

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**MONIQUE BERNARDO AZEVEDO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO  
ETANÓLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Drimys brasiliensis* Miers  
(WINTERACEAE)**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO  
2015**

MONIQUE BERNARDO AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO  
ETANÓLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Drimys brasiliensis* Miers  
(WINTERACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso de Química – habilitação bacharelado da UTFPR – Câmpus Pato Branco.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlene Capelin Ignoato.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco  
2015

## TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Drimys brasiliensis* Miers (WINTERACEAE)** foi considerado aprovado de acordo com a ata da banca examinadora N° **5.2.2015-B** de 2015.

Fizeram parte da banca

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlene Capelin Ignoato

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maristela Fiorese Amadori

Amália Soares dos Reis

## DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho a toda minha família, mas em especial aos meus pais, Paulo e Renata, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, não somente por todo incentivo e apoio, mas acima de tudo por me proporcionarem o amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, não somente pelo dom da vida, mas por todas as bênçãos concedidas ao longo da minha jornada.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Renata, pelo amor que eles me proporcionaram demonstrando-o através de apoio e incentivo durante todo o processo de graduação, mesmo nos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha irmã, Vívian, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sejam estes momentos tristes ou alegres.

Agradeço ao meu namorado, Gutiérri, por me apoiar na concretização dos meus objetivos e sonhos.

Agradeço à acadêmica, Mariana Riboli Nava, pela paciência, compreensão e auxílio durante todas as análises realizadas para a elaboração deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlene Capelin Ignoato, e à minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Teresinha Carpes, por toda confiança depositada a mim para a realização deste trabalho e por todos os momentos de compreensão.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maristela Fiorese Amadori e à mestranda Amália Soares dos Reis por se disponibilizarem a fazer parte dessa banca e assim contribuírem para o presente trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram não somente para a realização deste trabalho, mas durante a graduação.

## EPÍGRAFE

“Sem sonhos as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury

## RESUMO

AZEVEDO, Monique B. Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico da espécie *Drymys brasiliensis* Miers (Winteraceae). 2015. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

A espécie *Drimys brasiliensis* Miers, pertencente à família Winteraceae, cujo gênero pode ser encontrado no Brasil, da Bahia ao Rio Grande do Sul, sendo por sua vez mais frequente nas matas ciliares e nas florestas semidecíduas de altitude, é conhecida pelo seu alto índice de potencial terapêutico, sendo utilizada na medicina popular como estimulante, antiespasmódico, antidiarreico, antitérmica, antibacteriano, para o tratamento de asma e bronquite, além de também ter propriedades inseticidas e alimentícias, uma vez que sua casca age em substituição à pimenta-do-reino. Tendo em vista que o estudo sobre plantas bioativas incentivam o interesse de indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, não somente pelo seu índice de potencial terapêutico elevado, mas também por se tratarem de possíveis fontes naturais de compostos bioativos com poder antioxidante, capazes de substituir os antioxidantes sintéticos utilizados nessas indústrias por antioxidantes de fonte natural. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, por intermédio da determinação do teor de compostos fenólicos totais, da determinação do teor de flavonoides totais e pelos métodos de sequestro dos radicais livres ABTS e DPPH, expresso em EC<sub>50</sub>. Os resultados obtidos foram de 110,9958 ± 3,1915 mg EAG g<sup>-1</sup> de amostra para o teor de compostos fenólicos totais, 59,7891 ± 7,5183 mg EQ g<sup>-1</sup> de amostra para o teor de flavonoides totais, 6264,7143 ± 347,3369 μmol de TEAC g<sup>-1</sup> de amostra pelo método do sequestro do radical livre ABTS e uma concentração 0,1598 ± 0,0096 mg mL<sup>-1</sup> pelo método do sequestro do radical livre DPPH, expresso em EC<sub>50</sub>, que indica a concentração mínima de amostra necessária para reduzir em 50% os radicais livres. Os resultados obtidos para a avaliação da atividade antioxidantes da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, levando-se em consideração o ausente ou pouco estudo encontrado neste sentido para esta espécie, tornando assim possível que esta espécie é uma provável fonte de antioxidantes naturais que tem um grande potencial para se tornar uma possível substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados nas indústrias.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos; Flavonoides; DPPH; ABTS.

## ABSTRACT

Azevedo, Monique B. Evaluation of Antioxidant Activity of the ethanol extract of the species *Drymys brasiliensis* Miers (Winteraceae). 2015. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

The species *Drimys brasiliensis* Miers, belonging to Winteraceae family whose genre can be found in Brazil, from Bahia to Rio Grande do Sul, and in turn more common in riparian forests and in the deciduous forests of altitude, is known for its high potential index therapeutic and is used in folk medicine as a stimulant, antispasmodic, antidiarrheal, antipyretic, antibacterial, for the treatment of asthma and bronchitis, and also have insecticides and nutritional properties, since its bark acts as a substitute for black pepper kingdom. Considering that the study of bioactive plants encourage the interest of the food industry, cosmetics and pharmaceuticals, not only for their high therapeutic potential index, but also because it is possible natural sources of bioactive compounds with antioxidant power, able to replace synthetic antioxidants used in these industries by natural source of antioxidants. Given that the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of ethanol extract of the species *Drimys brasiliensis* Miers, through the determination of the content of phenolic compounds, the determination of total flavonoid content and the sequestering methods of free radicals ABTS and DPPH, expressed as EC<sub>50</sub>. The results obtained were 110.9958 ± 3.1915 mg EAG g<sup>-1</sup> sample for the content of phenolic compounds, 59.7891 ± 7.5183 mg EQ g<sup>-1</sup> sample to the levels of total flavonoids 6264.7143 ± 347.3369 μmol TEAC g<sup>-1</sup> sample through sequestration of free radical ABTS method and a concentration of 0.1598 ± 0.0096 mg mL<sup>-1</sup> by sequestering the free radical DPPH method, expressed as EC<sub>50</sub>, the concentration which indicates minimum sample required to reduce by 50% the free radicals. The results obtained for the evaluation of the antioxidant activity of the species *Drimys brasiliensis* Miers, taking into account the missing or bit study found that effect for this species, thus making it possible that this species is a likely source of natural antioxidants that has great potential to become a possible replacement for synthetic antioxidant used in industries.

**Keywords:** Phenolic compounds; flavonoids; DPPH; ABTS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Drimys brasiliensis</i> Miers .....	17
Figura 2 - Estrutura química básica de um composto fenólico .....	20
Figura 3 - Itinerários biossintéticas .....	21
Figura 4 - Estrutura química básica de um flavonoide .....	23
Figura 5 - Estrutura química de um ácido benzoico .....	23
Figura 6 - Estrutura química de um ácido cinâmico .....	24
Figura 7 - Estrutura química de uma cumarina .....	24
Figura 8 - Reação de captura do radical livre DPPH .....	25
Figura 9 - Estabilização do radical livre ABTS .....	26
Figura 10 - Extrato etanólico da espécie <i>Drimys brasiliensis</i> Miers .....	27
Figura 11 - Curva padrão de ácido gálico .....	32
Figura 12 - Curva padrão de quercetina .....	33
Figura 13 - Curva cinética de redução do radical livre DPPH .....	34
Figura 14 - Gráfico para o cálculo do EC <sub>50</sub> .....	35
Figura 15 - Curva padrão de Trolox .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos .....	22
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EAG	Equivalente em ácido gálico
EC <sub>50</sub>	Coeficiente de inibição
EEDbM	Extrato Etanólico da espécie <i>Drimys brasiliensis</i> Miers
EQ	Equivalente em quercitina
PG	Propil galato
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
3.1 A importância dos recursos naturais para o Brasil .....	16
3.2 <i>Drimys brasiliensis</i> Miers.....	16
3.3 Radicais livres .....	18
3.4 Antioxidantes.....	18
3.5 Compostos fenólicos .....	20
3.5.1 Síntese e classificação dos compostos fenólicos.....	21
3.6 Flavonoides .....	22
3.7 Ácidos fenólicos .....	23
3.8 Métodos de avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante .....	24
3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH .....	25
3.8.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS.....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Material vegetal .....	27
4.2 Extração .....	27
4.3 Ensaio realizado com o extrato etanólico da espécie <i>Drimys brasiliensis</i> Miers .....	28
4.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais .....	28
4.3.2 Determinação dos flavonoides .....	28
4.3.3 Determinação das atividades antioxidantes do EEDbM.....	29
4.3.3.1 Atividade antioxidante pelo método do consumo do radical livre DPPH expresso em EC <sub>50</sub> .....	29
4.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método do consumo do radical livre ABTS .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
5.1 Determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais .....	31
5.2 Determinação da atividade antioxidante do EEDbM .....	33

5.2.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH expresso em EC <sub>50</sub> .....	33
5.2.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS .....	36
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>38</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos, bem como os antioxidantes presentes nos vegetais, são cada vez mais estudados devido ao seu potencial terapêutico, reconhecido ao longo dos anos, principalmente pelo fato de que, por muito tempo, as plantas eram os únicos recursos terapêuticos disponíveis para se tratar ou inibir uma enfermidade, o que fez com que o estudo destas crescesse, a fim de conhecer e descobrir os constituintes químicos que lhes atribuem tal atividade (MACIEL et al., 2002).

