): identification and characterization of a mechanism-based inactivator. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10162-10167.
35. Chang, R., (1994) Química, 5ª Edição, McGrawHill, Amadora.

36. 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.
37. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D., (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-1014.
38. Deng, J., Cheng, W., Yang, G., (2011) A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay, *Food Chemistry*, 125, 1430-1435.
39. Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., (2002) Methods for testing antioxidant activity, *The Royal Society of Chemistry*, 127: 183 -198.
40. Devlin, T., (1997) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 4th edition, John Wiley, York.
41. Scherer, Rodrigo, Godoy, H. T., (2009) Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 112, 654-658.
42. 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.
43. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5b/Termination_-_with_impurity_2.png (consultado a 04/10/2013)
44. <http://projectsday.hci.edu.sg/2009/15-FinalsWeb/Cat-01/1-61/results2.html> (consultado a 07/07/2013)
45. Sathyaprabha, G.; Kumaravel, S.; Panneerselvam, A., (2011) Analysis of Antioxidant activity, Total Phenol, Total Flavonoid and screening of Phytocomponents in *Pleurotus platypus* and *Pleurotus eous*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 1-6.
46. Marcucci, M., Woisky, R., Salatino, A., (2008) Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis, *Journal of Apiculture Research*. (*in press*).
47. Pourmorad F., Hosseinimehr S., Shahabimajd N., (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1142-1145.
48. 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.

49. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C., (2004) Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta*, 512,271-280.
50. Garcia, A. A.; Grande, B.C.; Gandara, J. S.; (2004) Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers, *Journal of chromatography A*, 1054, 175-180.
51. Yao, H., Chen, Y., Shi, P., (2012) Screening and quantitative analysis of antioxidants in the fruits of *Livistona chinensis* R. Br using HPLC-DAD-ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay, *Food Chemistry*, 135, 2802-2807.
52. Latoui, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Seffena, M., Converti, A., Perego, P., (2012) Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L., food and bioproducts. (*in press*).
53. Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ana Ciric, A., Ristic, M., Grubišić, D., (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils, *Food Chemistry* 128, 1017-1022.
54. Oktay, M., Gulcin, I., Kufrevioglu, I., (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 36 263-271.
55. Heim, K. E., Tagliaferro, R., Bobilya, D. J., (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
56. Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, O. B., (2003) Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Journal of Food Science*, 68, 487-490.

6 - Anexos

Anexo 1 - Equipamentos utilizados

Rota Vapor

Büchi Rotavapor R114

Espectrofotómetro

Thermo Fisher Scientific

Madison, WI 53711 USA

Model Evolution 160

CAT 10100301

100-240 VAC 50/60 Hz 160 VA

Sistema Operativo:

- a) Thermo Electron UV - Visible Spectroscopy

Vision Version 4.10

Math Version 24.00

- b) Spectrofotometer EV 160

App. Software version v 8.01

Boot Software version v 4.80

Célula de Quartzo:

Malq - 010 - 002

Batch no.: 8726

Standart (macro) cell with lid,

10 mm, Quartz, 2 pcs

HPLC

VWR-Hitachi Elite LabChrom

Forno: L-2300

Bomba: L-2130

Detetor de rede de díodos: L-2455

Coluna de fase reversa Lichospher® RP-18, (250 x 4 mm) com um diâmetro de partícula de 5 µm (Merk)

Anexo 2 - Atividade Antioxidante

Alecrim de Angola

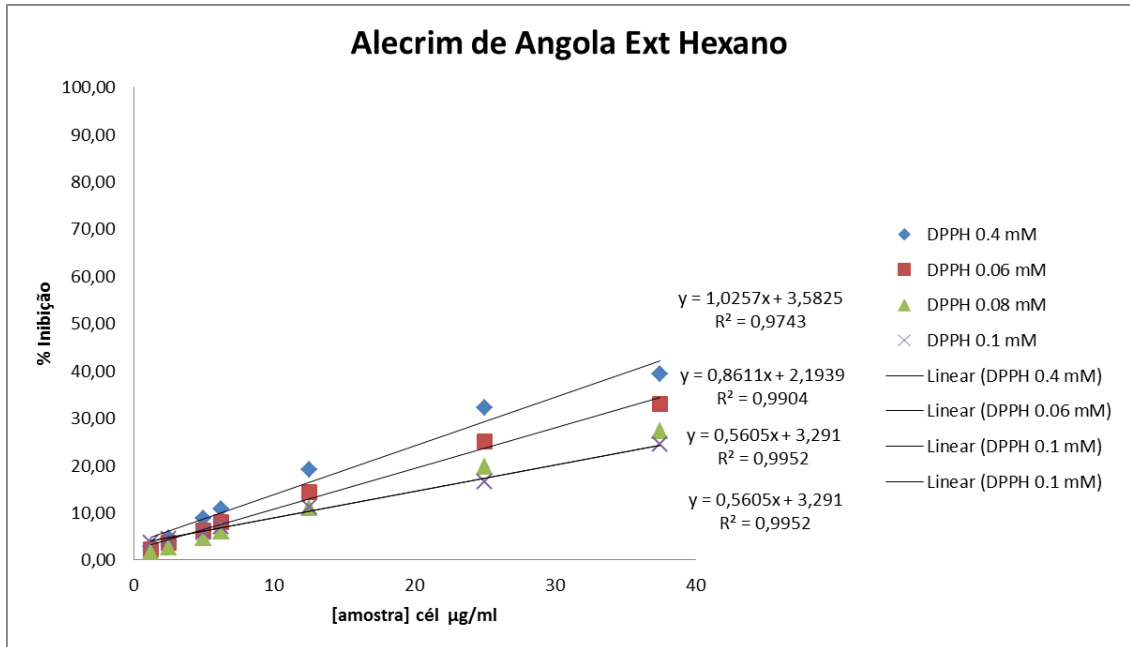


Figura 22 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de hexano do alecrim de Angola.

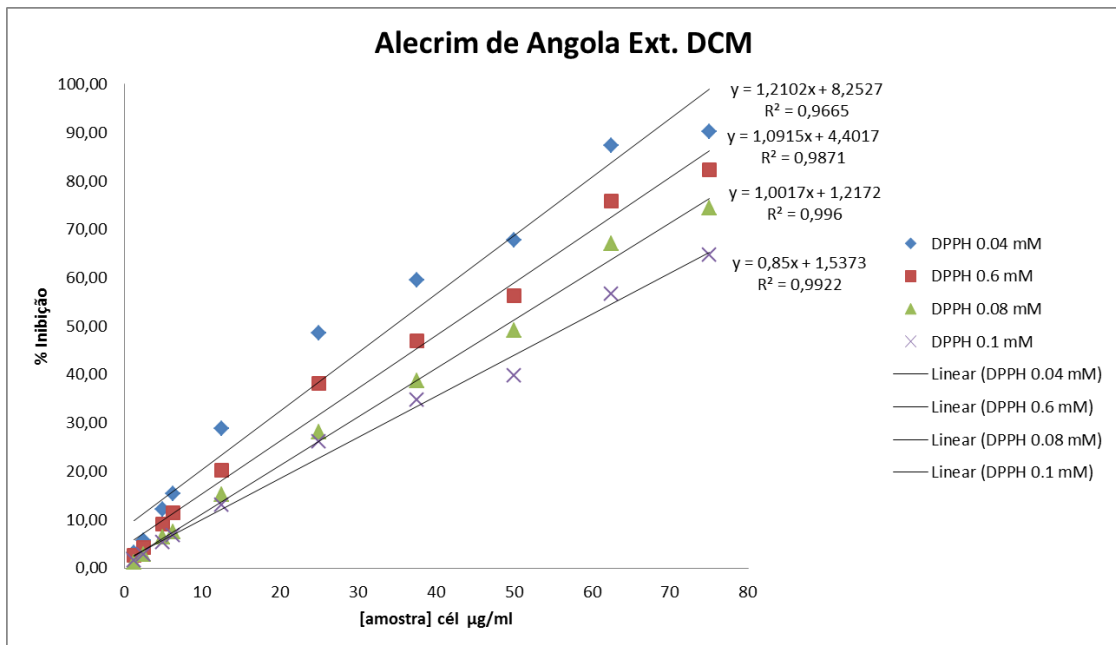


Figura 23 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de diclorometano do alecrim de Angola.

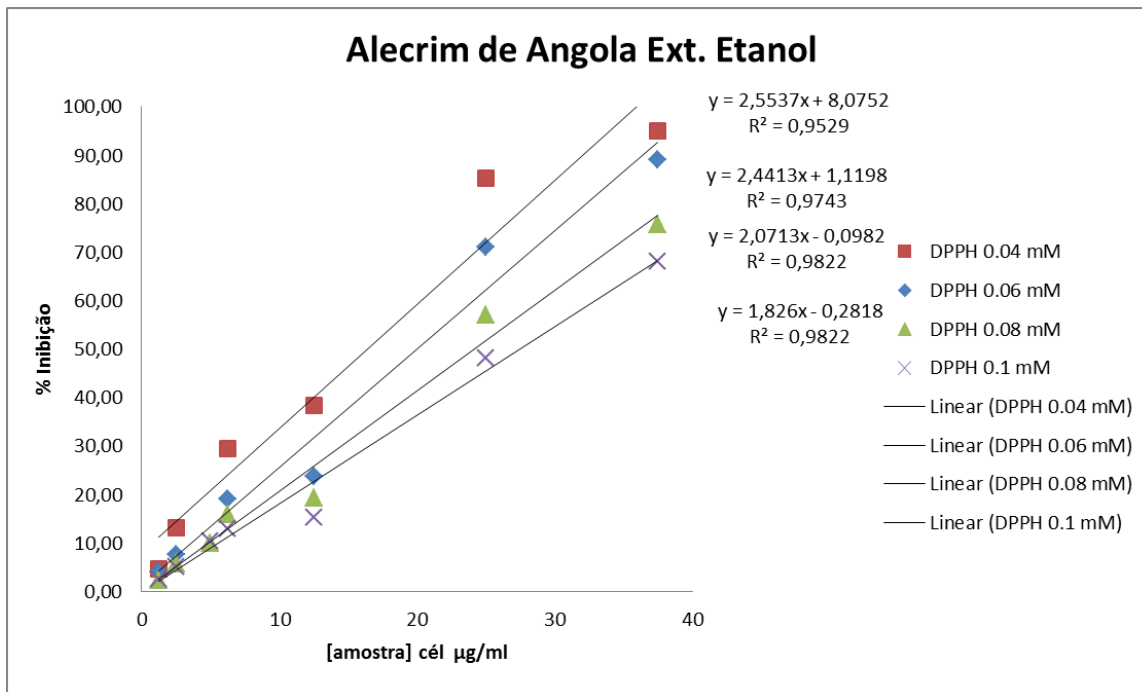


Figura 24 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de etanol do alecrim de Angola.

