

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAFAELA BARBOSA BORGES**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
BRUTOS DE *Ocimum gratissimum* L. (ALFAVACA) PRODUZIDOS POR  
MACERAÇÃO DINÂMICA E BANHO ULTRASSÔNICO**

**PATOS DE MINAS – MG**

**2022**

**RAFAELA BARBOSA BORGES**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
BRUTOS DE *Ocimum gratissimum* L. (ALFAVACA) PRODUZIDOS POR  
MACERAÇÃO DINÂMICA E BANHO ULTRASSÔNICO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Profa. Dra. Enyara Rezende Morais.**

**PATOS DE MINAS – MG**

**2022**

**RAFAELA BARBOSA BORGES**

**Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos brutos de *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca) produzidos por maceração dinâmica e banho ultrassônico**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Enyara Rezende Morais - IBTEC - UFU  
Presidente

Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes – IQ - UFU  
Membro

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira - IBTEC - UFU  
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas-MG, 08 de agosto de 2022.

Dedico esse trabalho à minha avó Ivanilde Amélia  
de Paula, a melhor pessoa que já conheci.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Beatriz e Décio, que sempre me apoiaram e mostraram o quanto é importante o estudo na vida de uma pessoa. Agradeço também ao meu irmão Matheus por ser carinhoso, compreensivo e sempre ouvir meus desabafos e todas as histórias que quero contar, mesmo não querendo realmente ouvir.

À Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes por aceitar me orientar nesse trabalho, pelos ensinamentos passados do início ao fim da graduação, e também pela paciência em todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Marcos de Souza Gomes e Dra. Terezinha Aparecida Teixeira, por todos os ensinamentos e apoio durante a graduação e especialmente por terem aceitado fazer parte da banca de defesa.

Aos técnicos Carla e Raoni pela colaboração e paciência.

À minha irmã Daniela que, com o tempo, se tornou uma das minhas melhores amigas.

Às minhas amigas Taís, Larissa e Emilly por ouvirem todas as minhas reclamações e desabafos durante toda a graduação. Sem vocês, terminar o curso seria impossível.

Ao meu amigo maravilhoso Gabriel que me apoiou nos meus surtos em todos os momentos. Pelos cafés e risadas, e tardes de estudo em que a gente só procrastinava sem realmente estudar.

À minha amiga Letícia, que conheço a pouco tempo, mas é uma pessoa maravilhosa. Obrigada por me ouvir contando as histórias dos livros que leio e por me alimentar.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta por todo o período de formação.

## RESUMO

Espécies vegetais de uso medicinal vêm sendo uma importante alternativa para o tratamento de diversas patologias. A *Ocimum gratissimum* L. é uma planta arbustiva lenhosa conhecida como alfavaca, alfava-cravo ou manjerição-doce usada na medicina popular no tratamento de pneumonia, febre, diarreia e malária. Esses usos terapêuticos se devem ao fato dessa espécie ser fonte de metabólitos secundários como flavonóides, terpenoides, esteroides, taninos e outros compostos fenólicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar o conteúdo de compostos fenólicos e analisar a atividade antioxidante nos extratos etanólicos brutos das folhas de *O. gratissimum* L. comparando dois métodos de extração, a maceração dinâmica e o banho ultrassônico. Na dosagem de compostos fenólicos totais, o resultado obtido pelo método de maceração dinâmica foi superior ao obtido por banho ultrassônico (232,5 mg EAG g<sup>-1</sup> e 160,3 mg EAG g<sup>-1</sup>, respectivamente), da mesma forma que aconteceu com a atividade antioxidante (38,5 mg EBHT g<sup>-1</sup> para maceração dinâmica e 16,4 mg EBHT g<sup>-1</sup> para banho ultrassônico, avaliados pelo teste de Poder Redutor; 132,3 mg EBHT g<sup>-1</sup> e para maceração dinâmica e 89,8 mg EBHT g<sup>-1</sup> para banho ultrassônico, avaliados pelo teste do Complexo de Fosfomolibdênio). Sendo assim, os métodos extrativos utilizados interferiram nos resultados obtidos e demonstram que a *O. gratissimum* L. é uma planta medicinal com potencial terapêutico que necessita ser mais estudada.

Palavras-chave: Etnofarmacologia. Produtos naturais. Bioprospecção. Métodos de extração.

## ABSTRACT

Medicinal plant species have been an important alternative for the treatment of various pathologies. *Ocimum gratissimum* L. is a woody shrub known as Alfavaca, alfava-clove or basil used in folk medicine to treat pneumonia, fever, diarrhea and malaria. These therapeutic uses are due to the fact that these species are a source of secondary metabolites such as flavonoids, terpenoids, steroids, tannins and phenolic compounds. Thus, the objective of this study was to verify the content of phenolic components and analyze the antioxidant activity in extracts and crude methods of *O. gratissimum* L. leaves, comparing two study methods, mac and ultrasonic bath. In the combination of respectively superior phenolic compounds, the result obtained by the dynamic maceration method was performed by ultras bath (232.5 mg EAG<sup>-1</sup> and 160.3 mg EAG g<sup>-1</sup>, activity the same as a (38.5 mg of EBHT g<sup>-1</sup> for dynamic maceration and 16.4 mg of EBHT g<sup>-1</sup> for ultrasonic bath, published by the Reducing Power test; 132.3 mg of EBHT g<sup>-1</sup> for dynamic maceration and 89.8 mg of EBHT g<sup>-1</sup> for ultrasonic bath, known for the desfomolybd Complex test). Therefore, the extractive methods used interfere with the results obtained and demonstrate that *O. gratissimum* L. is a medicinal plant that needs to be learned with therapeutic potential.