Dentre os diversos vegetais encontrados na região sul do Brasil, se encontra a espécie *Drimys brasiliensis* Miers, conhecida popularmente como casca-da-anta, cataia, canela-amarga, capororoca-picante, carne-d' anta, melambo, paratudo e pau-para-tudo, a qual pertence à família Winteraceae (LIMBERGER et al., 2007; LORENZI, 2008). Esta planta medicinal é conhecida por suas propriedades terapêuticas e por sua utilização na medicina popular como estimulante, antiespasmódico, antidiarreico, antitérmicos, antibacteriano, para o tratamento de asma e bronquite, além de também ter propriedades inseticidas (GOMES et al., 2013). Já foram isolados constituintes químicos da casca e das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, a qual é caracterizada fitoquimicamente pela presença de monoterpenos, sesquiterpenos e flavonoides (LAGO et al., 2010; MECCHI; LAGO, 2013).

Os antioxidantes naturais têm sido alvo de muitos estudos, devido ao benefício que uma substância com estas propriedades trazem aos seres vivos de maneira geral, não somente para os seres humanos, mas também para os próprios vegetais, mesmo que nestes sejam produtos do metabolismo secundário derivando na maioria das vezes de mecanismos de defesa, como por exemplo, os flavonoides que participam da fotossíntese dos mesmos, catalisando e transportando elétrons (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2002).

Dessa maneira, em função do amplo interesse em se encontrar fontes naturais de antioxidantes por parte das indústrias alimentícias, farmacêuticas e até cosméticas, devido a um aumento significativo no consumo de produtos naturais pela população, o presente estudo tem por objetivo preparar o extrato etanólico das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante, por meio dos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato etanólico das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers.
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato etanólico das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers.
- Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, pelos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 A importância dos recursos naturais para o Brasil

Os recursos naturais têm papel fundamental para a sociedade, pois podem trazer muitos benefícios a saúde humana, no entanto, deve-se considerar que alguns deles são limitados e é muito importante que haja conscientização da população quanto ao cuidado necessário para a preservação desses recursos, pois a garantia deles pode significar a continuidade da vida (ZANIRATO; RIBEIRO, 2006).

A preservação do meio ambiente é imprescindível para a manutenção da existência dos recursos naturais para o equilíbrio do ecossistema, para a regularidade climática e até para a medicina. Essa ideia deve ser expressiva ao se considerar o aumento preocupante do desmatamento nas últimas décadas e o mau uso dos recursos naturais, pois isso pode ser prejudicial para a sociedade e impedir que a mesma seja beneficiada com esses recursos (ARRUDA, 1999).

Um dos recursos naturais mais abundantes no Brasil são as plantas medicinais, as quais são utilizadas como recursos terapêuticos, por prescrição médica ou simplesmente pelo conhecimento da população adquirido de geração em geração, por se tratarem muitas vezes da única alternativa viável por uma parte da população ao combate de doenças (LIMA et al., 2012).

Por esses motivos, as indústrias têm muito interesse nas plantas medicinais e, dentre as mesmas, pode-se citar a indústria farmacêutica, a alimentícia e até mesmo a cosmética, desta forma, é necessário o aumento de pesquisas para que se tenha conhecimento dos compostos que exercem as funções terapêuticas no organismo humano e se estes possuem efeitos benéficos e/ou malefícios para a população (LIMA et al., 2010).

#### 3.2 *Drimys brasiliensis* Miers

A espécie *Drimys brasiliensis* Miers, conhecida popularmente como casca da anta ou cataia, é considerada uma árvore de altura entre 4 e 8 m, com tronco entre 30 e 40 cm de diâmetro envolvido por uma casca lisa de coloração cinza, sendo também considerada da ordem Magnoliales, cujas flores são brancas e as folhas tem de 6 a 12 cm de comprimento e cerca de 3 a 5 cm de largura, contendo de 2 a 5

sementes fornicadas pretas e brilhantes (LORENZI, 2008). Pertence à família Winteraceae, que compreende cerca de 8 gêneros e 70 espécies, decorrentes no hemisfério sul do mundo (TRINTA; SANTOS, 1997). No Brasil o gênero *Drimys* pode ser encontrado da Bahia ao Rio Grande do Sul (GOMES et al., 2012), porém a espécie *Drimys brasiliensis* Miers ocorre com mais frequência em matas ciliares e em florestas semidecíduas de altitude (LORENZI, 2008).

Os principais constituintes químicos encontrados na espécie *Drimys brasiliensis* Miers são monoterpenos, sesquiterpenos e flavonoides (LAGO et al., 2010; MECCHI; LAGO, 2013).

No Brasil essa espécie é utilizada como recurso natural devido ao seu alto índice de potencial terapêutico, sendo então aplicada popularmente como estimulante, antiespasmódico, antidiarreico, antitêrmicos, contra hemorragias uterinas e em algumas enfermidades do trato digestivo (SIMÕES et al., 1986), tendo ela também propriedades alimentícias, quando sua casca é utilizada na culinária em substituição a pimenta-do-reino (TRINTA; SANTOS, 1997).

Apesar de a espécie *Drimys brasiliensis* Miers (Figura 1) ter um amplo potencial terapêutico e ser utilizada para fins alimentícios, apresenta poucos estudos voltados para a atividade antioxidante.



**Figura 1 - *Drimys brasiliensis* Miers**  
Fonte: Douglas Meyer.

### 3.3 Radicais livres

Atualmente muitos estudos têm se voltado para substâncias que possuem poder antioxidante, mas para que se possa entender a importância de substâncias como essas é importante entender também o que se busca combater com elas, que seriam os radicais livres, os quais podem ser formados tanto no organismo dos seres humanos quanto nos alimentos, naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Radicais livres são estruturas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho e estão sempre em busca de outro elétron a fim de formar pares, que por sua vez, devem estar em orientações opostas, para que esses elétrons se tornem emparelhados, sendo formados por diversas reações de óxido-redução, podendo funcionar como doadores ou receptores de elétrons, oxidando-se ou reduzindo-se respectivamente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHRIVER; ATKINS, 2003).

Segundo Leite e Sarni (2003), o equilíbrio entre os radicais livres e defesas geradas pelos antioxidantes é muito importante para que o organismo consiga cumprir com as suas funções biológicas, pois, sem esse equilíbrio, ocorre o que se chamado estresse oxidativo, que pode ser resultado tanto do excesso de radicais livres, quanto da redução das defesas antioxidantes.

Devido à disfunção biológica que os radicais livres causam, muitas moléculas que possuem funções importantes para o organismo são atingidas, das quais pode-se incluir os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e as vitaminas presentes nos alimentos, ingeridos por meio da dieta (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Entretanto, para que a causa destes males seja inibida ou retardada, é necessário que se tenha um equilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, uma vez que, essas defesas têm por finalidade proteger o organismo dos danos causados pelo excesso desses radicais livres, fazendo com que o processo oxidativo ocorra de maneira ideal (BARBOSA et al., 2010).

### 3.4 Antioxidantes

Por determinação da Anvisa, antioxidantes são substâncias capazes de desacelerar a presença de modificação oxidativa nos alimentos, sendo assim,

encontrados principalmente em vegetais, dos quais se destacam as frutas, os legumes, as hortaliças e os cereais integrais (MESSIAS, 2009).

Nos alimentos, os antioxidantes têm por função auxiliar no retardamento ou na inibição da sua deterioração, a qual pode causar a formação do ranço oxidativo, proveniente da formação de peróxidos, devido à reação que as cadeias insaturadas dos ácidos graxos com o oxigênio, gerando carbonilados com menor peso molecular, aos quais confere um odor desagradável aos produtos rançosos (GAVA, 2002).