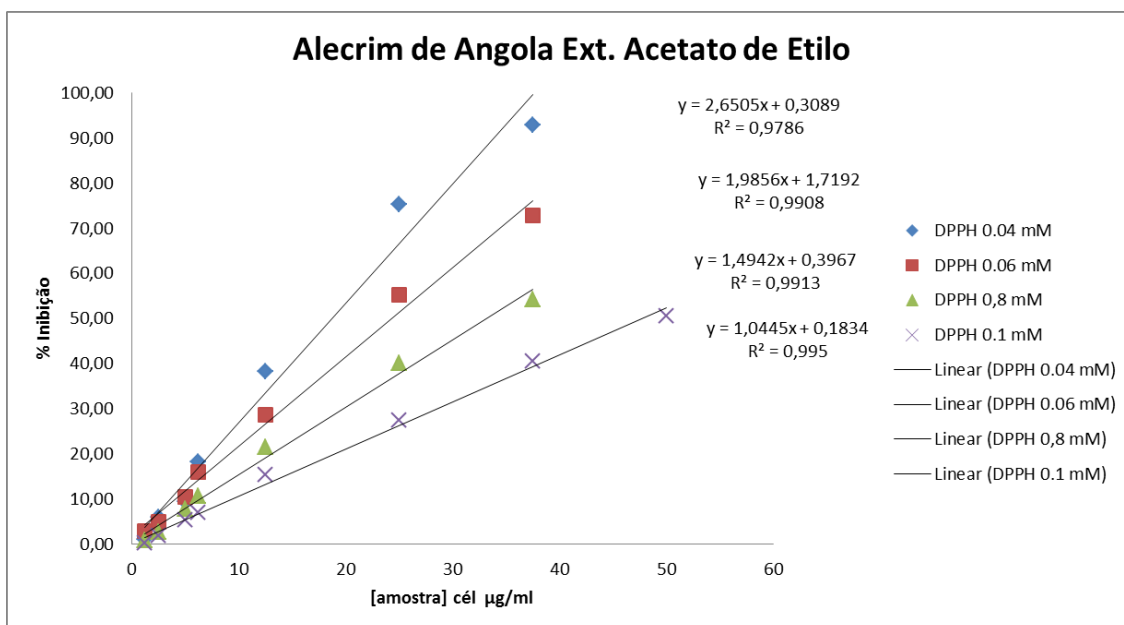


Figura 25 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato de acetato de etilo do alecrim de Angola.

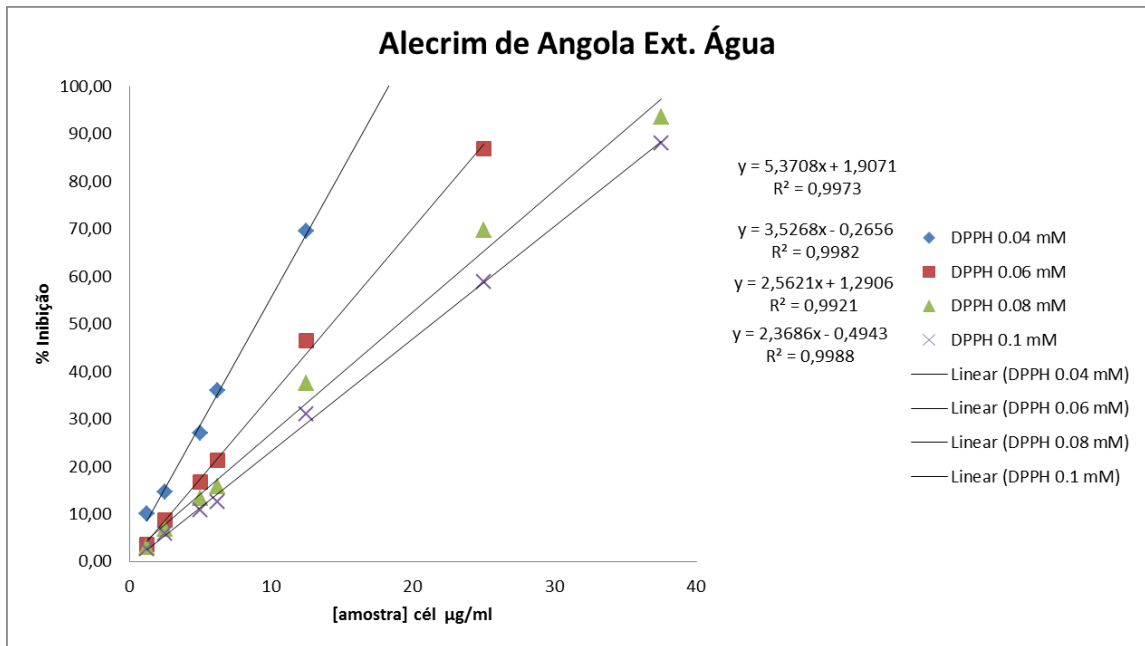


Figura 26 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para o extrato aquoso do alecrim de Angola.

FUNCHO

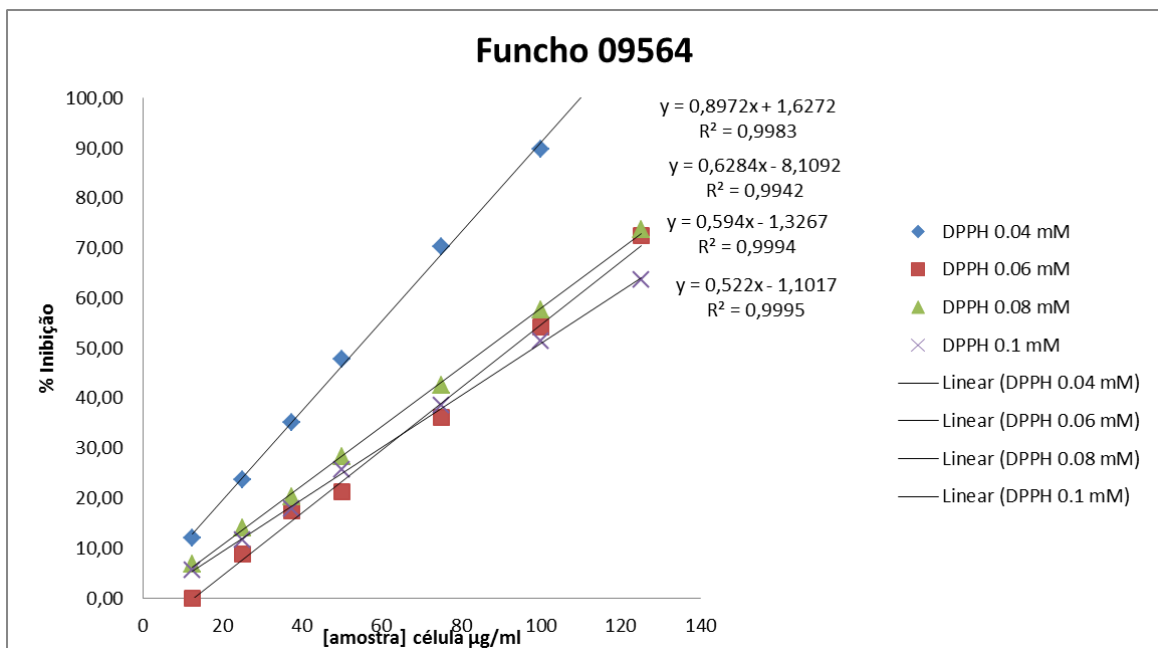


Figura 27 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09564 das sementes de funcho.

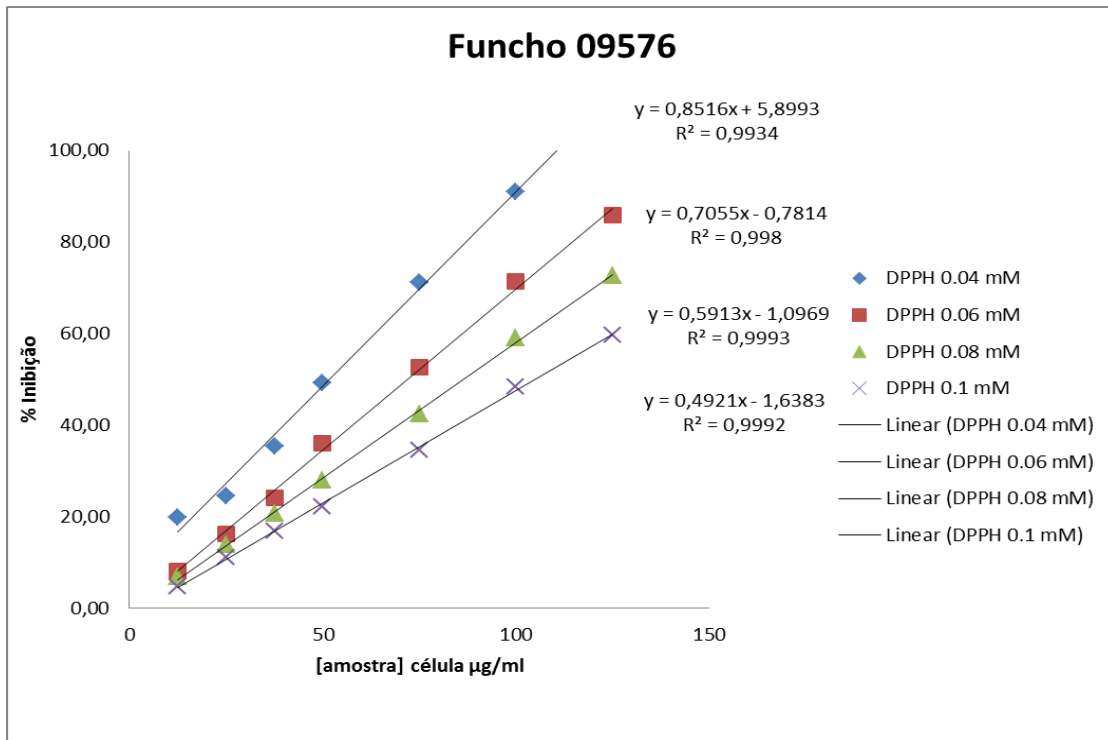


Figura 28 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09576 das sementes de funcho.