Keywords: Ethnopharmacology. Natural products. Bioprospecting. Receiving methods.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Etnofarmacologia.....	9
1.2 <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	10
1.3 Métodos de extração .....	10
1.4 Compostos fenólicos.....	11
1.5 Antioxidantes .....	12
OBJETIVOS.....	13
Objetivo geral .....	13
Objetivos específicos .....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais.....	14
2.2 Obtenção dos extratos brutos da espécie vegetal <i>Ocimum gratissimum</i> L. por banho ultrassônico .....	14
2.3 Obtenção do extrato bruto da espécie vegetal <i>Ocimum gratissimum</i> L. por maceração dinâmica.....	14
2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	15
2.5 Determinação atividade antioxidante pelo método do Poder Redutor .....	15
2.6 Determinação atividade antioxidante pelo método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio .....	16
2.7 Análise Estatística.....	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
3.1 Compostos fenólicos.....	17
3.2 Atividade antioxidante pelo método Poder Redutor.....	19
3.3 Atividade antioxidante pelo método Complexo de Fosfomolibdênio .....	21
4 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS .....	24



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Etnofarmacologia

A etnofarmacologia corresponde ao estudo do conhecimento popular sobre o uso de plantas para tratamento de enfermidades, aliado com estudos químicos e farmacológicos a fim de promover pesquisas em que se desenvolvem medicamentos fitoterápicos e/ou a síntese de substâncias derivadas das estruturas moleculares de seus princípios ativos vegetais. (ANVISA, 2004; SASSAKI *et al.*, 2016).

No Brasil, a população tem a cultura do uso de plantas medicinais através das gerações, e muitas vezes esse uso é até mesmo diário. Aproximadamente 90% dos brasileiros fazem o uso de plantas medicinais, e até 60%, no mínimo duas vezes por semana, o que evidencia o forte hábito da utilização desse tipo de produto pela população. Esse hábito pode estar associado a indícios de uso de ervas medicinais pela indicação de algum amigo ou familiar, sendo um conhecimento passado de geração em geração (BRAGA; SILVA, 2021).

Como estratégia de estudo de plantas medicinais, uma abordagem etnofarmacológica envolve a combinação de informações de usuários de flora medicinal (especialistas comunitários e tradicionais) com estudos químicos e farmacológicos. Essa abordagem permite levantar hipóteses sobre a atividade farmacológica e as substâncias ativas responsáveis pelos efeitos terapêuticos relatados (ELISABETSKY, 2003).

A flora mundial é composta das mais variadas espécies de vegetais sendo elas conhecidas ou ainda não pelo homem, incluindo, as plantas medicinais. Os efeitos terapêuticos das espécies medicinais são devido aos metabólitos secundários produzidos por elas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). O interesse em se estudar essas plantas com foco nos metabólitos secundários, como alcaloides, terpenos e fenilpropanoides, para a obtenção de novos compostos com propriedades farmacêuticas vem sendo crescente (SANCHITA; SHARMA, 2018).

Os diferentes constituintes químicos das plantas medicinais que conferem suas capacidades como drogas de aplicação farmacêutica, também possuem valor significativo em indústrias alimentícias, de perfumes e cosméticos, e agroquímicos (HASSAN, 2012). Mesmo com inúmeras utilidades para os produtos naturais, seu principal emprego é no desenvolvimento de medicamentos para alívio de dores e tratamento de doenças (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

## 1.2 *Ocimum gratissimum* L.

A *Ocimum gratissimum* L., conhecida também por vários nomes populares como, alfavaca, alfavaca-cravo ou manjeriçãodoce. É uma espécie de provável origem na Índia e é subspontânea no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Da família Lamiaceae, a alfavaca é uma planta medicinal com potencial para servir como terapia alternativa em diversas doenças e/ou fonte de novos medicamentos (UGBOGU *et al.*, 2021).

É usada como aromatizante natural ou condimento na preparação de vários pratos culinários. Além de ser usada na culinária, a *O. gratissimum* L. tem grandes aplicações na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como tosse, pneumonia, febre, inflamação, anemia, diarreia e infecções fúngicas e bacterianas (UGBOGU *et al.*, 2021). As práticas de utilizar a alfavaca no tratamento de males pelas tradições populares incluem a decocção das folhas e também compressas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em pesquisas envolvendo extratos vegetais, a *O. gratissimum* L. demonstrou considerável atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, desde fungos filamentosos a bactérias gram negativas e gram positivas (VILANOVA *et al.*, 2019). Por exemplo, extratos metanólicos e etanólicos brutos da planta apresentaram atividade bacteriostática contra a bactéria gram negativa *Klebsiella pneumoniae*, responsável por causar infecções graves no trato respiratório superior humano como pneumonia e meningite (MANN, 2012; DJEUSSI *et al.*, 2013). O extrato etanólico também mostrou atividade inibitória contra as bactérias gram positiva e gram negativa, respectivamente, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que também oferecem riscos de infecções (OBINNA *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores, a caracterização fitoquímica do extrato foliar de *O. gratissimum* L. mostrou que a planta contém alcalóides, flavonóides, saponinas, terpenóides, esteróides, taninos, antraquinona e glicosídeos cardíacos. (AJAYI *et al.*, 2017; OKODUWA *et al.*, 2017). Esses metabólitos secundários encontrados na alfavaca, conferem suas propriedades medicinais. A presença de alcalóides e flavonoides foi associada às propriedades antimicrobianas e antioxidantes da planta (BORGES; AMORIM, 2020).

## 1.3 Métodos de extração

Okoduwa e colaboradores (2016) avaliaram de diferentes métodos de extração de fitoquímicos de *O. gratissimum* L. Verificando os resultados, os métodos utilizados no estudo (extração Soxhlet, maceração a frio e extração assistida por micro-ondas) demonstraram

diferentes níveis dos metabólitos secundários extraídos, e mesmo diferindo entre si, esses métodos são eficazes em seu propósito de extração.

Outros métodos de extração são utilizados, como maceração dinâmica e banho ultrassônico.

Na maceração dinâmica, a técnica é realizada em recipiente fechado à temperatura ambiente e durante um longo período, variando de algumas horas ou mais. Durante esse processo, a solução passa por agitação constante e o solvente extrator não é renovado (JACQUES, 2005).