Segundo Messias (2009), os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais e, a eles, confere-se a mesma finalidade que é combater ações oxidativas, entretanto, existe uma busca incessante pela substituição dos antioxidantes sintéticos pelos antioxidantes naturais, devido ao fato de que o antioxidante sintético tem se mostrado danoso à saúde humana.

Os antioxidantes sintéticos e os antioxidantes naturais são descritos abaixo de acordo com Messias (2009).

Os antioxidantes sintéticos são substâncias pelas quais se confere o poder de doar um próton a um radical livre, que se regenera interrompendo a ação oxidativa dos radicais livres, porém, posteriormente essas substâncias se transformam em radicais livres. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria, cita-se o BHA, o BHT, o TBHQ e o PG.

Os antioxidantes naturais são substâncias encontradas de fonte naturais, pelas quais se confere o poder de interromper a criação de radicais livres, o que reduz a velocidade de oxidação. Dentre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria, destacam-se os compostos fenólicos, sendo subdivididos em flavonoides e ácidos fenólicos.

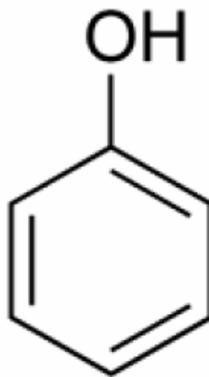
Os antioxidantes tem se tornado de extrema importância na saúde humana, uma vez que essas substâncias agem no sentido de neutralizar os radicais livres de maneira que ocorra a inibição da oxidação no organismo, o que está diretamente ligado ao desenvolvimento de doenças, como por exemplo, a aterosclerose e doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer (PASTENE et al., 2009).

Em contrapartida, antes que as substâncias com poder antioxidante que vêm sendo estudadas sejam inseridas na dieta humana, é necessário se tenha um estudo aprofundado sobre elas com relação a sua toxicidade, tendo em vista que,

substâncias que apresentam reações tóxicas podem produzir diversos efeitos nocivos para o organismo (MESSIAS, 2009).

### 3.5 Compostos fenólicos

Segundo Bravo (1998), os compostos fenólicos são constituídos por uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático, sendo então o mais simples deles o fenol, por ter apenas uma hidroxila ligada ao anel aromático, cuja estrutura pode ser visualizada abaixo (Figura 2).



**Figura 2 - Estrutura química básica de um composto fenólico**  
Fonte: Bravo, 1998.

Os compostos fenólicos possuem uma absorção acentuada na região do ultravioleta, sendo caracterizados pela formação de complexos com metais e na maioria das vezes com quelatos metálicos, sendo muito oxidáveis frente a luz, ao calor ou em meios alcalinos (SIMÕES, 2001).

Devido à busca incessante por fontes de antioxidantes de origem natural, é importante a avaliação dos compostos fenólicos presentes nas plantas, pois estes fazem parte de compostos bioativos que possuem poder antioxidante. Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, por se tratarem do composto fenólico mais encontrado nos vegetais (ANGELO; JORGE, 2007).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos consiste em suas propriedades redutoras, neutralizando ou absorvendo radicais livres e, efetuando assim a quelação do oxigênio ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), o que faz com que seja útil para a vida humana, uma vez

que, tem poder de obstruir doenças relacionadas ao stress oxidativo das células (ZHANG et al., 2015).

### 3.5.1 Síntese e classificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser originados através de dois itinerários biogénéticos, sendo o primeiro deles via ácido chiquímico, iniciando sua origem através dos carboidratos, tendo seus grupos hidroxilas na posição orto (Figura 3), e o segundo via do acetato-polimalato, iniciando sua origem através da acetil-coenzima A e malonil-coenzima A, tendo grupos hidroxilas na posição meta (DEY; HARBORNE, 1989; DEWICK, 1998).

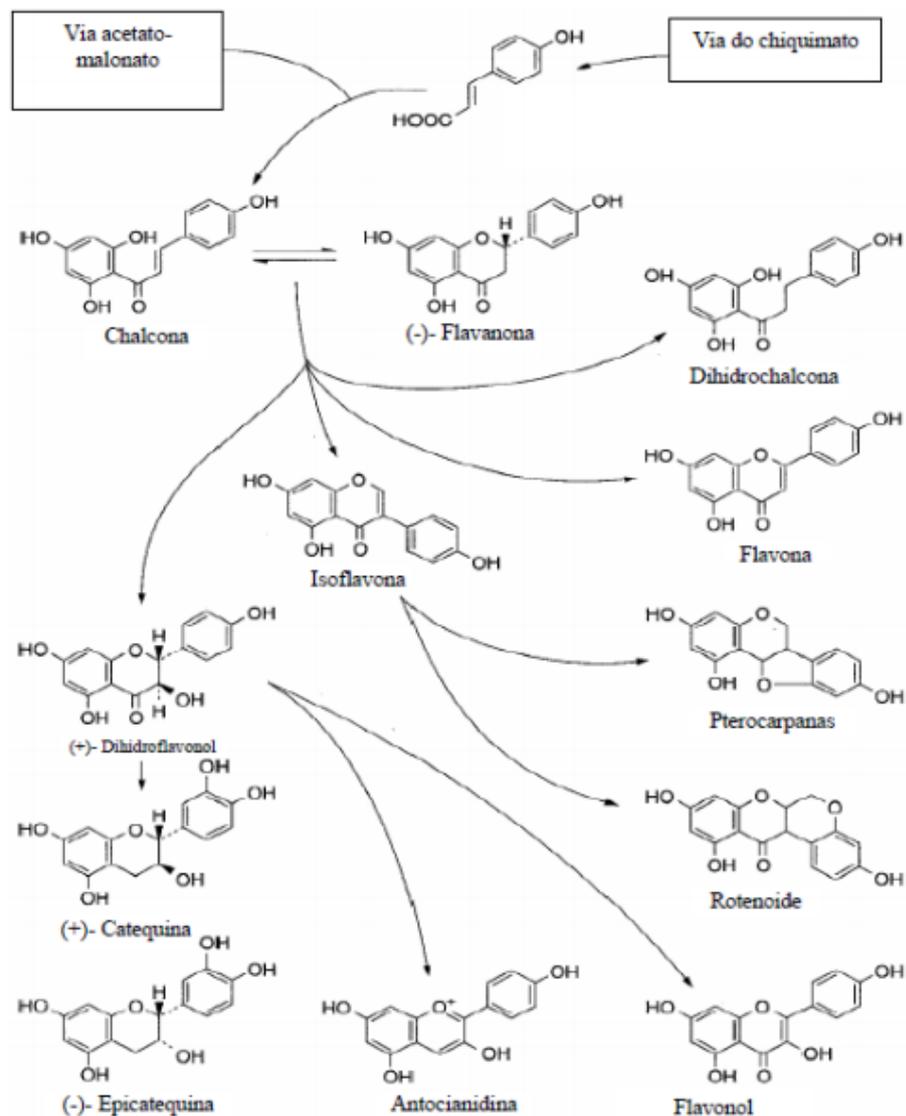


Figura 3 - Itinerários biossintéticos  
Fonte: RICE-EVANS; MILLER; PAGANDA, 1997.

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o número de carbonos em algumas categorias distintas que podem ser visualizadas a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos felilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas, benzofenonas
C6-C2-C6	Estibenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides, isoflavonoides e chalconas
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanais
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonoides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

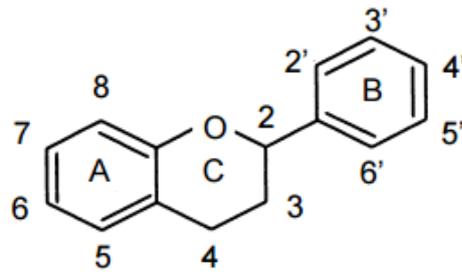
Fonte: Simões et al. (2004).

### 3.6 Flavonoides

Os flavonoides fazem parte do grupo dos compostos fenólicos e são produzidos por uma imensa variedade de vegetais, podendo ser encontrados principalmente nas raízes, galhos, folhas e sementes das plantas, sendo formados por diversos metabólitos secundários e atuando como instrumento de defesa das plantas (BAPTISTA; SIQUEIRA, 1994).

Os flavonoides não são sintetizados pelo organismo humano, portanto, esses compostos devem ser obtidos através da dieta, por meio da ingestão de alimentos que possuem esse tipo de composto presente em sua composição (MACHADO et al., 2008).