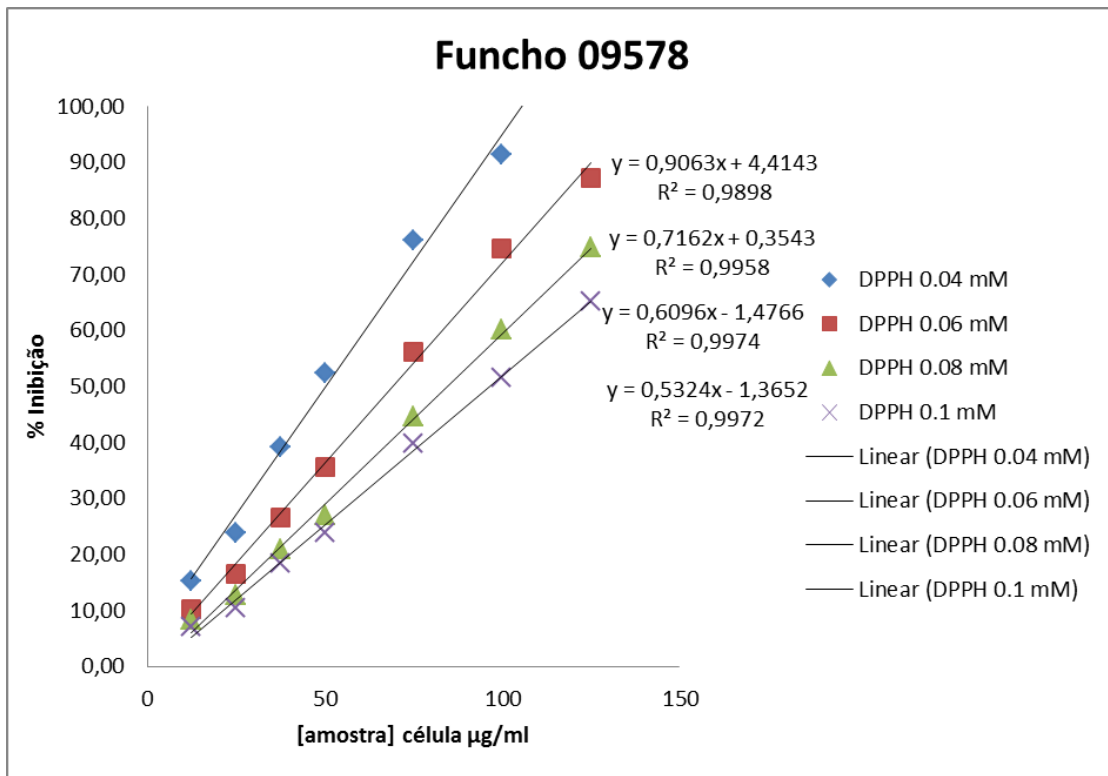


Figura 29 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09578 das sementes de funcho.

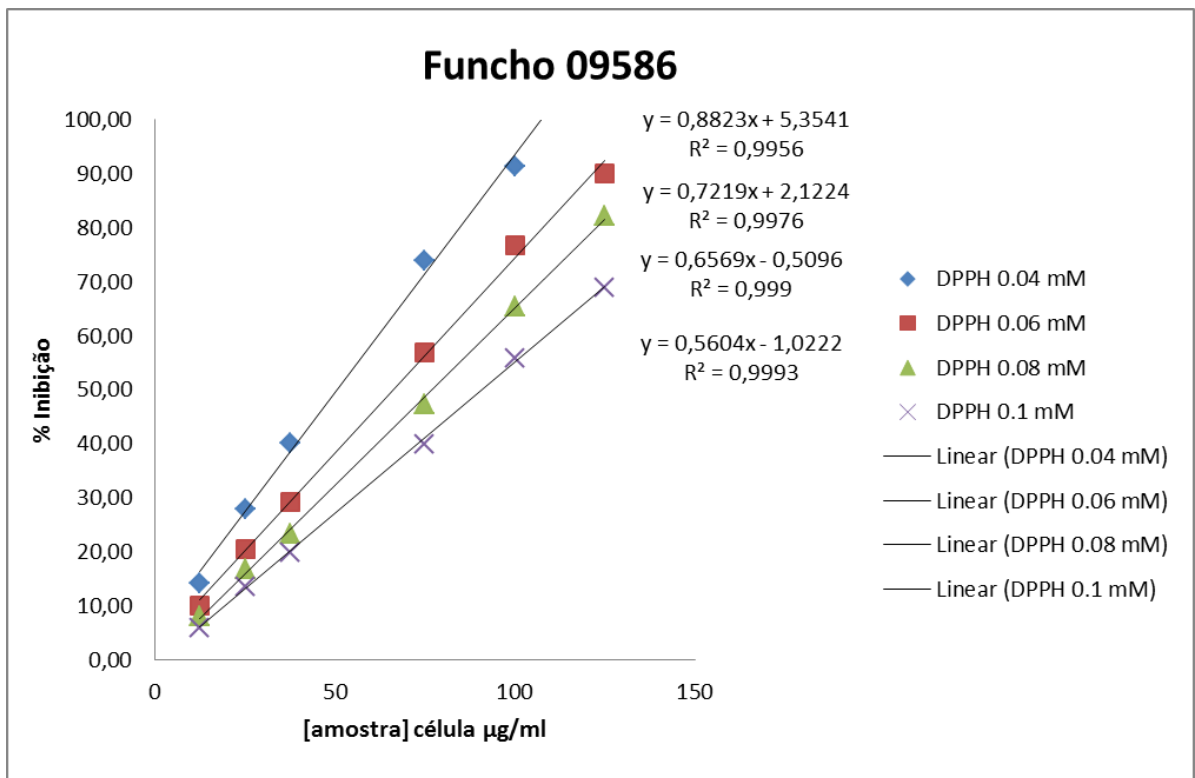


Figura 30 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09586 das sementes de funcho.

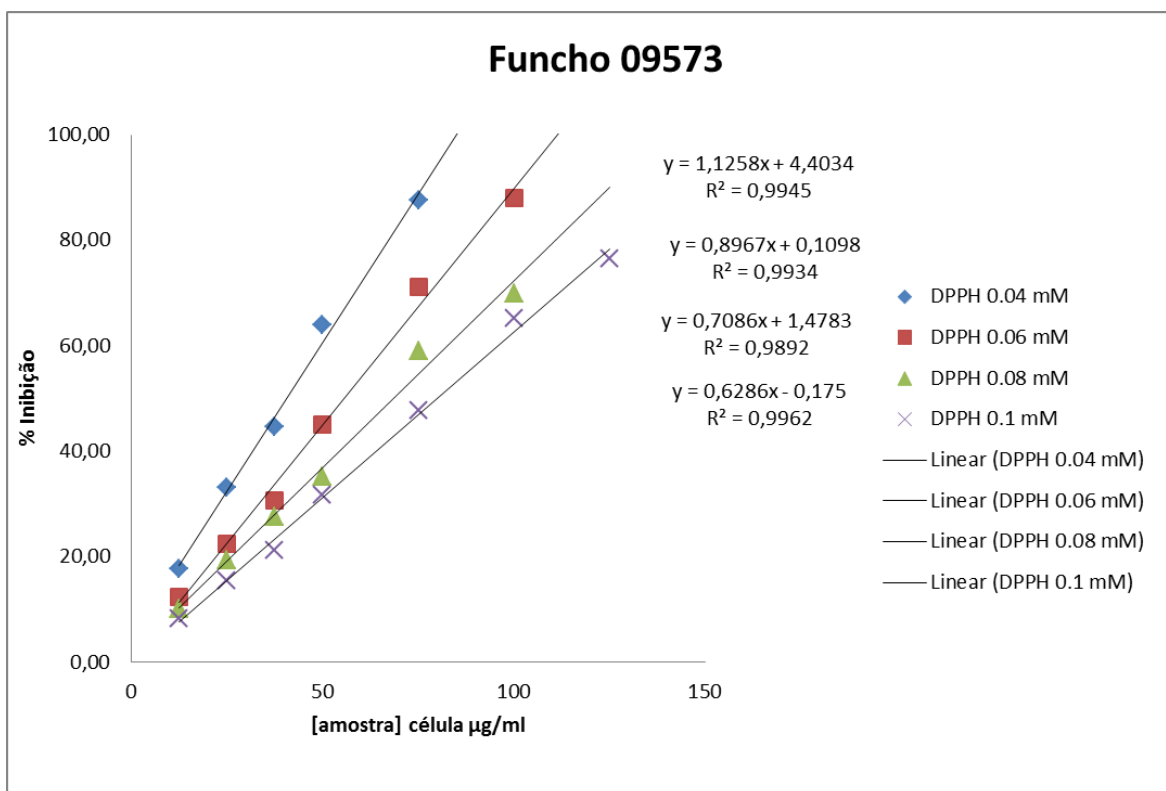


Figura 31 - Gráfico com a avaliação da % inibição vs [amostra], usando quatro concentrações de DPPH, para a amostra 09573 das sementes de funcho.

ANEXO 3 - DPPH Remanescente

Alecrim de Angola

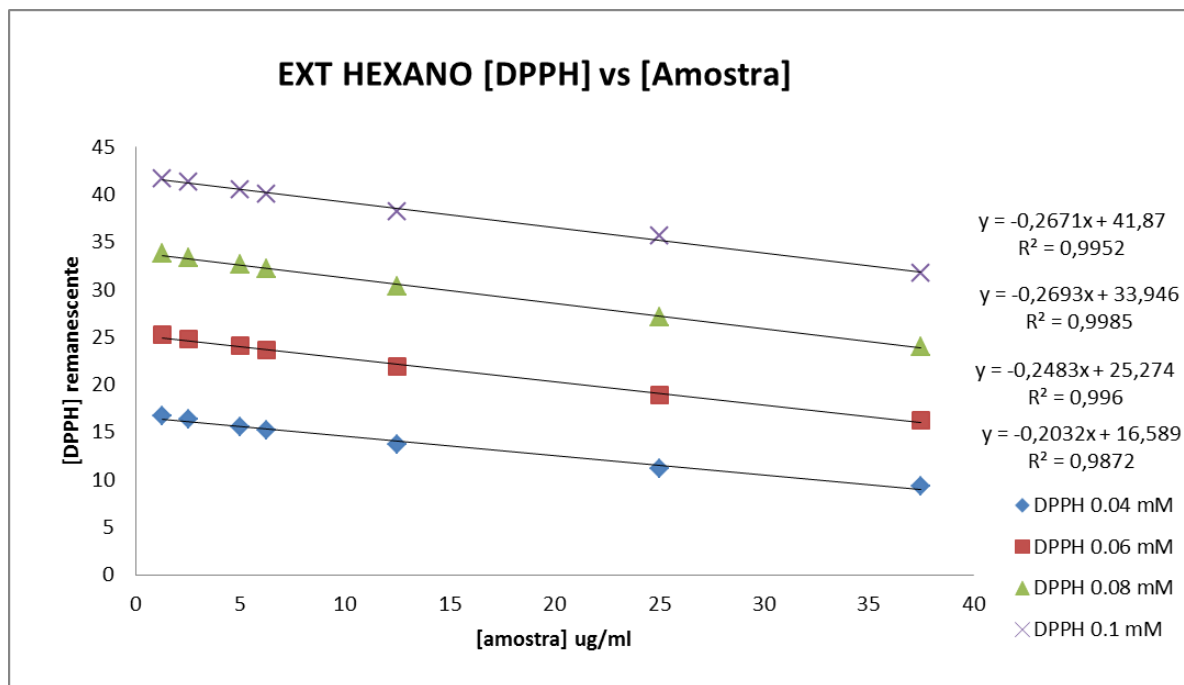


Figura 32 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de hexano do alecrim de Angola.