No banho ultrassônico, utiliza a energia de ondas ultrassônicas na extração. O ultrassom no solvente produz cavitações na membrana celular acelerando a dissolução e difusão do soluto, além da transferência de calor, melhorando a eficiência da extração. Essa técnica possui vantagens, como o baixo consumo de solvente e o tempo de extração reduzido, e devido a isso, é aplicável para a extração de compostos termolábeis e instáveis (ZHANG; LIN; YE, 2018).

Assim como é importante a escolha do método de extração, a escolha do solvente extrator também é de grande importância. Essa escolha depende da polaridade do composto que se deseja extrair, no caso dos compostos fenólicos os solventes mais utilizados são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol e dimetilformaldeído (ANGELO; JORGE, 2007).

#### **1.4 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos derivam principalmente da via do ácido chiquímico presente no metabolismo secundário das plantas, mas ausente em animais. Devido a isso, essas moléculas que se originam dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, são identificadas majoritariamente em espécies vegetais que as sintetizam em resposta a estresses bióticos e abióticos (PERES, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2019). Também são o grupo de metabólitos mais abundante na natureza e possuem uma ampla diversidade de estruturas e características físico-químicas (ALBA; TESSARO; SOBOTTKA, 2021).

Esses metabólitos secundários são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático hidroxilado que lhes conferem a capacidade antioxidante (SILVA *et al.*, 2018). Tais moléculas podem ser classificadas em fenóis simples ou polifenóis de acordo com o número de unidades fenólicas na molécula. Sua atividade antioxidante está relacionada com a

quantidade e a posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis benzênicos (ROLEIRA *et al.*, 2018).

Existem aproximadamente 8.000 compostos fenólicos diferentes descritos na literatura e são divididos e classificados pela sua estrutura química (NEVES, 2015). Dentre os principais grupos estão ácidos fenólicos, taninos, ligninas, lignanas e flavonóides (KHODDAMI *et al.*, 2013).

As atividades biológicas já estudadas e relacionadas aos compostos fenólicos são anticancerígenas, antimutagênicas e antiinflamatórias, todas associadas à atividade antioxidante (ROLEIRA *et al.*, 2018). Essa diversidade de efeitos biológicos gerou grande impacto industrial a fim de usar esses compostos na produção de novos medicamentos que possam ser aplicados no tratamento de doenças (BRANDÃO *et al.*, 2019).

## 1.5 Antioxidantes

Radicais livres são átomos ou moléculas extremamente reativos devido a um ou mais elétrons desemparelhados de seus orbitais externos. Essas espécies reativas têm como características físico-químicas sua instabilidade e capacidade de reação com outras moléculas causando oxidação, buscando estabilidade. Naturalmente, há um balanço entre os oxidantes (radicais livres) e antioxidantes (elementos capazes de eliminar as espécies reativas). Quando em excesso no organismo, os radicais livres são relacionados a inúmeras condições fisiopatológicas como câncer, inflamações e doença de Alzheimer (MEO; VENDITTI, 2020; VIZZOTTO, 2017).

Dessa forma, a eliminação eficiente dos radicais livres se faz indispensável para garantir o funcionamento adequado dos órgãos, e retardar e impedir doenças (HE *et al.*, 2022).

O antioxidante caracteriza-se pela capacidade de determinada molécula em neutralizar radicais livres retardando a velocidade de oxidação e, reduzindo o estresse oxidativo. A atividade antioxidante de compostos fenólicos se dá pela capacidade que essas moléculas possuem de reagir com as espécies reativas por meio de reações de óxido-redução (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SILVA *et al.*, 2018).

Os mecanismos das ações dos antioxidantes são favorecidos por reações de oxidação e de redução. Os antioxidantes agem como compostos doadores de elétrons para reagir com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, convertendo-as em moléculas mais estáveis (BARRETO, 2019).

Os antioxidantes são um grupo heterogêneo de elementos formados por enzimas, vitaminas, bilirrubina, licopeno e compostos fenólicos capazes de neutralizar as espécies reativas e impedir seus efeitos lesivos (JUNQUEIRA; CARDOSO, 2012; VIZZOTTO, 2017). Esses compostos são amplamente estudados por serem importantes para a saúde humana e de fácil aquisição, pois são muito presentes em diversas espécies vegetais (RODRIGUES, *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos são eficientes antioxidantes, pois são capazes de transferir um hidrogênio de sua composição para a neutralização dos radicais livres (SOETHE; STEFFENS; VIDAL, 2016).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos brutos das folhas de Alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*) por meio dos métodos de extração maceração dinâmica e banho ultrassônico.

### **Objetivos específicos**

- Coletar a planta e preparar os extratos etanólicos das folhas de *O. gratissimum L.* por meio dos métodos de extração maceração dinâmica e banho ultrassônico.
- Determinar experimentalmente o teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos das folhas de *O. gratissimum L.*
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *O. gratissimum L.* a partir dos métodos Poder Redutor e Complexo de Fosfomolibdênio.
- Comparar os métodos de extração maceração dinâmica e banho ultrassônico através da dosagem de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

## **2.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais**

As folhas de Alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) foram coletadas em jardim residencial, no início de outubro (primavera), nas proximidades do bairro Alvorada no município de Patos de Minas-MG, nas coordenadas 18°33'38.9"S latitude e 46°31'33.4"W longitude. Depois de realizada a devida identificação, foi confeccionada a exsicata e enviada ao Herbário Uberlandense (HUFU) para registro sob o número HUFU 81525 – *Ocimum gratissimum*. Realizada a coleta, as folhas foram separadas, higienizadas e congeladas em ultrafreezer (Coldlab®, Piracicaba, SP, Brasil) a -80°C. Após, foram levadas para secagem no liofilizador (Liotop® L101, São Carlos, SP, Brasil) por 48 horas. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas (Willey® Star FT50, Piracicaba, SP, Brasil), sendo transformadas em um pó fino.