O grupo dos flavonoides é um dos principais grupos dos compostos fenólicos e sua estrutura mais simples é o difenil-propano (C6-C3-C6), cuja estrutura possui dois anéis aromáticos (A e B) associados por três átomos de carbono (Figura 4), os demais carbonos são numerados nos anéis A e C de 2 a 8 e no anel B de 2' a 6', contendo também um átomo de oxigênio, conforme mostra a figura a seguir (BRAVO, 1998; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

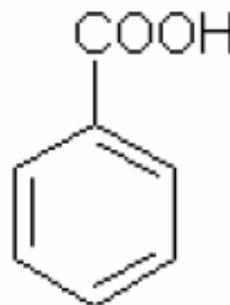


**Figura 4 - Estrutura química básica de um flavonoide**  
 Fonte: Martínez-Flórez et al., 2002.

Os flavonoides são conhecidos por possuírem capacidade antioxidante, a qual se torna possível não somente pela sua estrutura química favorável, mas também por sua surpreendente propriedade de agentes quelantes do ferro e de outros metais de transição e também pela proteção contra os danos oxidativos e conseqüentemente pelo seu índice terapêutico frente a doenças, como por exemplo a cardiopatia isquêmica, aterosclerose ou o câncer (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

### 3.7 Ácidos fenólicos

Segundo Soares (2002), os ácidos fenólicos fazem parte do grupo dos compostos fenólicos que são caracterizados por apresentarem um grupo funcional carboxila, um ou mais grupos funcionais hidroxila e/ou metoxila ligados a um anel aromático em sua fórmula estrutural, sendo subdivididos em três grupos, que são os ácidos benzoicos (ácido fenólico mais simples encontrado na natureza), os ácidos cinâmicos e as cumarinas, cujas estruturas podem ser visualizadas abaixo (Figuras 5, 6 e 7).



**Figura 5 - Estrutura química de um ácido benzoico**  
 Fonte: Soares, 2001.

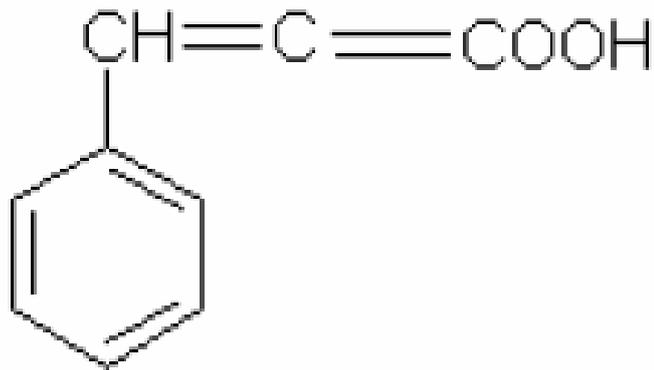


Figura 6 - Estrutura química de um ácido cinâmico  
Fonte: Soares, 2001.

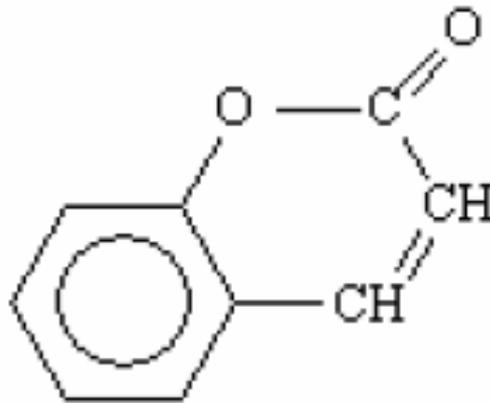


Figura 7 - Estrutura química de uma cumarina  
Fonte: Soares, 2001.

Os ácidos fenólicos atuam como antioxidantes que diminuem assim os processos oxidativos que podem contribuir para possíveis enfermidades, portanto, esses ácidos fenólicos podem agir como instrumento de prevenção de algumas doenças, (ROCKENBACH et al., 2008).

### 3.8 Métodos de avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

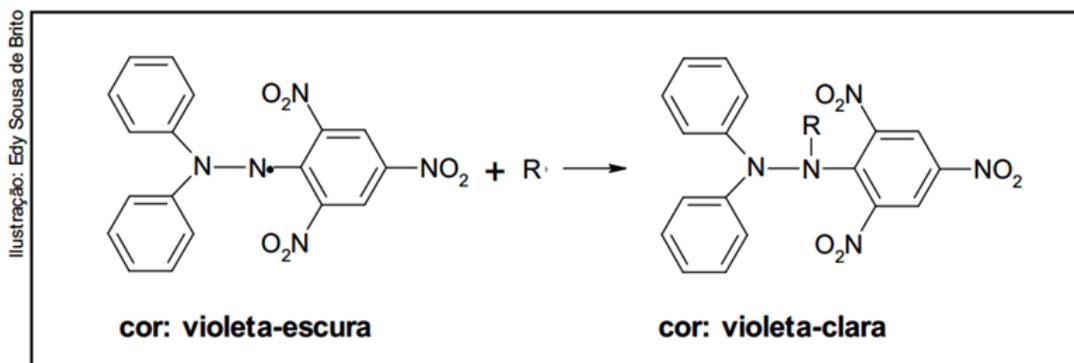
Com o atual interesse das indústrias pelos compostos bioativos com poder antioxidante, os estudos têm crescido cada vez mais e métodos colorimétricos *in vitro* têm sido bastante utilizados. Deste modo, a revisão bibliográfica para a avaliação da atividade antioxidante pelos métodos do sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS é descrita a seguir.

### 3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH é um dos métodos mais usados dentre as diversas metodologias que existem para avaliar a atividade antioxidante, afinal é um método simples e ao mesmo tempo eficiente (CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH é realizada por meio da técnica espectrofotométrica no comprimento de onda de 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), caracterizada pela descoloração de uma solução contendo o radical livre DPPH. Essa descoloração ocorre devido à capacidade do DPPH de formar radicais livres em soluções etanólicas, caracterizadas pela coloração púrpura que, em presença de uma substância que apresente capacidade antioxidante, perde a intensidade de absorção (LI et al., 2015; DENG; CHENG; YANG, 2011).

A reação de captura do radical livre DPPH pode ser visualizada a seguir (Figura 8).



**Figura 8 - Reação de captura do radical livre DPPH**  
**Fonte: Santos et al. (2011).**

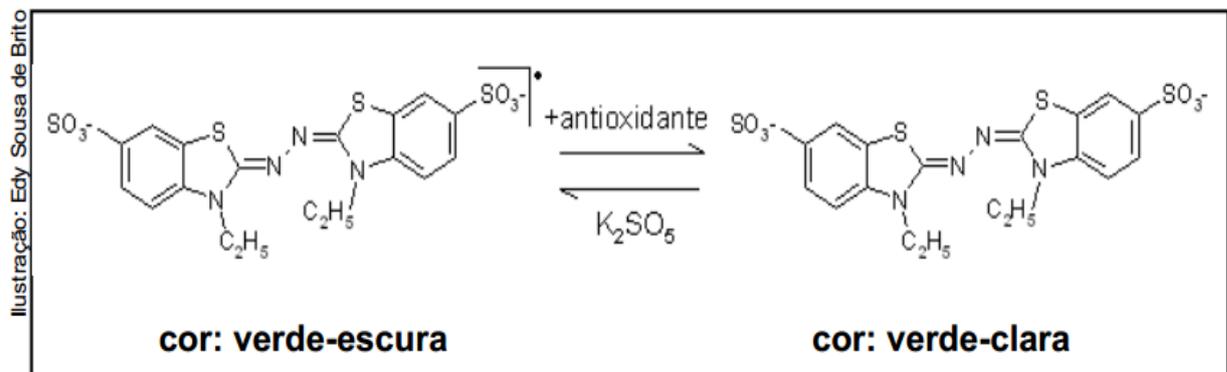
Os resultados são expressos em termos do coeficiente de inibição ( $EC_{50}$ ), indicando uma concentração mínima de amostra necessária para reduzir os radicais livres iniciais pela metade, a partir do momento em que se atinge uma estabilidade determinada através de uma cinética de reação que, pode ocorrer de três maneiras distintas, de forma rápida, intermediária ou lenta (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

### 3.8.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS é também um dos métodos colorimétricos mais usados dentre as diversas metodologias que existem para avaliar a atividade antioxidante (JIA et al., 2012), baseando-se assim na capacidade das substâncias antioxidantes em capturar o radical livre ABTS (SUCUPIRA; SILVA; PEREIRA, 2012).