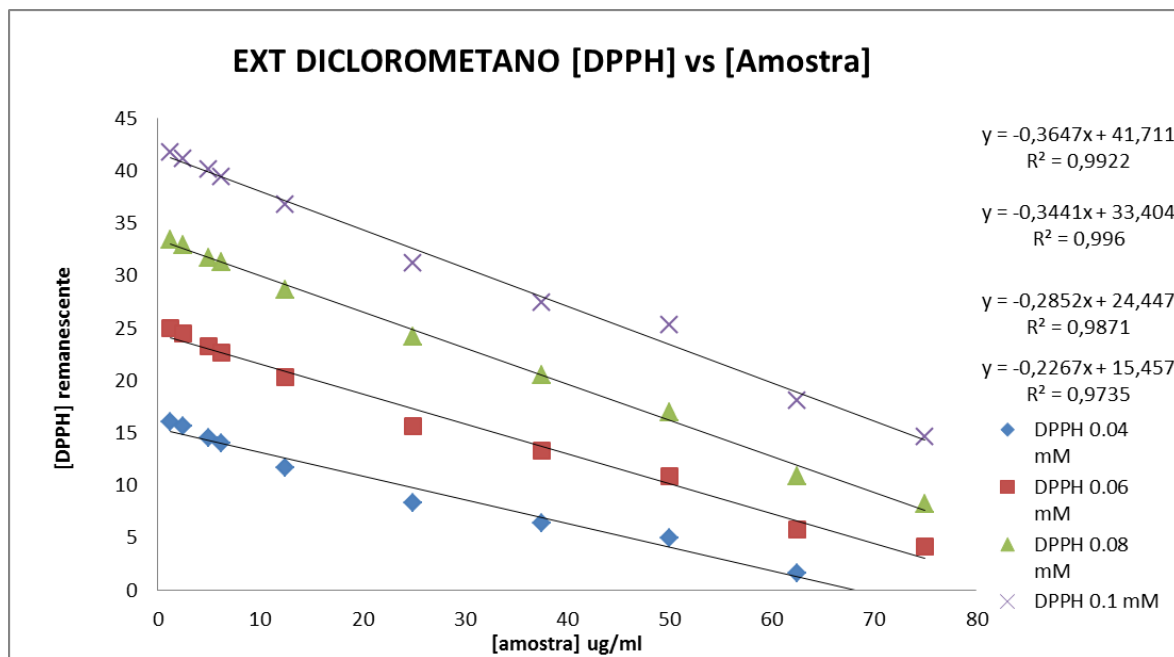


Figura 33 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de diclorometano do alecrim de Angola.

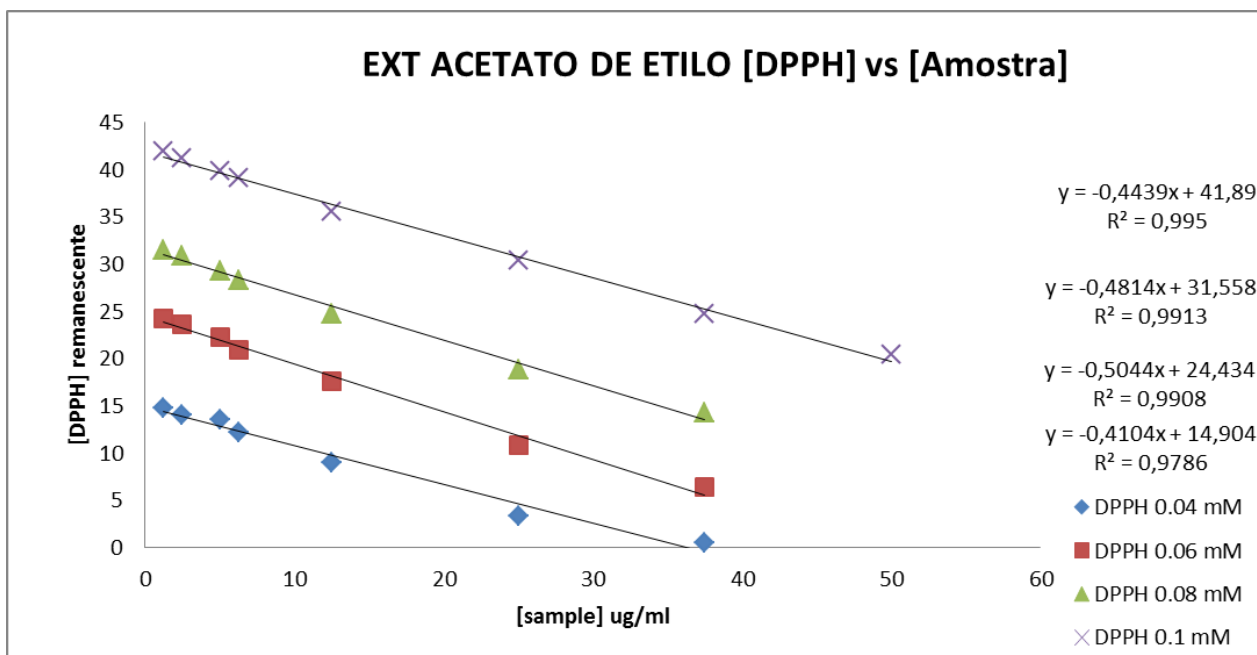


Figura 34 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de acetato de etilo do alecrim de Angola.

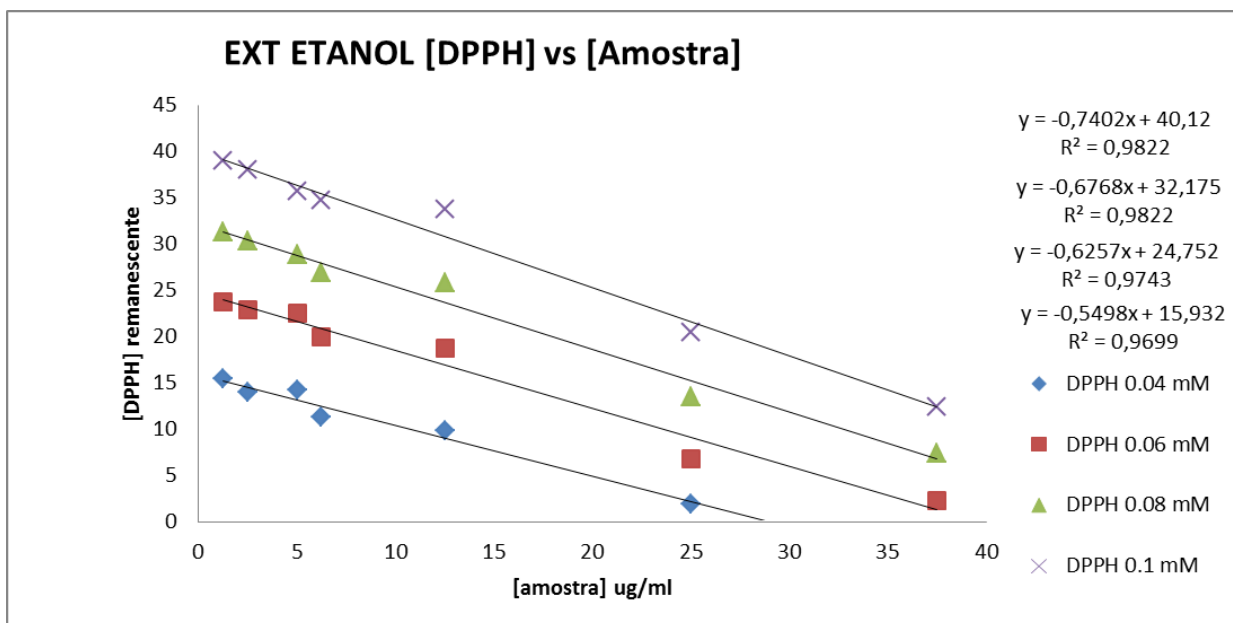


Figura 35 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato de etanol do alecrim de Angola.

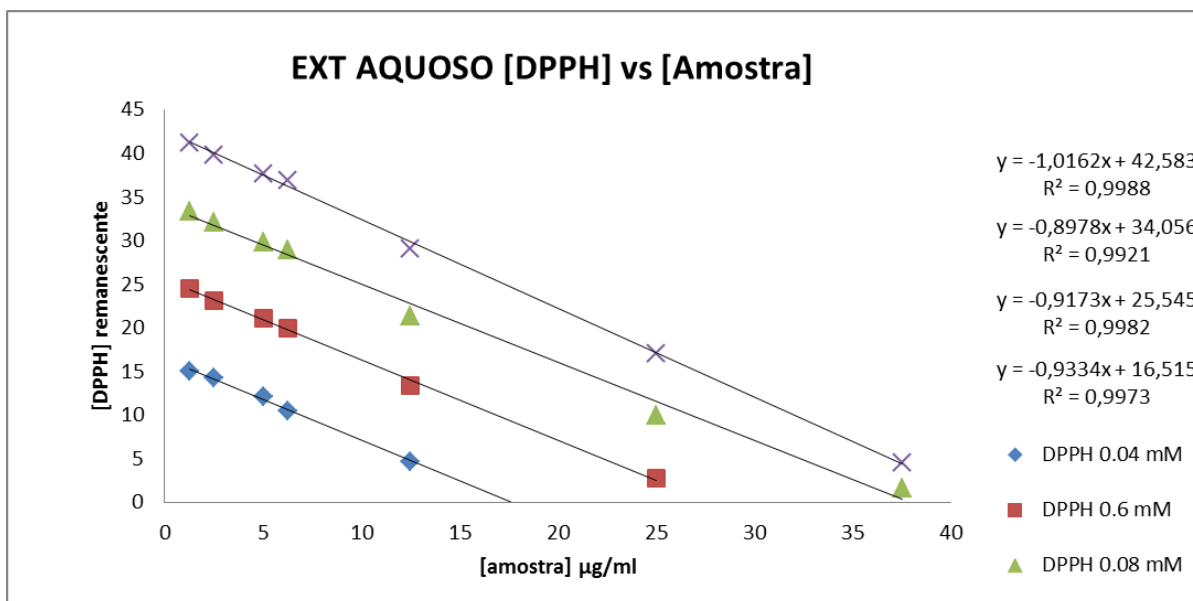


Figura 36 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso do alecrim de Angola.

Funcho

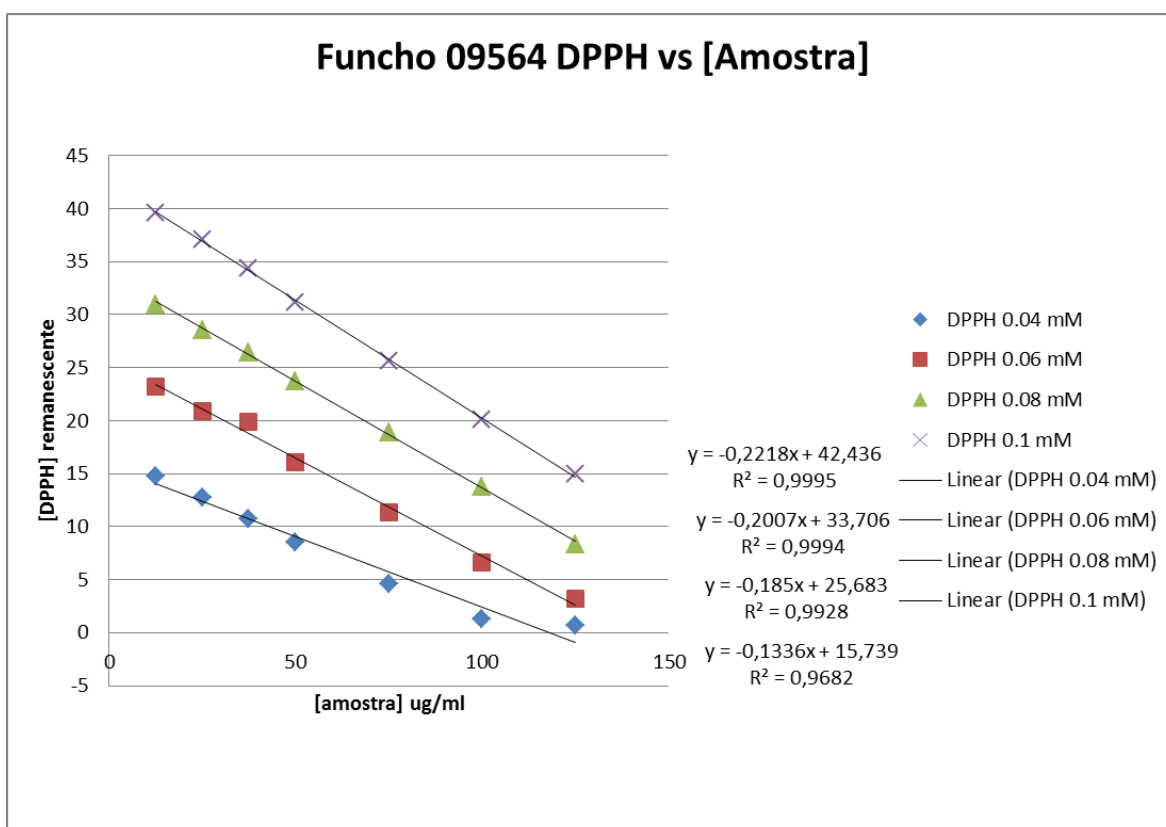


Figura 37 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09564 das sementes de funcho.