## **2.2 Obtenção dos extratos brutos da espécie vegetal *Ocimum gratissimum* L. por banho ultrassônico**

Para a obtenção do extrato bruto por banho ultrassônico, o pó seco obtido foi pesado, e formando uma solução com o solvente álcool etílico absoluto de concentração 10% (p/v). Foram feitas duas soluções nesta concentração, cada uma em um Erlenmeyer de 250 mL. As soluções obtidas foram levadas ao banho ultrassônico pela duração de três pulsos de 15 minutos, com intervalos de 5 minutos entre cada pulso. Após realizada a extração, as soluções obtidas foram reunidas, filtradas a vácuo e em seguida, levadas ao rotaevaporador (Fisatom®, Perdizes, SP, Brasil) para evaporação do solvente etanol utilizando a temperatura de 55°C e 110 rotações por minuto (rpm). O extrato obtido foi solubilizado com água Milli-Q® para total retirada do balão do rotaevaporador. Então congelado no freezer comum (-4°C) e para a obtenção do extrato bruto final, a solução foi liofilizada.

## **2.3 Obtenção do extrato bruto da espécie vegetal *Ocimum gratissimum* L. por maceração dinâmica**

Para a obtenção do extrato bruto por maceração dinâmica, o pó seco obtido foi pesado, e formando uma solução com o solvente álcool etílico absoluto formando uma solução de concentração 10% (p/v). Foram feitas duas soluções nesta concentração, cada uma em um

Erlenmeyer de 250 mL. As soluções obtidas foram submetidas à maceração dinâmica, pelo agitador magnético, em temperatura ambiente e abrigo da luz (envolto em papel alumínio) por 24 horas. Após realizada a extração, as soluções obtidas foram reunidas, filtradas a vácuo e logo em seguida, levadas ao rotaevaporador (Fisatom®, Perdizes, SP, Brasil) evaporação do solvente etanol, utilizando a temperatura de 55°C e 110 rotações por minuto (rpm). O extrato obtido foi solubilizado com água Milli-Q® para total retirada do balão do rotaevaporador. Então congelado no freezer comum (-4°C) e para a obtenção do extrato bruto final, a solução foi liofilizada.

#### **2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,50 mL de cada um dos extratos brutos das folhas de *O. gratissimum* L. com 2,5 mL de 0,2 mol L<sup>-1</sup> do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L<sup>-1</sup>) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg mL<sup>-1</sup>) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### **2.5 Determinação atividade antioxidante pelo método do Poder Redutor**

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do poder redutor foi realizada de acordo com a metodologia de Dos Santos e colaboradores (2007). 100 µL de cada um dos extratos brutos das folhas de *O. gratissimum* L. (2000; 1000; 500; 250 e 125 µg mL<sup>-1</sup>) foram misturados com 1 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 1 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%. Após 20 minutos de incubação a 50°C, 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura, sendo essa agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada foi adicionada e 600 µL cloreto férrico 0,1%. As leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (2000; 1000; 500; 250; 125 e 62,5 µg mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg<sup>-1</sup>).

## 2.6 Determinação atividade antioxidante pelo método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio foi realizado conforme descrito por Prieto e colaboradores (1999). Uma alíquota de 0,1 mL de cada um dos extratos brutos das folhas de *Ocimum gratissimum* L. (2000; 1000; 500; 250 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução dos reagentes de trabalho (ácido sulfúrico 0,6M; fosfato de sódio 28mM e molibdato de amônio 4mM). Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria (Cientec®, Belo Horizonte, MG, Brasil) a 95°C por 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 695 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (2000; 1000; 500; 250; 125 e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato ( $\text{mg EBHTg}^{-1}$ ).

## 2.7 Análise Estatística

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2 x 5), sendo 2 extratos de *O. gratissimum* L. (dois métodos de extração) e 5 concentrações (2000; 1000; 500; 250 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com 3 repetições (triplicata).

Para o teor de fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 2 tipos de extratos *O. gratissimum* L. (dois métodos de extração) e 3 concentrações (1000; 500 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com 3 repetições (triplicata).

O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem antioxidante em relação às concentrações analisadas. Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de equivalentes ao ácido gálico, expressos em miligramas de ácido gálico ( $\text{mg EAG}$ ) por grama de peso seco de material vegetal. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.



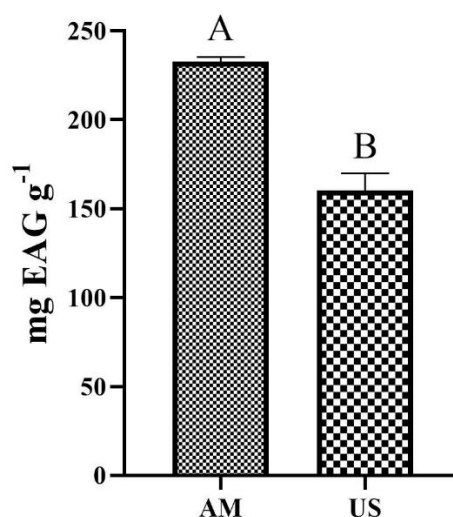
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostos fenólicos

O ensaio colorimétrico utilizado, é um método espectrofotométrico em que, caso haja a presença de substâncias redutoras na solução, ocorre a interação dessas com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os ácidos que fazem parte da composição química deste reagente (fosfotúngstico e fosfomolibdico) reagem com os compostos fenólicos (em estudo) e resultam em óxidos que possuem coloração azul detectável no comprimento de onda de 760 nm, possibilitando sua quantificação nos extratos. Conclui-se que quanto maior a presença de compostos fenólicos, maior a incidência da coloração azul nas amostras analisadas (PIRES *et al.*, 2017).

Foi observado na **Figura 1** que o extrato bruto das folhas de *O. gratissimum* L. preparado pelo método de maceração dinâmica que apresentou um teor de compostos fenólicos (232,5 mg EAG g<sup>-1</sup>) significativamente superior ao extrato preparado por meio de banho ultrassônico (aproximadamente 160,3 mg EAG g<sup>-1</sup>).