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS é realizada por meio de um método espectrofotométrico no comprimento de onda de 734 nm (RE et al., 1999), caracterizada pela descoloração, a qual ocorre quando a coloração azul esverdeado, característica de uma solução contendo o radical livre ABTS, diminuindo assim os sinais de absorção ao longo do tempo determinada por uma cinética de reação (JIA et al., 2012).

A reação de estabilização do radical livre ABTS pode ser visualizada a seguir (Figura 9).



**Figura 9 - Estabilização do radical livre ABTS**

Fonte: Rufino et al., (2007).

Os resultados são expressos em termos da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), uma vez que o Trolox foi utilizado como padrão de referência, estando conseqüentemente nas mesmas condições que o radical livre ABTS (RE et al., 1999).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

A espécie *Drimys brasiliensis* Miers foi coletada na região sudoeste do Paraná, Brasil, deste material vegetal foram utilizadas somente as folhas, secas em uma estufa a 40 °C e trituradas em moinho de facas.

### 4.2 Extração

A extração da espécie *Drimys brasiliensis* Miers com etanol 80% foi obtida utilizando-se 4 g da planta em 30 mL de etanol em banho-maria por 1 hora a 40 °C e, em seguida foi filtrado, obtendo-se assim, o extrato etanólico (Figura 10), o qual foi armazenado em freezer a -4 °C, sob o abrigo da luz.



Figura 10 - Extrato etanólico da espécie *Drimys brasiliensis* Miers  
Fonte: Autoria própria.

### **4.3 Ensaio realizados com o extrato etanólico da espécie *Drimys brasiliensis* Miers**

O EEDbM foi submetido a ensaios de determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e a determinação da atividade antioxidante, por meio dos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, conforme as metodologias descritas a seguir.

#### **4.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais**

A determinação dos índices de compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), foi obtida por meio da leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 740 nm, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Uma alíquota de 0,5 mL do EEDbM em triplicata, foi transferida para tubos de ensaio, onde foram acrescentados 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (10%). Após 5 minutos de repouso foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio (4%), os tubos de ensaio foram deixados em repouso por 2 horas, durante esse tempo de repouso permaneceram sob o abrigo da luz a uma temperatura ambiente e, em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias. Os resultados foram obtidos em mg de ácido gálico por g de amostra, calculados através de uma curva padrão construída a partir de concentrações que variam de 1,25 a 62,5 µg.

#### **4.3.2 Determinação dos flavonoides**

A determinação dos índices de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico, segundo Park et al. (1995), foi obtida por meio da leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 415 nm, utilizando a quercetina como padrão de referência. Uma alíquota de 0,5 mL do EEDbM em triplicata, foi transferida para tubos de ensaio, onde foram acrescentados 4,3 mL de etanol (80%), 0,1 mL de acetato de potássio ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 0,1 mL de nitrato de alumínio (10%). Uma série controle foi realizada paralelamente sem a adição de nitrato de alumínio, o qual foi substituído por etanol (80%). Após 40 minutos de repouso a uma temperatura ambiente foi realizada a leitura das absorbâncias. Os resultados foram

obtidos em mg de quercetina por g de amostra, calculados através de uma curva padrão construída a partir de concentrações que variam de 5 a 60 µg.

### 4.3.3 Determinação das atividades antioxidantes do EEDbM

Visando a determinação da atividade antioxidante do EEDbM pelos métodos do sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, as metodologias são descritas a seguir.

#### 4.3.3.1 Atividade antioxidante pelo método do consumo do radical livre DPPH expresso em EC<sub>50</sub>

A determinação da atividade antioxidante pelo método do consumo do radical livre DPPH, por meio da leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 517 nm, segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), ocorre devido à reação do EEDbM com o radical estável DPPH. A solução pela qual acontece a reação é constituída de 0,5 mL da amostra, 3 mL de etanol e 0,3 mL de solução de radical livre DPPH (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) em etanol, em triplicata. Verificou-se a redução do radical DPPH por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância, ao longo do tempo que varia de 0 a 80 minutos. Os resultados serão expressos como coeficiente de inibição (EC<sub>50</sub>), ou seja, concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, a partir do momento em que atingiu uma estabilidade determinada através de uma cinética de reação. A taxa de sequestro de radical livre DPPH ou porcentagem de inibição da oxidação será calculada pela Equação 1 abaixo:

$$\% \text{ AA} = 100 - \left\{ \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controle}}} \right\} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

% AA: Percentual de atividade antioxidante

A<sub>amostra</sub>: Absorbância da solução com amostra e com o radical livre DPPH.

A<sub>branco</sub>: Absorbância da solução com amostra sem o radical livre DPPH.

A<sub>controle</sub>: Absorbância da solução referência (radical livre DPPH e etanol).

#### 4.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método do consumo do radical livre ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo método do consumo do radical ABTS, por meio da leitura da absorbância no comprimento de onda de 734 nm, segundo Re et al. (1999), ocorre devido à reação do EEDbM com o radical estável ABTS. O radical livre ABTS foi gerado a partir da reação da solução aquosa de livre ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ), esta solução foi mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, a solução foi diluída em etanol até obter uma absorbância de 0,700 a 734 nm. A amostra será adicionada a solução do radical livre ABTS, em triplicata, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 minutos de reação. Como referência, será utilizado Trolox, um antioxidante sintético equivalente à vitamina E, em concentrações que variam de 0,0015 a 0,045  $\mu\text{mol}$  para a curva padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em  $\mu\text{mol}$  da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por g de amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais

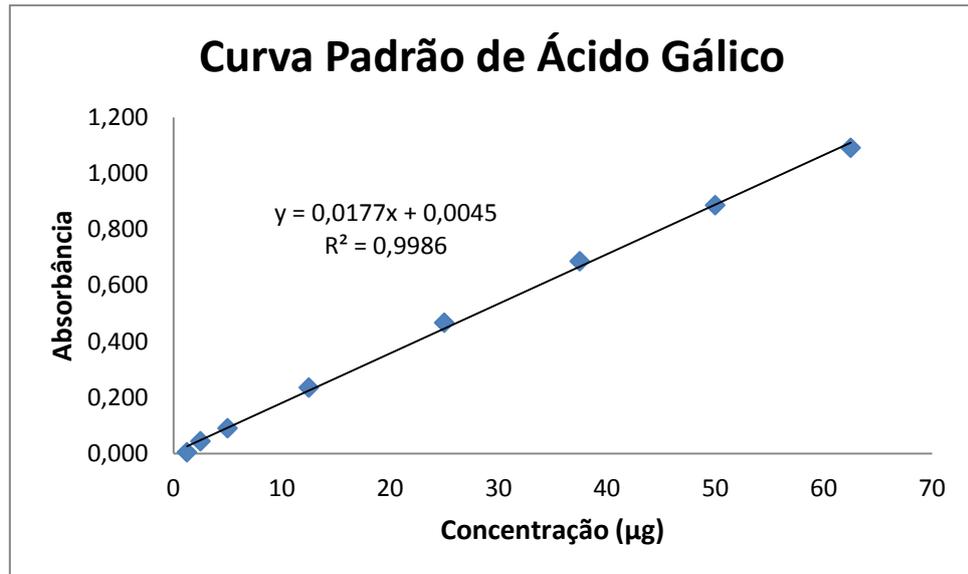
Os compostos fenólicos são bastante característicos em plantas, tendo sua origem no metabolismo secundário, contribuem assim para o desenvolvimento dessas plantas beneficiando-as de diversas maneiras, podendo funcionar na prevenção de doenças que possam afetá-las (ANGELO; JORGE, 2007).

Atualmente o interesse na avaliação do teor de compostos fenólicos tem crescido cada vez mais, principalmente por possuírem propriedades antioxidantes e pela influência que esses exercem sobre o organismo humano por intermédio da dieta, uma vez que atuam como consumidores de radicais livres (SOARES, 2002).

É importante lembrar que os flavonoides também fazem parte do grupo dos compostos fenólicos, portanto, a avaliação do teor de compostos fenólicos totais e do teor de flavonoides totais se torna importante, pois exprimem uma medida bioativa, tendo em vista que os mesmos exercem propriedades antioxidantes, devido a suas propriedades redutoras e estrutura.