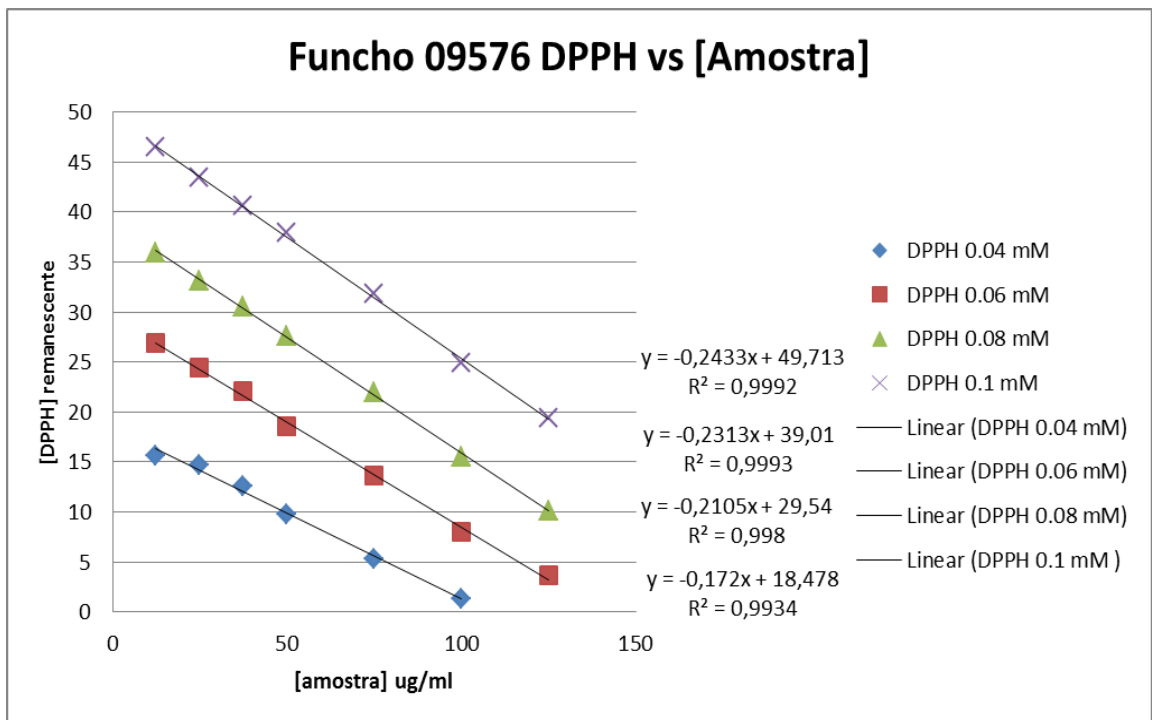


Figura 38 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09576 das sementes de funcho.

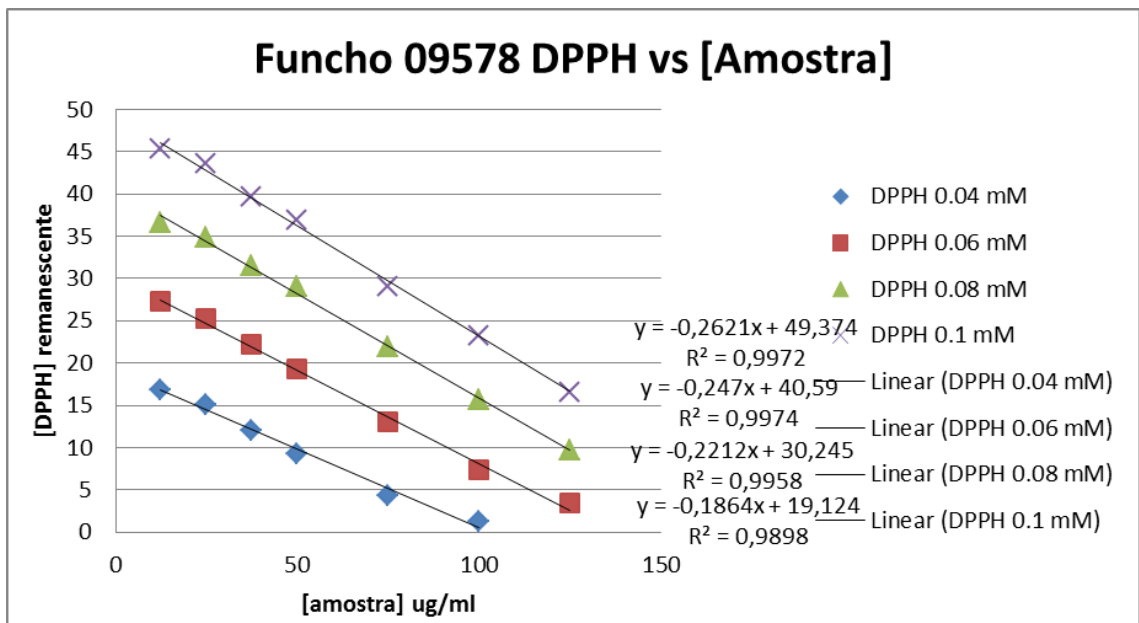


Figura 39 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09578 das sementes de funcho.

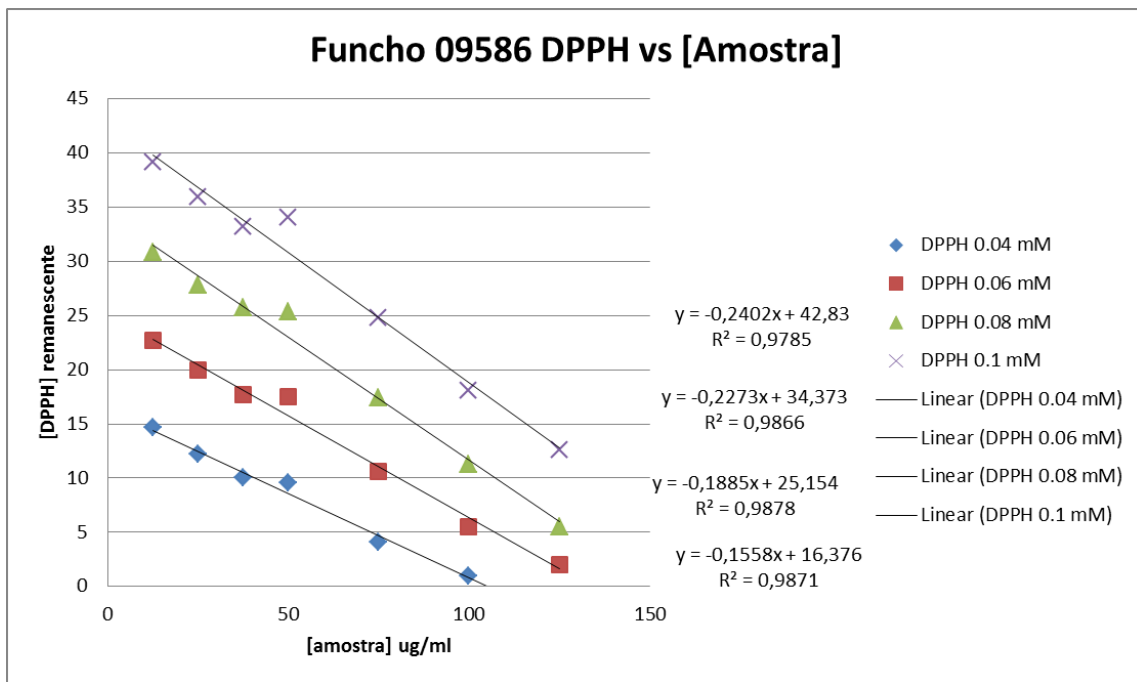


Figura 40 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09586 das sementes de funcho.

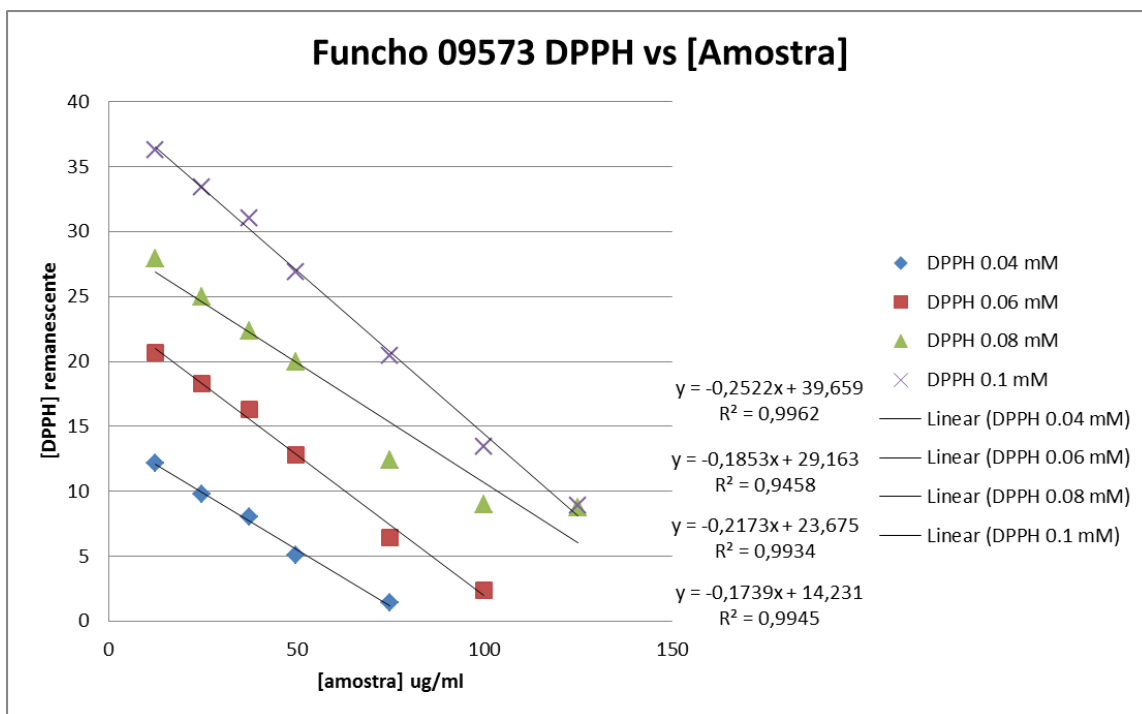


Figura 41 - Gráfico do DPPH Remanescente vs concentração da amostra para o extrato aquoso da amostra 09573 das sementes de funcho.