**Figura 1** – Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG por gramas dos extratos de *O. gratissimum* L.), utilizando dois extratos brutos obtidos por dois diferentes métodos de extração (maceração dinâmica AM e banho ultrassônico US). Médias seguidas por letras diferentes, diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Anusmitha e colaboradores (2021) utilizaram água como solvente para a extração dos metabólitos secundários de *O. gratissimum* L. por banho ultrassônico e na análise de fenóis totais foram detectados  $245,3 \pm 6,5$  mg EAG g<sup>-1</sup>. Resultado que difere do encontrado no presente estudo quanto ao extrato produzido por banho ultrassônico (160,3 mg EAG g<sup>-1</sup>), mas

apresenta proximidade com o teor de compostos fenólicos totais extraído por maceração dinâmica (232,5 mg EAG g<sup>-1</sup>). Essa diferença pode estar relacionada aos solventes utilizados e a localidade de coleta da planta, visto que, os autores obtiveram o material na Índia e, para o presente estudo, a planta foi coletada no Brasil; aliado ao fato das soluções 10% (p/v) de alfavaca terem sido submetidas aos pulsos do banho ultrassônico por mais tempo (1 h) que a do presente trabalho (45 min divididos entre três pulsos de 15 min cada).

No estudo realizado por Venuprasad e colaboradores (2014), foi usado etanol 70% como solvente e maceração dinâmica como método de extração. Os fenóis totais encontrados (124,3 ± 5,8 mg EAG g<sup>-1</sup>) também se distinguem quando comparados com o resultado obtido no presente estudo pelo mesmo método de extração (232,5 mg EAG g<sup>-1</sup>). Entretanto, o resultado aproxima do encontrado no presente estudo para o extrato etanólico produzido por banho ultrassônico (160,3 mg EAG g<sup>-1</sup>). Essas diferenças podem ser explicadas pela diferença de solventes utilizados e da localidade da coleta da matéria vegetal (Índia e Brasil).

Considerando que o local da coleta do material vegetal é um fator de interferência, uma vez que a temperatura, e disponibilidade de água e nutrientes no solo influenciam na síntese de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2006). A alfavaca coletada para a preparação dos extratos utilizados nos estudos mencionados provém da Índia, em que a temperatura média diária é 24,7°C e a pluviosidade média diária é 3,1 mm (GHODICHORE; DHANYA; FRANSSEN, 2022).

Os estudos mencionados não informaram a época da coleta, entretanto este é outro fator que influencia na síntese de metabólitos secundários. Segundo relatado por Habermann (2016), a produção de polifenóis pelos organismos depende de fatores do meio como a luz e quantidade de água na planta, além dos fatores endógenos como o estágio de maturação. Observando a época de coleta da planta utilizada nos extratos do presente trabalho, é possível inferir que os resultados obtidos no teste de Folin-Ciocalteu possuem como interferência a pluviosidade e incidência solar, visto que, no início da primavera no mês de outubro de 2021, data em que foi feita a coleta do material, houve precipitação média de 0,65 mm e temperatura média de 30,16°C nas proximidades da região de coleta (INMET, s.d.).

Outro fator de interferência entre os estudos comparados são os solventes utilizados que apresentam diferentes polaridades, o que interfere na solubilização dos compostos de interesse. Solventes polares tendem a ser melhores quando o objetivo é a extração de compostos de alta polaridade, e para compostos apolares, solventes com menor polaridade são mais eficientes (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Nesse sentido, Pandey e Tipathi (2014) indicaram dentre os solventes quais são os mais utilizados para a extração dos

metabólitos secundários das plantas devido a polaridade dos compostos e dos solventes. A água é mais usada para a extração de alguns compostos fenólicos como antocianinas, enquanto o etanol tem seu uso mais comum quando outros flavonoides são os compostos fenólicos de interesse na extração.

Em 2013, Do e colaboradores avaliaram dentre os solventes água, metanol (100%, 75% e 50%), etanol (100%, 75% e 50%) e acetona (100%, 75% e 50%), qual o mais efetivo para a extração de metabólitos secundários, quantificando extratos de *Limnophila aromatica*. Na dosagem de compostos fenólicos, o etanol absoluto apresentou melhores resultados em sua extração. Quando feito o teste químico para avaliação de flavonoides, o extrato etanólico também apresentou melhores resultados. Segundo os autores, os diferentes resultados obtidos entre cada extrato com os diferentes solventes, pode ser atribuído ao conteúdo de compostos não fenólicos no extrato aquoso, e a possível formação de complexos de alguns compostos fenólicos no extrato que são solúveis em metanol, etanol e acetona.

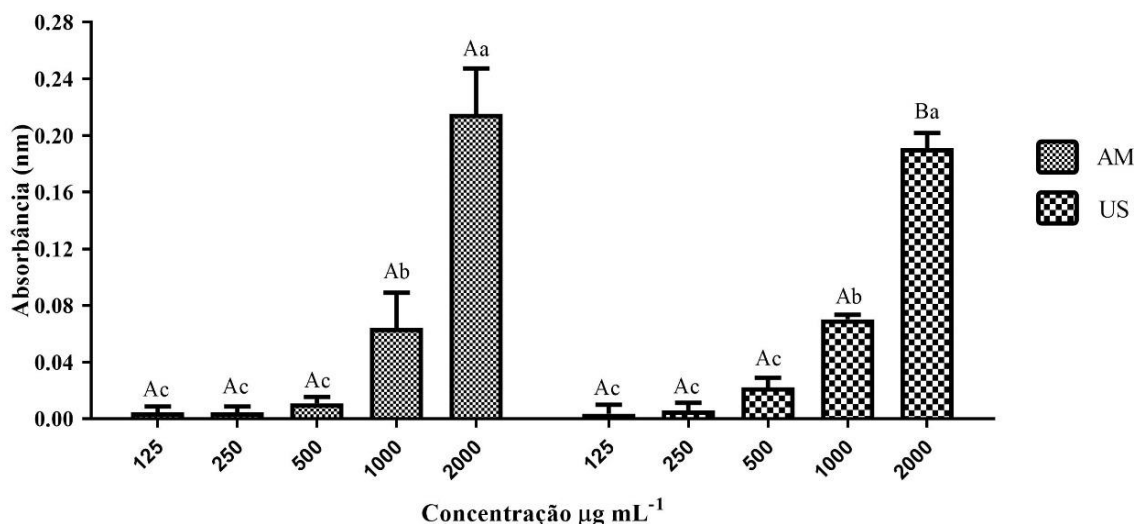
O Ministério da Saúde (2015) descreveu que extratos de alfavaca acusaram a presença de taninos flobafenos, flavonas, xantonas, chalconas, auronas, flavonóis, leucoantocianidinas, catequinas e terpenos, os quais, com exceção dos terpenos, são todos pertencentes à classe dos compostos fenólicos. Dessa forma, no presente estudo, considerando o solvente utilizado, etanol absoluto, devido a sua polaridade, provavelmente temos a predominância de polifenóis e flavonoides.