No presente estudo, o teor de compostos fenólicos totais foi obtido através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que consiste na absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), e na combinação de ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, onde o molibdênio e o tungstênio estão em estado de oxidação, somente frente a agentes redutores, formando o molibdênio e o tungstênio azuis, que permitem a quantificação da concentração das substâncias redutoras (SOUSA et al., 2007).

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais é necessário que se obtenha uma curva padrão utilizando o ácido gálico como padrão de referência, por meio das leituras das absorbâncias em função das concentrações que variaram entre 1,25 e 62,5 µg, sendo assim possível visualizar um gradiente de coloração durante a análise. Na figura a seguir (Figura 11) é possível visualizar a curva padrão utilizando o ácido gálico como padrão de referência.



**Figura 11 - Curva padrão de ácido gálico**  
**Fonte: Autoria própria.**

Por intermédio da equação da reta  $y = 0,0177x + 0,0045$ , que mostrou um coeficiente de correlação de 0,9986, obtida através da curva padrão utilizando o ácido gálico como padrão de referência, o teor de compostos fenólicos totais foi determinado e o resultado encontrado para o EEDbM foi de  $110,9958 \pm 3,1915$  mg EAG  $g^{-1}$  de amostra.

No presente estudo também foi determinado o teor de flavonoides totais, obtido através do método espectrofotométrico utilizando nitrato de alumínio, que consiste na absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), baseada no gradiente de coloração produzida pela formação de complexos entre o alumínio e as substâncias redutoras, entretanto, apesar deste método ser o mais utilizado devido a sua simplicidade, é um método pouco seletivo para extratos vegetais, tendo em vista que eles possuem uma ampla matriz complexa, mesmo que uma das alternativas para melhorar esse método seja a introdução do alumínio na reação para tratar as amostras a serem analisadas (MARQUES, et al., 2012).

Para a determinação do teor de flavonoides totais é necessário que se obtenha uma curva padrão utilizando a quercetina como padrão de referência, a qual foi obtida por meio das leituras das absorbâncias em função das concentrações que variaram entre 5 e 60  $\mu g$ , sendo assim possível visualizar um gradiente de coloração durante a análise. Na figura a seguir (Figura 12) é possível visualizar curva padrão utilizando a quercetina como padrão de referência.

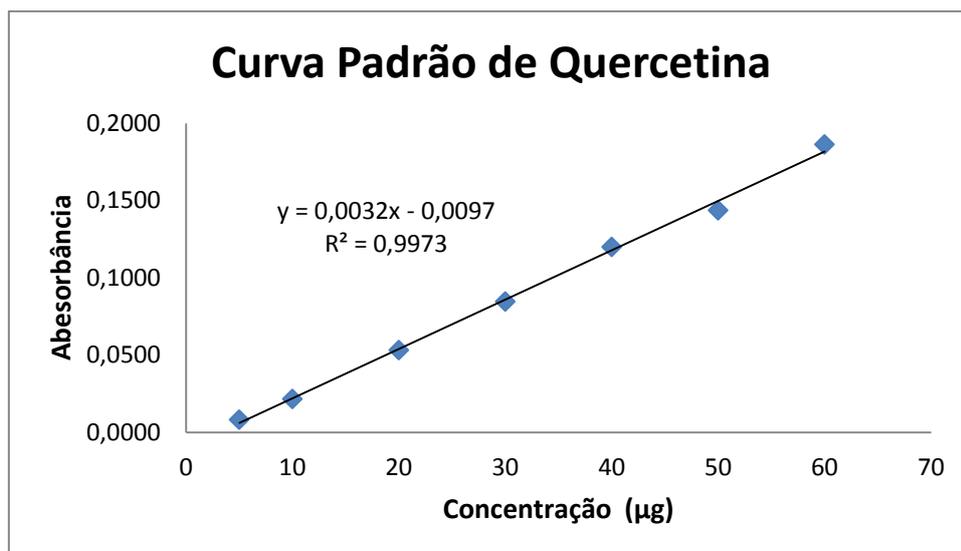


Figura 12 - Curva padrão de quercetina  
Fonte: Autoria própria.

Por intermédio da equação da reta  $y = 0,0032x - 0,0097$ , que mostrou um coeficiente de correlação de 0,9973, obtida através da curva padrão utilizando a quercetina como padrão de referência, o teor de flavonoides totais foi determinado e o resultado encontrado para o EEDbM foi de  $59,789 \pm 7,5183 \text{ mg EQ g}^{-1}$  de amostra.

## 5.2 Determinação da atividade antioxidante do EEDbM

Visando a avaliação da atividade antioxidante do EEDbM para uma possível substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados nas indústrias, os resultados obtidos por meio dos métodos de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS são descritos a seguir.

### 5.2.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH expresso em $EC_{50}$

O interesse em antioxidantes de fontes naturais tem crescido cada vez mais, tendo em vista essas substâncias que apresentam propriedades antioxidantes naturalmente atuam beneficiando a saúde humana, protegendo-a possivelmente de diversas doenças (DEL RÉ; JORGE, 2011).

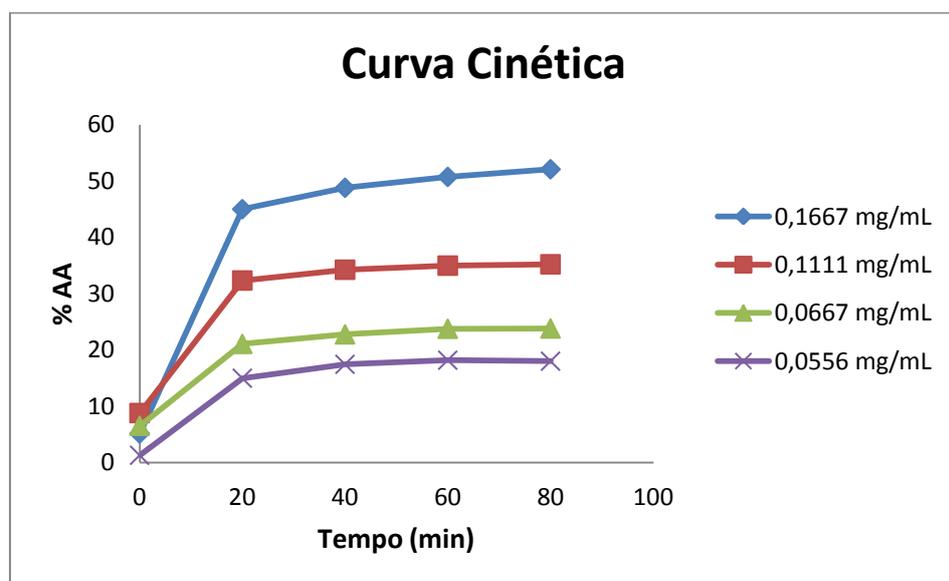
Com o intuito de buscar novas fontes de antioxidantes de fontes naturais, variadas técnicas *in vitro* são empregadas, para que assim seja possível obter

rapidamente substâncias ou uma mistura delas que tenham essas propriedades (ALVES et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Dentre as diversas técnicas que podem ser empregadas, a avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH, expresso em  $EC_{50}$ , consiste em uma mudança de coloração de violeta para amarela, onde a coloração violeta é caracterizada pela deslocalização do elétron desemparelhado do radical livre DPPH e a coloração amarela é caracterizada quando um composto com propriedades antioxidantes entra em ação e funciona como doador de hidrogênio, obtendo-se, portanto, a hidrazina (ALVES et al., 2010).

A avaliação da cinética de reação é importante neste caso, pois pode ocorrer mudança entre um composto antioxidante e outro, tendo em vista que três tipos de cinética de reação, as quais são a rápida, a intermediária e a lenta, onde a primeira ocorre quando o composto antioxidante reage com rapidez com o radical livre DPPH e atinge o término da reação em segundos, a segunda ocorre quando o composto antioxidante reage com o radical livre DPPH e atinge o término da reação dentro de 30 minutos e terceira ocorre quando o composto antioxidante reage com o radical livre DPPH e atinge o término da reação em mais de uma hora (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Sendo assim, a cinética de reação para o EEDbM pode ser visualizada na figura a seguir (Figura 13).