ANEXO 4 - Cromatogramas obtidos por HPLC

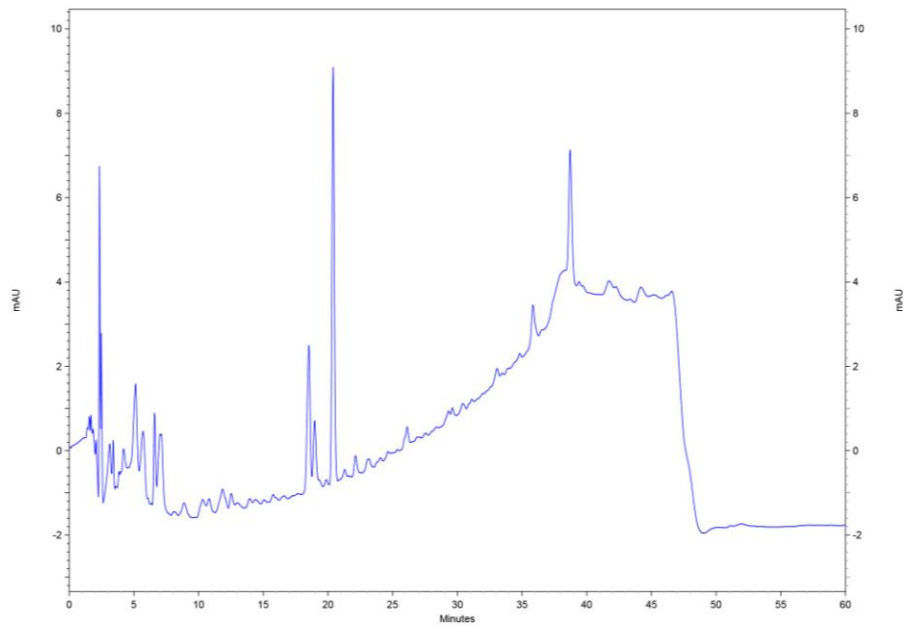


Figura 42 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 254 nm.

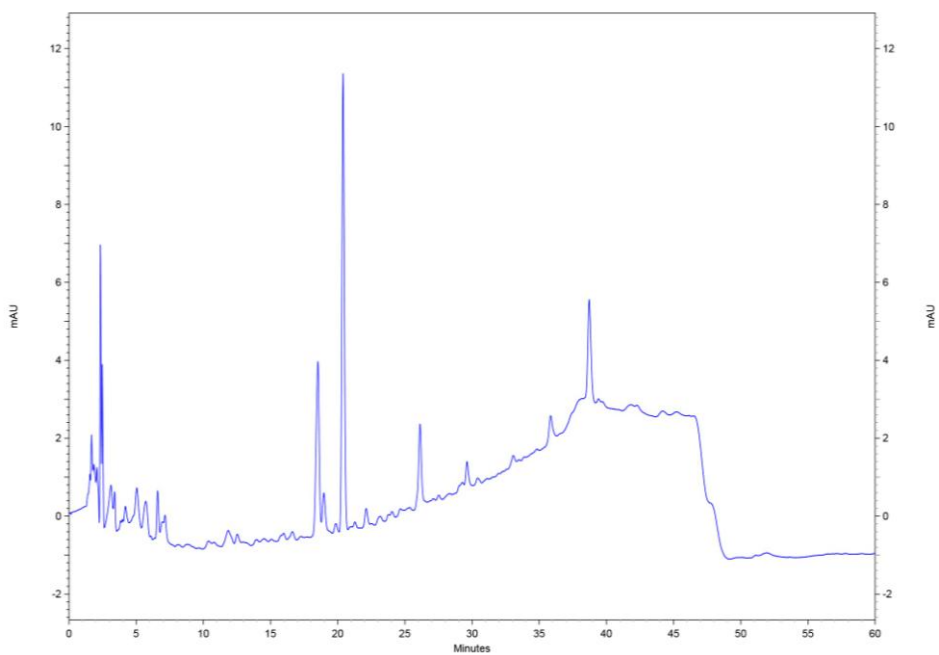


Figura 43 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 270 nm.

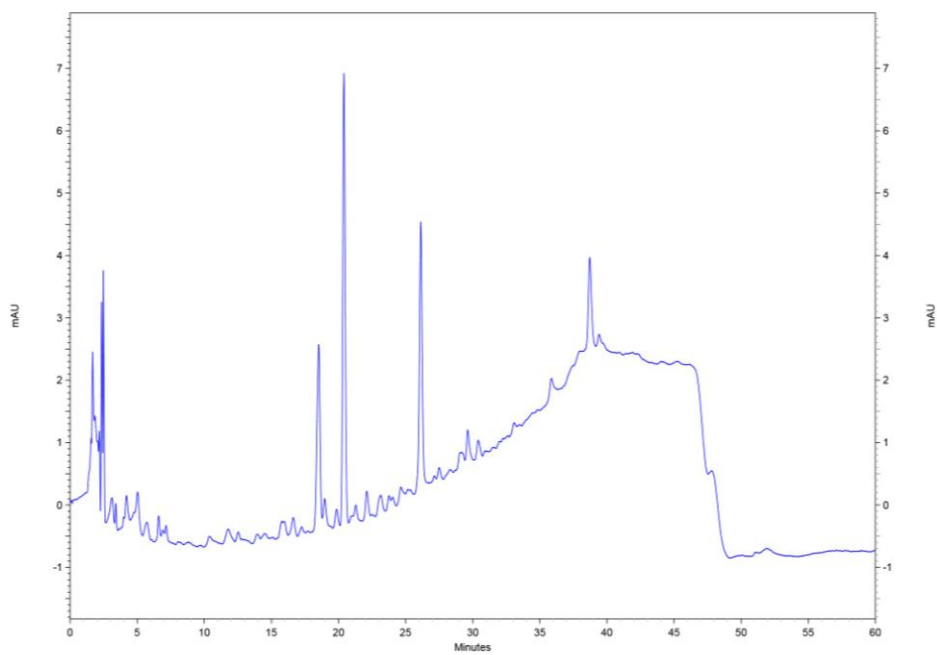


Figura 44 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 280 nm.

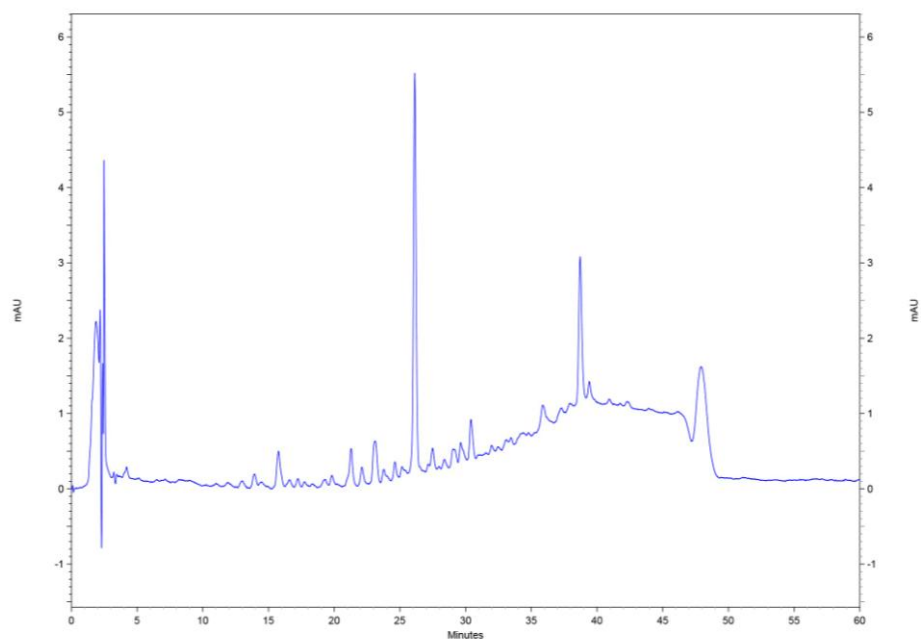


Figura 45 - Cromatograma da amostra 09564 de semente de funcho a 329 nm.

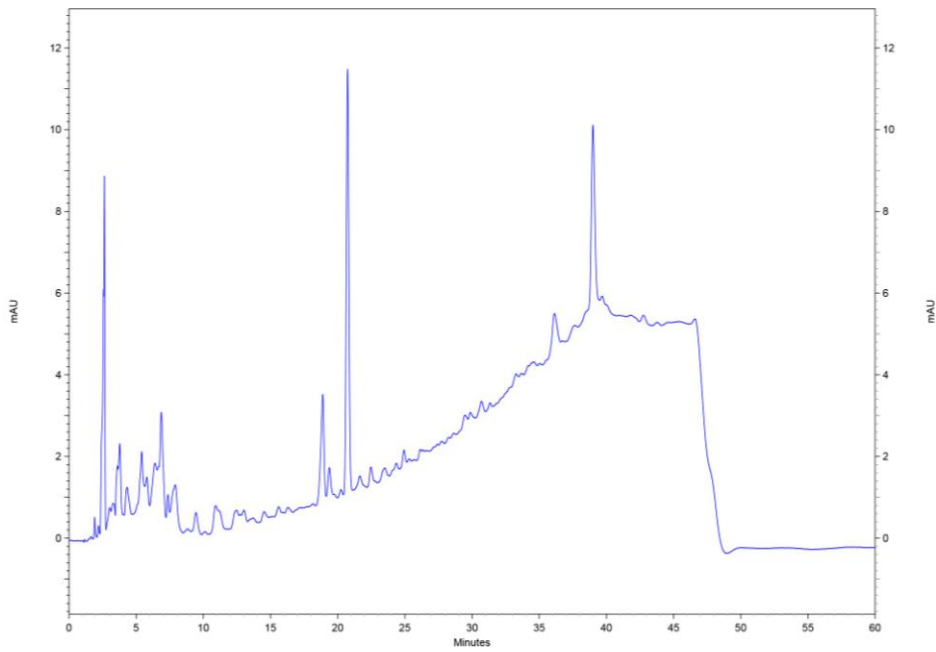


Figura 46 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 254 nm.