Portanto, o grupo de metabólitos secundários mais estudado é o de compostos fenólicos, tendo como principais alvos de aplicação em pesquisas no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, diabetes e doenças infecciosas (RASOULI *et al.*, 2017). Uma vez que essas condições podem estar relacionadas com o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de radicais livres no organismo, há o crescente interesse em pesquisas envolvendo moléculas antioxidantes, tais como os compostos fenólicos (ALBA; TESSARO; SOBOTTKA, 2021).

### **3.2 Atividade antioxidante pelo método Poder Redutor**

A **Figura 2** apresenta o gráfico dos resultados obtidos na leitura espectrofotométrica (em nm) das amostras submetidas ao método do Poder Redutor.

**Figura 2** - Atividade antioxidante refletida pelo aumento da absorbância em diferentes concentrações por meio do método do poder redutor, utilizando dois extratos brutos das folhas de *O. gratissimum* L obtidos por dois diferentes métodos de extração (maceração dinâmica -AM e banho ultrassônico-US). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Letras maiúsculas para comparar a concentração entre os diferentes extratos e minúsculas para comparar as concentrações de cada extrato.



Observa-se que o poder redutor dos extratos de *O. gratissimum* L. foi dose dependente nas concentrações de 500 µg mL<sup>-1</sup> a 2000 µg mL<sup>-1</sup>, ou seja, à medida que aumentou a concentração, aumentou também a atividade antioxidante. Nas concentrações abaixo das mencionadas (125 µg mL<sup>-1</sup> e 250 µg mL<sup>-1</sup>), a atividade antioxidante manteve-se constante estatisticamente.

Também é possível notar que a concentração de 2000 µg mL<sup>-1</sup> do extrato produzido por maceração dinâmica (AM) foi superior estatisticamente a da mesma concentração do extrato produzido por banho ultrassônico (US). Já para as outras concentrações, observa-se que os valores são similares.

No método de determinação da atividade antioxidante chamado Poder Redutor, a capacidade do composto analisado em doar elétrons e ser oxidado é quantificada, pois a força redutora elevada pode indicar alta atividade antioxidante. No método do Poder Redutor, os redutores presentes nas amostras reduzem o ferricianeto a ferrocianeto. Essa redução é testemunhada de forma quantitativa através da leitura no espectrofotômetro a 700 nm (nanômetros), e do ponto de vista qualitativo devido a nítida mudança na coloração da solução, em que inicialmente se apresenta amarela (ferricianeto) e torna-se verde com a redução em ferrocianeto (BARRETO, 2019; BIGHETTI; SAMPAIO; GUSMÃO, 2018).

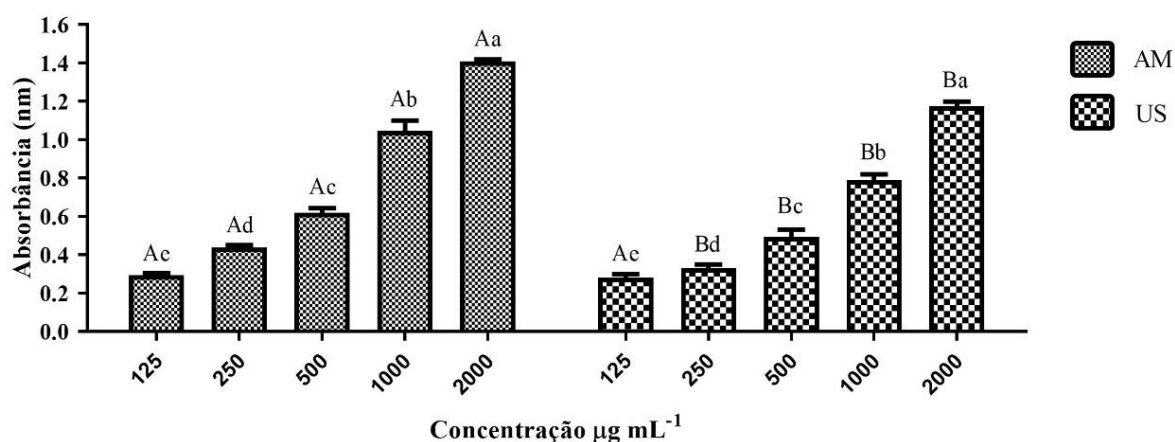
O Poder Redutor é um método de determinação da atividade antioxidante relativamente pouco usado em comparação a outros mais comuns e mais conhecidos como o método de captura do radical DPPH. É um método com vantagens como, ser rápido e econômico, além

de os reagentes necessários são de simples preparação. Como há a mudança de coloração da solução após a redução do ferricianeto, a visualização de que possa haver compostos com atividade antioxidante é quantificável (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

### 3.3 Atividade antioxidante pelo método Complexo de Fosfomolibdênio

Na **Figura 3** observa-se os resultados obtidos no ensaio de atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método do Complexo de Fosfomolibdênio. Nota-se que em todas as concentrações analisadas a atividade antioxidante foi superior nos extratos produzidos por maceração dinâmica (AM), exceto na concentração de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  que foi igual nos dois extratos. O poder redutor dos dois extratos foi dose dependente em todas as concentrações.