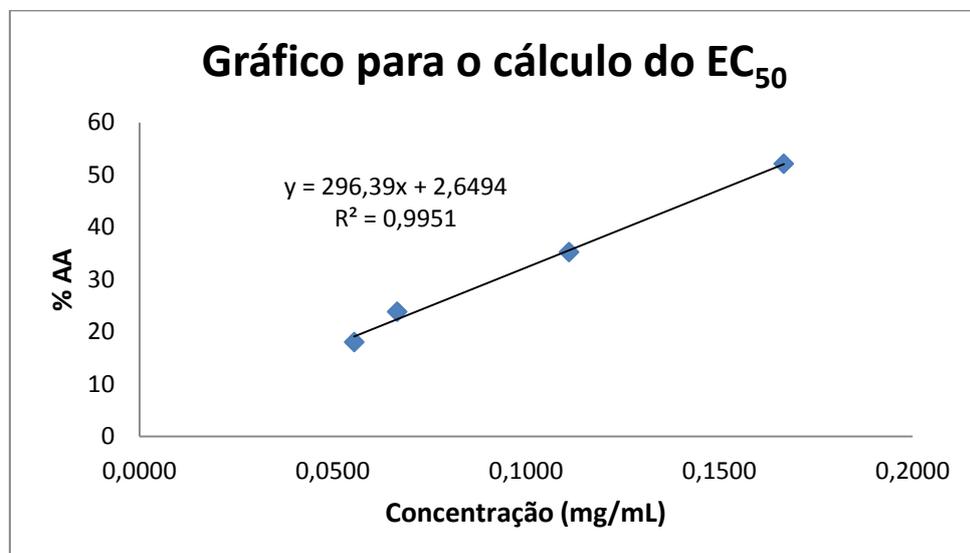


**Figura 13 - Curva cinética de redução do radical livre DPPH**  
**Fonte: Autoria própria.**

Analisando a figura acima (Figura 13) é possível observar que o EEDbM apresenta uma cinética de reação lenta, pois necessita de 80 minutos para reagir com o radical livre DPPH e inibi-lo pela metade, atingindo assim o término da reação.

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH, expresso em  $EC_{50}$ , é necessário que se obtenha uma curva cinética, a qual foi obtida por meio dos percentuais de atividade antioxidante em função do tempo e um gráfico para o cálculo do  $EC_{50}$ , a qual foi obtida por meio dos percentuais de atividade antioxidante em função das concentrações que variaram entre 0,0556 e 0,1667  $mg mL^{-1}$ , sendo importante destacar que, segundo Sousa, Vieira e Lima (2011), quanto menor for o valor do coeficiente de inibição ( $EC_{50}$ ), maior é a capacidade antioxidante da amostra.

Na figura a seguir (Figura 14), é possível visualizar o gráfico para o cálculo do  $EC_{50}$ , que indica a concentração mínima necessária do EEDbM para reduzir os radicais livres iniciais em 50%.



**Figura 14 - Gráfico para o cálculo do  $EC_{50}$**   
 Fonte: Autoria própria.

Por intermédio da equação da reta  $y = 296,39x + 2,6494$ , que mostrou um coeficiente de correlação de 0,9951, obtida através da curva padrão para o cálculo do  $EC_{50}$ , a atividade antioxidante foi determinado, utilizando os percentuais de atividade antioxidante (%AA) calculados a partir da Equação 1 e o resultado encontrado para o EEDbM foi uma concentração de  $0,1598 \pm 0,0096 mg mL^{-1}$ .

### **5.2.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS**

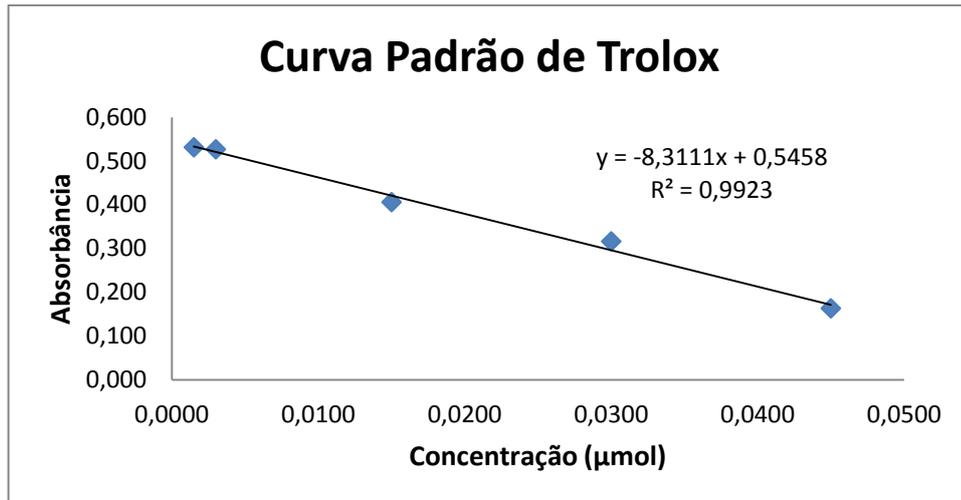
Tendo em vista que os estudos sobre plantas bioativas incentivam o interesse não somente pelo seu alto índice de potencial terapêutico, mas também por ser uma possível substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria por antioxidantes de fontes naturais, avaliou-se desta vez a atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS, cujo método permite a avaliação de diversos compostos bioativos (RE et al., 1999).

Dentre os diversos métodos possíveis para a obtenção da avaliação da atividade antioxidante o método do sequestro do radical livre ABTS tem sido um dos mais utilizados, devido ao seu alto índice de sensibilidade, rapidez e estabilidade, considerando assim tanto compostos hidrofílicos quanto compostos lipofílicos presentes nas amostras estudadas, entretanto, para que se obtenha o radical livre ABTS é preciso que ocorra uma reação de oxidação do ABTS com o persulfato de potássio (KUSKOSKI et al., 2005).

No presente estudo a avaliação da atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre ABTS, o qual se torna possível por meio da técnica de espectrofotometria, que consiste na leitura das absorvâncias que permitem detectar a descoloração do radical livre ABTS, o qual é reduzido na presença de substâncias que possuem propriedades antioxidantes e funcionam como doadoras de hidrogênio.

Para a determinação da avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS é necessário que se obtenha uma curva padrão utilizando o Trolox como padrão de referência, a qual foi obtida por meio das leituras das absorvâncias em função das concentrações que variaram entre 0,045 a 0,0015  $\mu\text{mol}$ , sendo importante destacar que, segundo Sousa, Vieira e Lima (2011), quanto maior for o valor da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), maior é a capacidade antioxidante da amostra.

Na figura a seguir (Figura 15) é possível visualizar curva padrão utilizando o Trolox como padrão de referência.



**Figura 15 - Curva padrão de Trolox**  
**Fonte: Autoria própria.**

Por intermédio da equação da reta  $y = - 8,3111x + 0,5458$ , que mostrou um coeficiente de correlação de 0,9923, obtida através da curva padrão utilizando trolox como padrão de referência, a atividade antioxidante foi calculada e o resultado encontrado para o EEDbM foi de  $6264,7143 \pm 347,3369 \mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ , através deste podemos afirmar que a capacidade antioxidante do EEDbM é satisfatória, uma vez que segundo Sousa, Vieira e Lima (2011), quanto maior for o valor da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), maior é a capacidade antioxidante da amostra.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Objetivando uma possível substituição de antioxidantes sintéticos utilizados em indústrias alimentícias, farmacêuticas e até cosméticas por antioxidantes de fonte natural, no presente estudo foram determinados o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante por meio dos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS do EEDbM, a qual foi escolhida devido a sua utilização na medicina popular em decorrência do seu alto índice de potencial terapêutico.

A partir dos resultados obtidos foi possível afirmar que o EEDbM, apresenta teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, cujos resultados encontrados foram  $110,9958 \pm 3,1915$  mg EAG  $g^{-1}$  de amostra e  $59,789 \pm 7,5183$  mg EQ  $g^{-1}$  de amostra, respectivamente, observando esses resultados e, tendo em vista que os flavonoides fazem parte do grupo dos compostos fenólicos, é importante ressaltar mais da metade dos compostos fenólicos encontrados são flavonoides.

Com relação à avaliação da atividade antioxidante pelos métodos *in vitro* de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS foi possível afirmar que o EEDbM, apresenta capacidade antioxidante, cujos resultados encontrados foram  $6264,7143 \pm 347,3369$   $\mu$ mol TEAC  $g^{-1}$  de amostra pelo método do sequestro do radical livre ABTS e uma concentração  $0,1598 \pm 0,0096$  mg  $mL^{-1}$  pelo método do sequestro do radical livre DPPH, expresso em  $EC_{50}$ .