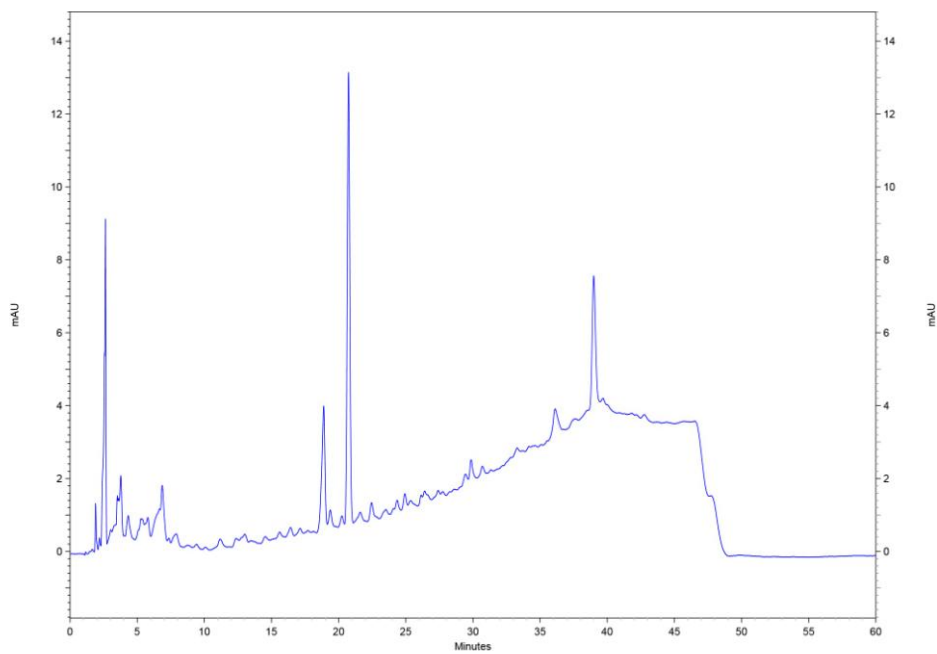


Figura 47 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 270 nm.

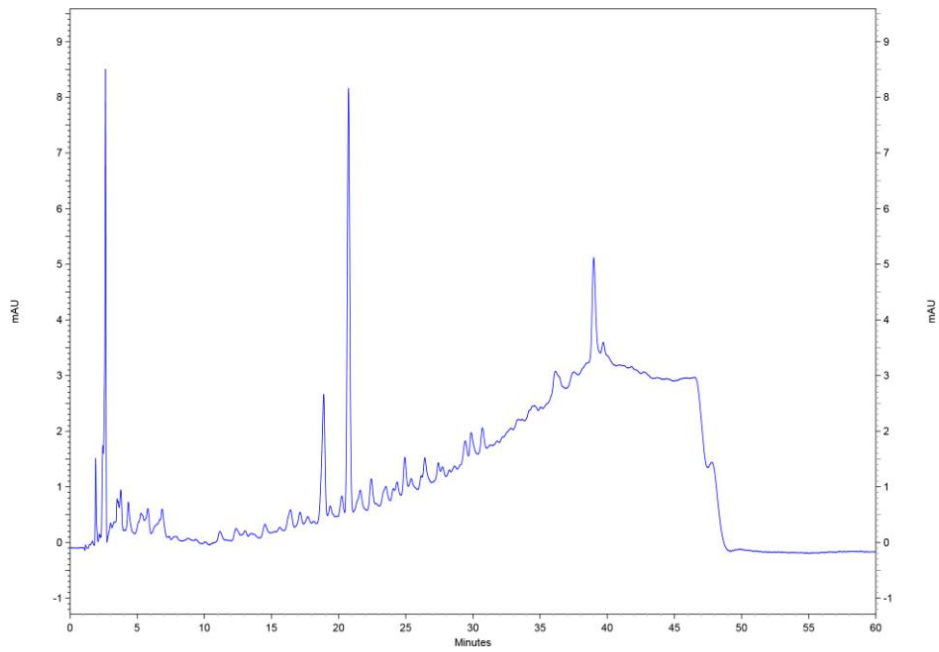


Figura 48 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 280 nm.

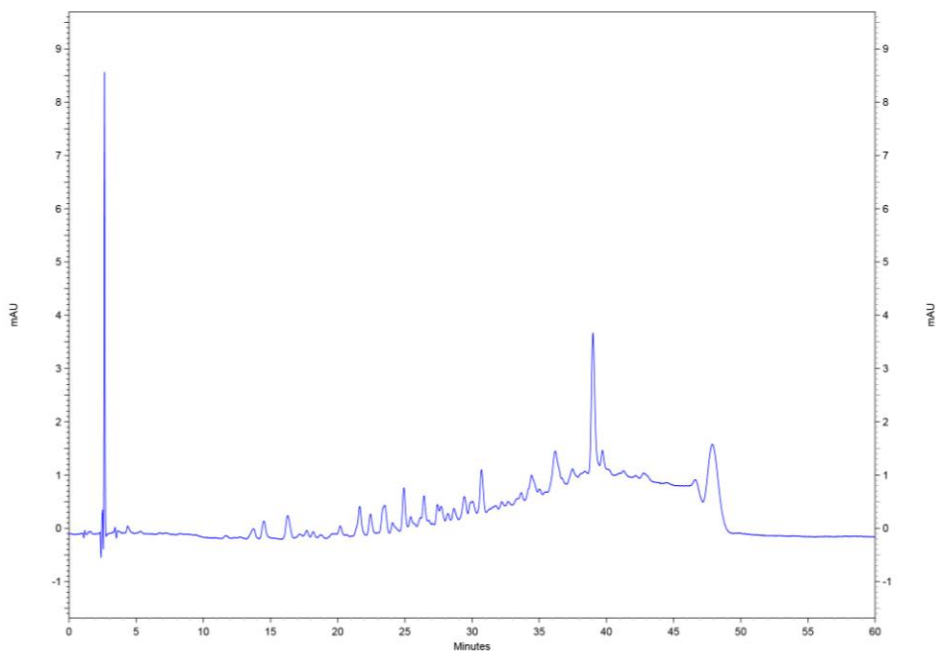


Figura 49 - Cromatograma da amostra 09578 de semente de funcho a 329 nm.

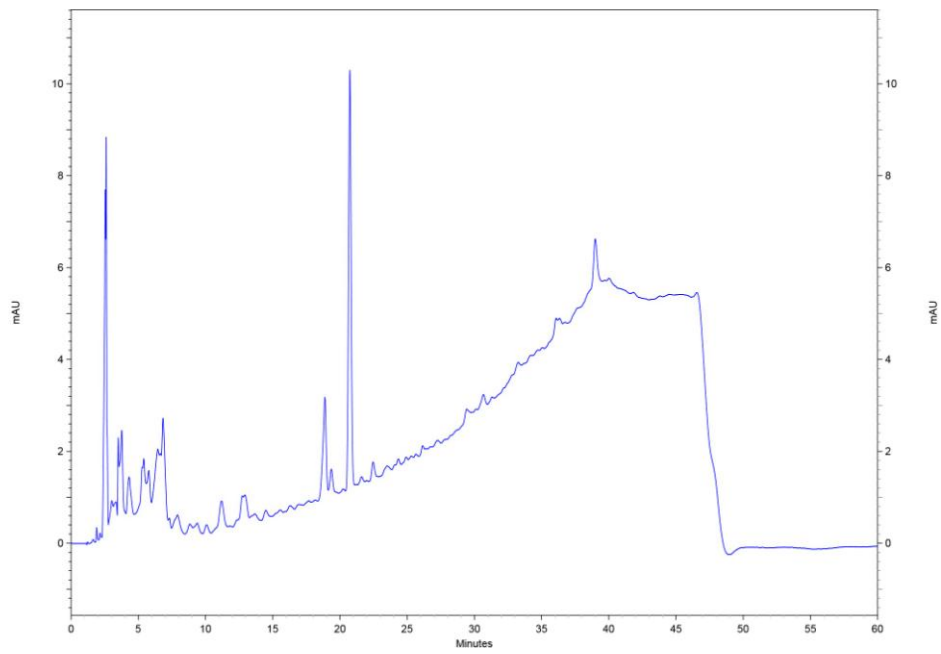


Figura 50 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 254 nm.

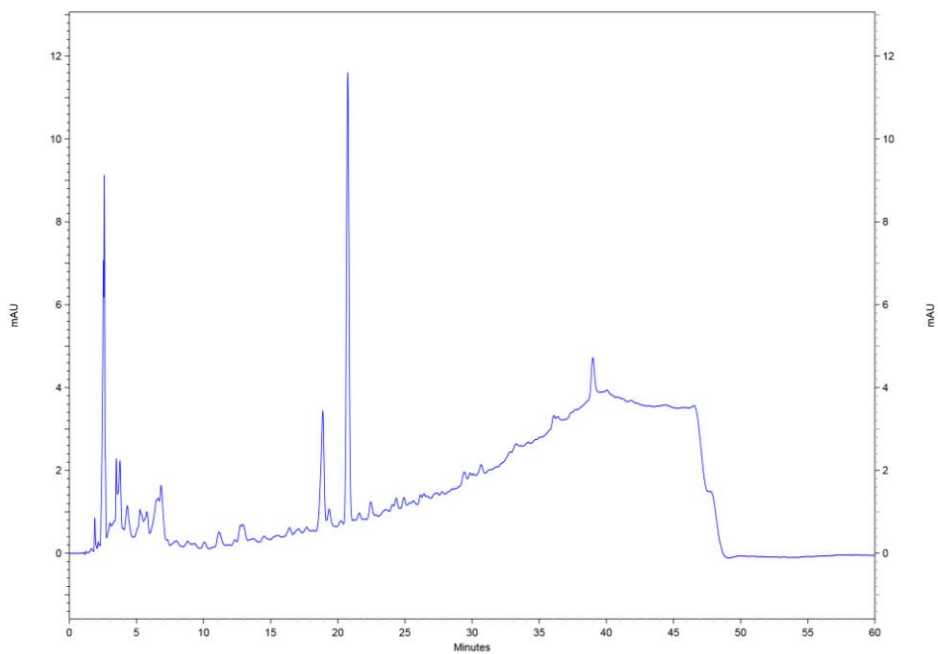


Figura 51 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 270 nm.

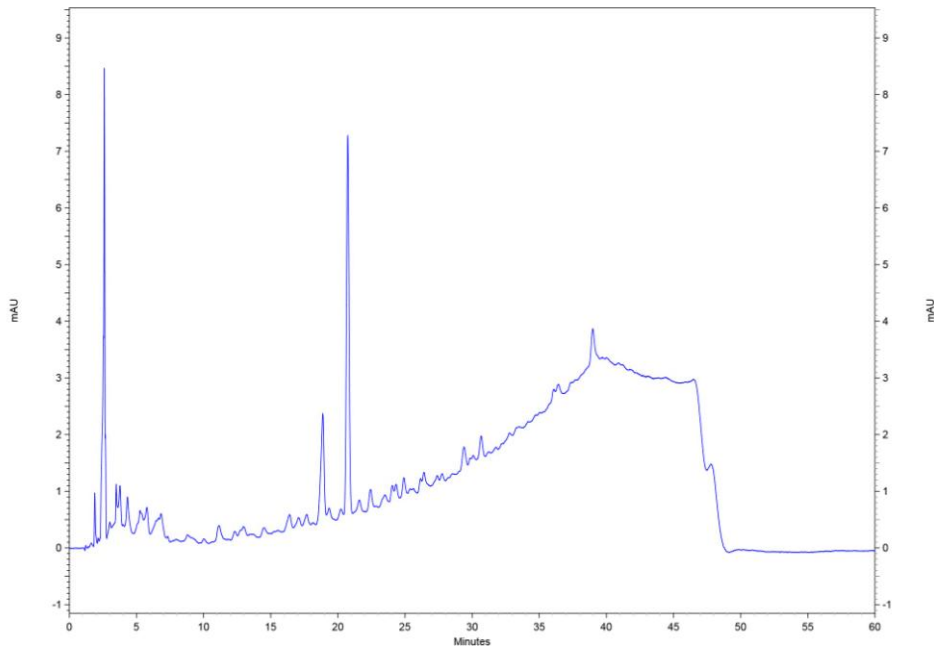


Figura 52 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 280 nm.