**Figura 3** - Atividade antioxidante refletida pelo aumento da absorbância em diferentes concentrações por meio do método do Complexo de Fosfomolibdênio, utilizando dois extratos brutos das folhas de *O. gratissimum* L obtidos por dois diferentes métodos de extração (maceração dinâmica -AM e banho ultrassônico-US). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Letras maiúsculas para comparar a concentração entre os diferentes extratos e minúsculas para comparar as concentrações de cada extrato.



Outra forma de determinação da atividade antioxidante é pelo método do Complexo de Fosfomolibdênio. O princípio é o mesmo do método analisado anteriormente, em que o composto em estudo com potencial antioxidante reduz o molibdênio VI em molibdênio V com a doação de elétrons. Esse método de avaliação da atividade antioxidante é de simples preparação e barato. Uma vantagem para apontar é a capacidade de avaliar a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos. Quando há a redução do molibdênio VI, a solução muda de cor indicando a presença de compostos com capacidade antioxidante, sendo possível visualizar qualitativamente, antes de fazer a leitura quantitativa no espectrofotômetro (PRIETO *et al.*, 1999).

A avaliação da atividade antioxidante não deve ser baseada em um único método, outros são necessários para caracterizar adequadamente os compostos como antioxidantes (OLIVEIRA, 2015). A escolha de utilizar dois métodos para a determinação da atividade, tem como objetivo conseguir aproximar da caracterização apropriada da presença de compostos antioxidantes na alfavaca.

Existem muitas maneiras de determinar a capacidade antioxidante e, além de basear-se em fundamentos diferentes, pode haver interferência. Portanto, considerando os pontos fortes, fracos e a aplicabilidade de cada teste, duas ou mais técnicas são atualmente recomendadas, pois nenhum teste isolado é usado para determinar a capacidade antioxidante por si só refletindo com precisão a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Portanto, nos dois testes realizados para avaliar a atividade antioxidante dos extratos (AM e US), observa-se que o extrato de *O. gratissimum* L. produzido por maceração dinâmica apresentou maior atividade. Esses resultados podem estar relacionados com a quantidade de compostos fenólicos extraídos por esse método, uma vez que foi superior a quantidade obtida no extrato produzido por banho ultrassônico, como o teste de Folin-Ciocalteu indicou (**Figura 1**).

A **Tabela 1** mostra, de forma sucinta, a comparação dos resultados nos testes aplicados no presente trabalho.

**Tabela 1** - Valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT, por meio dos métodos redução do complexo de fosfomolibdênio e do poder redutor, e valor dos compostos fenólicos por meio do método do Folin-Cicateau (mg equivalente ao Ácido Gálico por g do extrato) dos dois extratos, maceração dinâmica e banho ultrassônico.

	<b>Complexo Fosfomolibdênio mg EBHT g<sup>-1</sup></b>	<b>Poder Redutor mg EBHT g<sup>-1</sup></b>	<b>Folin-Cicateau mg EAG g<sup>-1</sup></b>
<b>AM</b>	132,3 A	38,5 A	232,5 A
<b>US</b>	89,8 B	16,4 B	160,3 B

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

#### 4 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos é possível concluir que os métodos de maceração dinâmica e banho ultrassônico são úteis para a extração de metabólitos secundários, mesmo diferindo entre si. Os testes químicos realizados nos extratos etanólicos brutos das folhas de

alfavaca demonstraram que o método de maceração dinâmica apresentou melhores resultados ao compará-los com os obtidos através do método do banho ultrassônico.

Foi detectada a presença de compostos fenólicos e a indicação de atividade antioxidante nas folhas da planta *Ocimum gratissimum* L., o que pode explicar as diversas atividades terapêuticas advindas da decocção de suas folhas, usada na medicina tradicional e, assim, demonstra ser um possível alvo de estudos farmacológicos futuros.

## REFERÊNCIAS

AJAYI, A. M., et al. *Ocimum gratissimum* L. L. leaf flavonoid-rich fraction suppresses LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 204, n. 23, p. 169-178, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.005

AJAYI, Abayomi M. *et al.* *Ocimum gratissimum* Linn. Leaf extract inhibits free radical generation and suppressed inflammation in carrageenan-induced inflammation models in rats. **Journal Of Basic And Clinical Physiology And Pharmacology**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 531-541, 1 jan. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0096>.

ALBA, T. M.; TESSARO, E.; SOBOTTKA, A. M. Seasonal effect on phenolic content and antioxidant activity of young, mature and senescent leaves from *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (Basellaceae). **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 84, p. 1-8, 2024. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.254174>.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. **Compostos fenólicos em alimentos**: uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.). São Paulo, v.66, n. 1, 2007. Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S007398552007000100001&lng=pt&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007398552007000100001&lng=pt&nrm=iso)>. Acessado em 1º ago. 2021.

ANUSMITHA, Koolamchal Madhu *et al.* Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, anti-genotoxic, and anticancer activities of different *Ocimum* plant extracts prepared by ultrasound-assisted method. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 117, p. 1-7, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101746>.

ANVISA, RDC 48/04, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília.

BARRETO, Matheus Siqueira. **Método analítico inovador para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante do café**. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2019.

BIGHETTI, A. E.; SAMPAIO, P. G.; GUSMÃO, C. P. Estudo da atividade antioxidante de uma formulação cosmética. **Revista UNINGÁ**, Maringá, v. 55, n. 3, p. 1-13, 2018. ISSN 2318-0579.

BORGES, L. P., AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**. Ipameri-GO, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.



BRAGA, Joelma Correia Beraldo; SILVA, Luan Ramos da. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de covid-19 / consumption of medicinal plants and herbal medicines in brazil. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 3831-3839, 2021. Brazilian Journal of Health Review. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv4n1-303>.