Desta maneira, sabendo do ausente ou pouco estudo fitoquímico da espécie *Drimys brasiliensis* Miers, pode-se dizer que as análises realizadas corroboram para o conhecimento da atividade antioxidante da mesma e, em decorrência disso, conclui-se que ela seria uma possível substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados nas indústrias, podendo proporcionar assim benefícios à saúde humana, uma vez que, estudos comprovam que os antioxidantes sintéticos apresentam aspectos toxicológicos e agentes cancerígenos.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANGELO, Priscila M.; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ARRUDA, Rinaldo S. V. Populações Tradicionais e a proteção de recursos naturais em unidades de conservação. **Revista Ambiente e Sociedade**, v. 2, n. 5, p. 79-93, 1999.

BAPTISTA, Mírian J.; SIQUEIRA, José O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 1994.

BARBOSA, Kiriaque B. F.; COSTA, Neuza M. B.; ALFENAS, Rita C. G.; PAULA, Sérgio O.; MINIM, Valéria P. R.; BRESSAN, Josefina. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BIANCHI, Maria L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprêgo de aditivos químicos a alimentos. **ANVISA Publicações Eletrônicas**, Brasília, DF, 18 nov. 2014. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/decretos/50040\\_61.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/decretos/50040_61.htm)>. Acesso em: 18 nov. 2014.

BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARMONA-JIMÉNEZ, Yolanda; GARCÍA-MORENO, Maria V.; IGARTUBURU, Jose M.; BARROSO, Carmelo G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, v. 165, p. 198-204, 2014.

DEGÁSPARI, Cláudia. H.; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n.1, p. 33-40, 2004.

DEL RÉ, Patrícia V.; JORGE, Neuza. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 955-959, 2011.

DENG, Jing; CHENG, Wangyuan; YANG, Guangzhong. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v.125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Methods in Plant of Biochemistry**. London: Academic Press, 1989.

DEWICK, Paul M. The biosynthesis os shikimate metabolites. **Natural Products Report**. Cambridge, v.15, n. 1, p. 15-58, 1998.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim M.; SANTOS, Ricardo J.; GENOVESE, Maria I.; LAJOTO, Franco M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FERREIRA, Ana L. A.; MATSUBARA, Luiz S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GAVA, Altanir J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 2002.

GOMES, Madson R. F.; SCHUH, Roselena S.; JACQUES, Ana L. B.; DORNELES, Gilcéia G.; MONTANHA, Jarbas; ROEHE, Paulo M.; BORDIGNON, Sérgio; DALLEGRAVE, Eliane; LEAL, Mirna B.; LIMBERGER, Renata P. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys*

*angustifolia* and *D. brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 284-290, 2013.

JIA, Shu-Min; LIU, Xiao-Fei; KONG, De-Ming; SHEN, Han-Xi. A simple, post-additional antioxidant capacity assay using adenosine triphosphate-stabilized 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation in a G-quadruplex DNAzyme catalyzed ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 407-412, 2012.

KUSKOSKI, Eugênia M.; ASUERO, Agustin G.; TRONCOSO, Ana M.; MANCINI-FILHO, Jorge; FETT, Roseane. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.4, p. 726-732, 2005.

LAGO, João H. G.; CARVALHO, Larissa A. C.; SILVA, Flávia S.; TOYAMA, Daniela O.; FÁVEROC, Oriana A.; ROMOFF, Paulete. Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of essential oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1760-1765, 2010.

LEITE, Heitor P.; SARNI, Roseli S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n.2, p. 87-94, 2003.

LI, Xiangrong; CHEN, Dejun; WANG, Gongke; LU, Yan. Probing the interaction of human serum albumin with DPPH in the absence and presence of the eight antioxidants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1144-1152, 2015.

LIMA, Juliana F.; SILVA, Marcos P. L.; TELES, Simone; SILVA, Franceli; MARTINS, Gabriela N. Avaliação de diferentes substratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [*Sicana odorifera* (Vell.) Naudim]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 163-167, 2010.

LIMA, Sílvia C. S.; ARRUDA, Guilherme O.; RENOVATO, Rogério D.; ALVARENGA, Márcia R. M. Representations and uses of medicinal plants in elderly men. **Latin American Journal of Nursing**, v. 20, n. 4, p. 778-786, 2012.

LIMBERGER, Renata P.; SCOPEL, Marina; SOBRAL, Marcos; HENRIQUES, Amélia T. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 3, p. 130-137, 2007.

LORENZI, Harry. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, Hussen; NAGEM, Tanus J.; PETERS, Vera M.; FONSECA, Cristiane S.; OLIVEIRA, Tânia T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MACIEL, Maria A. M.; PINTO, Angelo C.; GRYNBERG, Noema F.; ECHEVARRIA, Aurea. Plantas medicinais: Anecessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MARQUES, Graziella S.; MONTEIRO, Rebeka P. M.; LEÃO, Waleska F.; LYRA, Magaly A. M.; PEIXOT, Monize S.; ROLIM-NETO, Pedro J.; XAVIVER, Haroudo S.; SOARES, Luiz A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517–522, 2012.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p.271-278, 2002.

MECCHI, Murilo C.; LAGO, João H. G. Chemical constituents derived from Miers (Winteraceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 20, p. 1927-1929, 2013.

MESSIAS, Karina L. S. Dossiê antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 10, n. 6, p. 16–31, 2009.

MEYER, Douglas. *Drimys brasiliensis* Miers. **Flora Digital**. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=3556](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=3556)>. Acesso em: 18 nov. 2014.

PARK, Yong K.; KOO, Hyun; SATO, Helia H.; CONTADO, José L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PASTENE, Edgar; GOMÉZ, Maritza; SPEISKY, Hernán; NUÑEZ-VERGARA, Luís. Un sistema para la detección de antioxidantes volatiles comunmente emitidos desde especias y hierbas medicinales. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 482-487, 2009.

RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicolleta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, Catherine; MILLER, Nicholas.; PAGANDA, George. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, London, v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

ROCKENBACH, Ismael I.; RODRIGUES, Eliseu; CATANEO, Ciriele; GONZAGA, Luciano V.; LIMA, Alessandro; MANCINI-FILHO, Jorge; FETT, Roseane. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis Peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p. 271-276, 2008.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico 127, **Embrapa**, 2007.

SANTOS, Suikinai N.; CASTANHA, Rodrigo F.; HABER, Lenita L.; MARQUES, Márcia O. M.; SCRAMIM, Shirlei; MELO, Itamar S. Metodologia Científica: Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. **Embrapa: Comunicado Técnico 50**, 2011.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. Porto Alegre: Bookman, 2003.

SIMÕES, C. M. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC/Ed. UFRGS, 2001.

SIMÕES, C. M. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC/Ed. UFRGS, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E. ; STEHMAN, J. R. **Plantas da Medicina Popular No Rio Grande do Sul**. PORTO ALEGRE: Ed. UFRGS, 1986.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–179, 1999.

SOARES, Daniele G. **Avaliação da capacidade antioxidante do butil hidroxitolueno, propil galato, resveratrol, vitamina C e vitamina E em sistemas biológicos e químico**. 2001. 178 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2001.

SOARES, Sergio E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, Cleyton M. M.; SILVA, Hilris R.; JUNIOR, Gerardo M. V.; AYRES, Mariane C. C.; COSTA, Charllyton L. S.; ARAÚJO, Delton S.; CAVALCANTE, Luis C. D.; BARROS, Elcio D. S.; ARAÚJO, Paulo B. M.; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Mariana S. B.; VIEIRA, Luanne M.; LIMA, Alessandro. Total Phenolics and in vitro Antioxidant Capacity of Tropical Fruit Pulp Wastes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SUCUPIRA, Natália R.; SILVA, Aline B.; PEREIRA, Gerlândia; COSTA, Juliana N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.

TRINTA, Elza F.; SANTOS Emília. **Flora ilustrada catarinense: winteráceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1997.

ZANIRATO, Sílvia H.; RIBEIRO, Wagner C. Patrimônio cultural: a percepção da natureza como um bem não renovável. **Revista Brasileira de História**, v. 26, n. 51, p. 251-262, 2006.

ZHANG, Bing; DENG, Zeyuan; RAMDATH, Dan; TANG, Yao; CHEN, Peter X.; LIU, Ronghua; LIU, Qiang; TSAO, Rong. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**, v.172, p. 862–872, 2015.