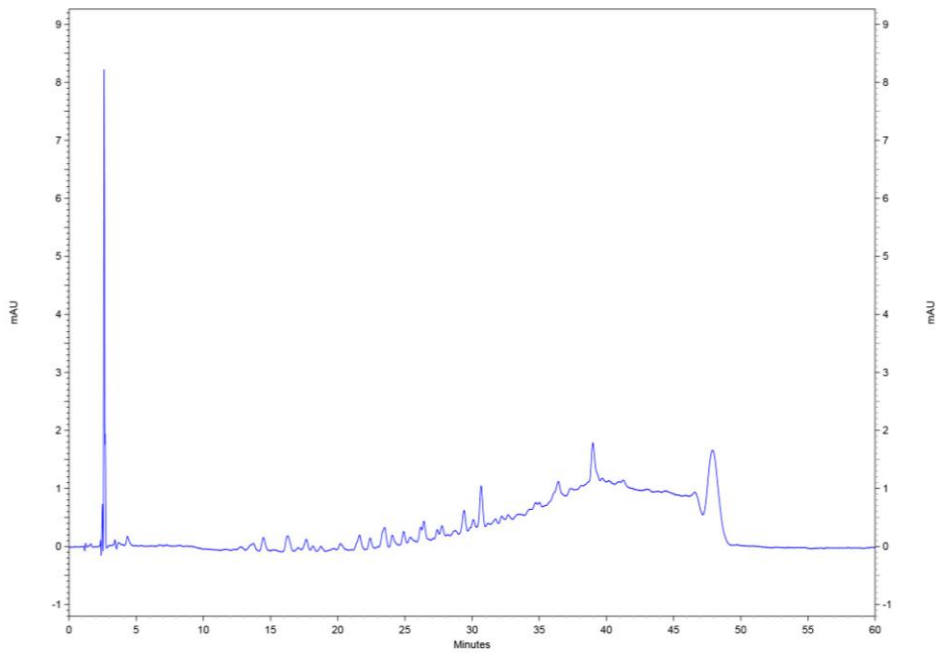


Figura 53 - Cromatograma da amostra 09586 de semente de funcho a 329 nm.

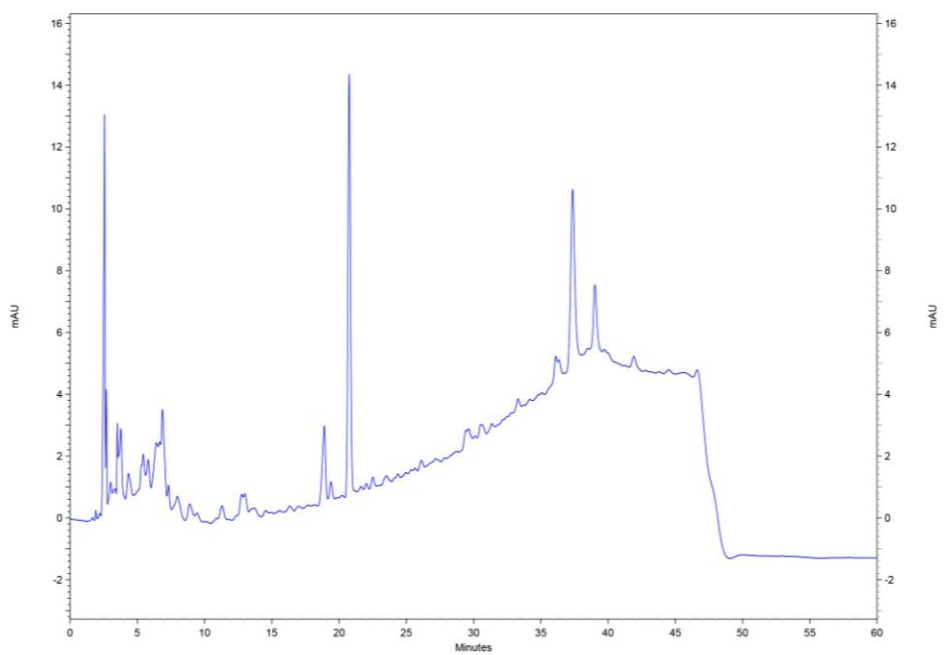


Figura 54 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 254 nm.

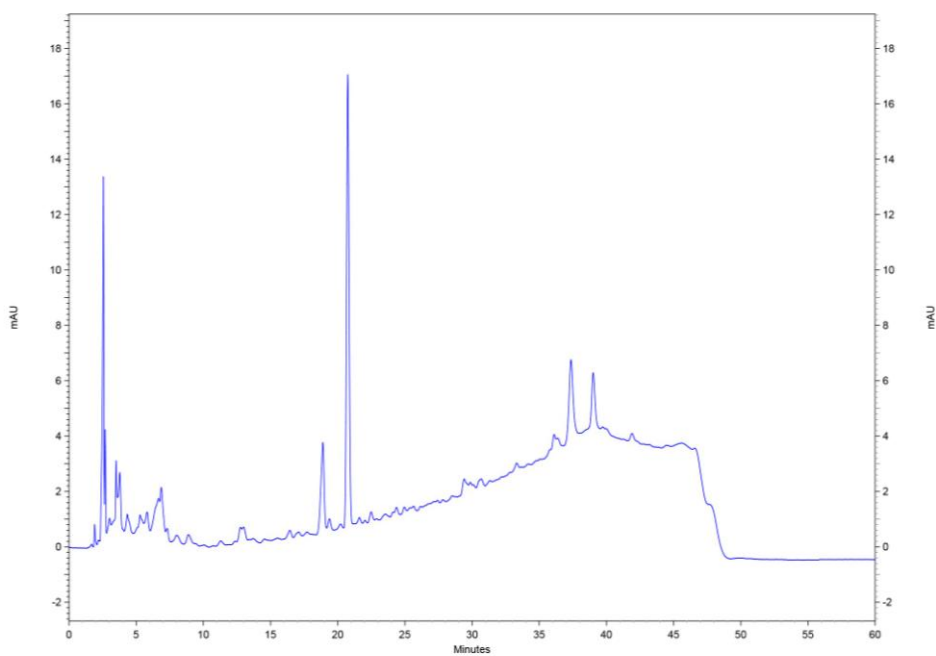


Figura 55 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 270 nm

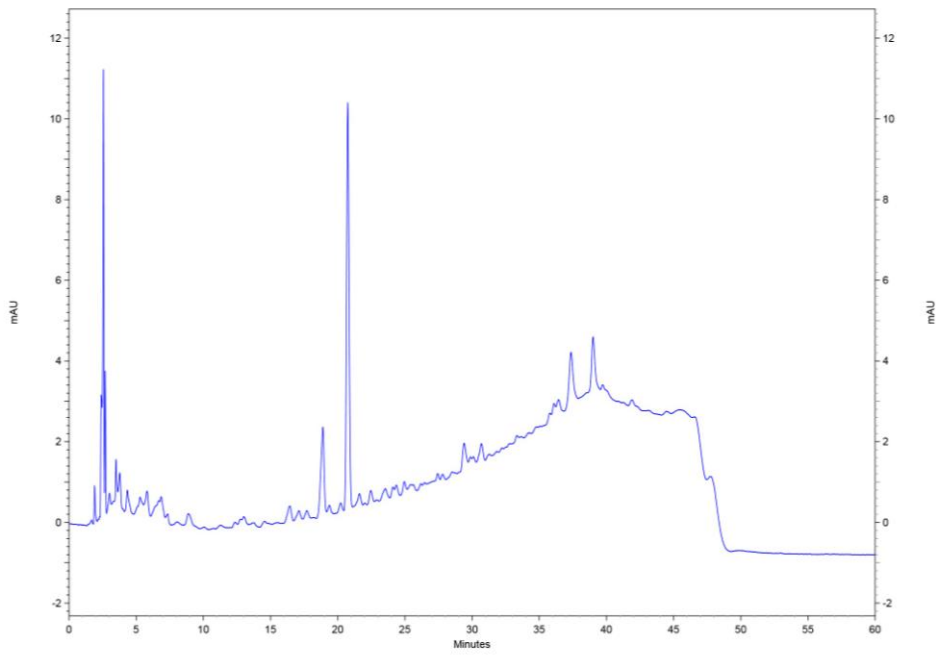


Figura 56 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 280 nm

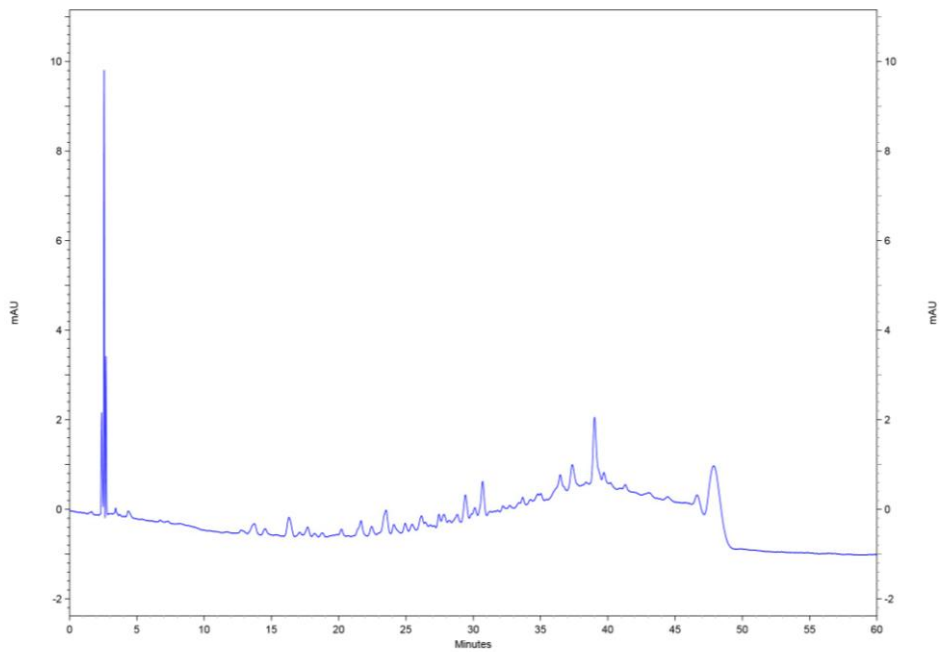


Figura 57 - Cromatograma da amostra 08973 de semente de funcho a 329 nm