BRANDÃO, T. S. O., et al. Optimization of a technique to quantify the total phenolic compounds in jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 1–9, 2019.

CUNHA, A. L., et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema-AL, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v1i2.332.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos Antioxidants. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004

D. F. Ferreira, Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:1039-1042, 2011.

DJEUSSI, D. E., et al. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 164, p. 1-8, 2013.

DO, Quy Diem *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 296-302, set. 2014. The Journal of Food and Drug Analysis (JFDA), Food and Drug Administration, Taiwan (TFDA). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>.

DOS SANTOS M.H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova** 30: 604 (2007).

ELISABETSKY, Elaine. Biodiversidade/Artigos - Etnofarmacologia, **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003. ISSN 2317-6660.

FILHO V. C.; YUNES R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, vol. 21, n. 01, p. 99 – 105. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>.

FREITAS, Eduardo de. "Aspectos naturais de Minas Gerais "; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/brasil/aspectos-naturais-minas-gerais.htm>. Acesso em 21 de julho de 2022.

GHODICHORE, Nikhil; DHANYA, C.T.; FRANSSEN, Harrie-Jan Hendricks. Isolating the effects of land use land cover change and inter-decadal climate variations on the water and energy cycles over India, 1981–2010. **Journal Of Hydrology**, [S.L.], v. 612, p. 128267, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2022.128267>.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P.. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 374-381, 31 out. 2006.

HABERMANN, E. et al. Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 898-904, nov. 2016.

HASSAN, Bassam Abdul Rasool. Medicinal Plants (Importance and uses). **Pharmaceutica Analytica Acta**, [S.L.], v. 03, n. 10, p. 1-1, dez. 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2153-2435.1000e139>.

HE, Wenting; HUANG, Hong; HE, Jia; SUBHAN, Sidra; PENG, Yi; HUANG, Meiyun; HE, Hui; TANG, Ying; ZHAO, Zhongxing. Amino acids imprinted ZIF-8s for the highly efficient and selective adsorption of antioxidant peptides from silkworm pupa protein. **Food Research International**, [S.L.], p. 1-39, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111406>.

Horto didático de plantas medicinais do HU/CCS. **Alfavaca-cravo**, 2019. Disponível em: <<https://hortodidatico.ufsc.br/alfavaca-cravo/>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

JACQUES, R. S. Caracterização Química Da Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*): Aplicação De Diferentes -Processos De Extração E Influência Das Condições De Plantio Sobre A Composição Química. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

JUNQUEIRA, R.; CARDOSO, G. Metabólitos Secundários Vegetais e Benefícios Antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

KHODDAMI, Ali; WILKES, Meredith; ROBERTS, Thomas. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 19 fev. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18022328>.

LI, Yanqun; KONG, Dexin; FU, Ying; SUSSMAN, Michael R.; WU, Hong. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 148, p. 80-89, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>.

MANN, A. Phytochemical constituents and antimicrobial and grain protectant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) grown in Nigeria. **International Journal of Plant Research**, v. 2, n. 1, p. 51-58, 2012.

MARTINS, Cláudia Rocha; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, [S.L.], v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000800026>.

MENSOR, Luciana L. MENEZES Fábio, S. LEITAO Gilda, G. et al. **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method**. *Phytother Res.* 15, 127-130 (2001) Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11268111/>>. Acessado em 03 ago. 2021.

MEO, Sergio di; VENDITTI, Paola. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2020, n. 2, p. 1-32, 24 abr. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/9829176>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca)**. 2015. p. 89. Monografia – Ministério da Saúde e ANVISA.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB**. 1. ed. Brasília: Governo Federal, 2000.

OBINNA, N. C., et al. Antibacterial effects of extracts of *Ocimum gratissimum* and piper guineense on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Food Science**, v. 3, n. 3, p. 077-081, 2009. ISSN-1996-0816.

OKODUWA, S. I. R., et al. Anti-Diabetic Potential of *Ocimum gratissimum* L. Leaf Fractions in Fortified Diet-Fed Streptozotocin Treated Rat Model of Type-2 Diabetes. **Medicines**, v. 4, n. 73, p. 1-21, 2017. DOI: 10.3390/medicines4040073

OKODUWA, S. I. R. *et al.* Evaluation of extraction protocols for anti-diabetic phytochemical substances from medicinal plants. **World Journal Of Diabetes**, v. 7, n. 20, p. 605-614, 2016. Baishideng Publishing Group Inc. <http://dx.doi.org/10.4239/wjd.v7.i20.605>.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12\\_165](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_165).

ONYEBUCHI, Confidence; KAVAZ, Doğa. Effect of extraction temperature and solvent type on the bioactive potential of *Ocimum gratissimum* L. extracts. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-78847-5>.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and prephytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of pharmacy phytochemistry*. v. 2, n. 5, p. 115-119, 2014. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/11.1.html>. Acesso em: 21 de jul. 2022.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152. 2012. ISSN-2179-4804.

PEREIRA, R. S. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúdes Públicas**. v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004. DOI: 10.1590/S0034-89102004000200025.

PERES, Lázaro E. P. **In: Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo. p. 1-5, 2017.

PRIETO, Pilar *et al.* Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin e. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, maio 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.

RASOULI, Hassan; FARZAEI, Mohammad Hosein; KHODARAHMI, Reza. Polyphenols and their benefits: a review. **International Journal Of Food Properties**, [S.L.], p. 1-42, 4 ago. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>.

RIBEIRO, Andressa Ândria Martins. **Avaliação da atividade antioxidante de diferentes marcas de chá de *Hibiscus sabdariffa* L.** Monografia. Universidade de Brasília – UnB, Brasília-DF, 2017.

RODRIGUES, L. S., et al. Noni (*Morinda citrifolia* linn.): Determinação Fitoquímica e Potencial Antioxidante pelo Método DPPH. **Conex. Ci. e Tecnol.** Fortaleza/CE, v.11, n. 4, p. 47-54, dez. 2017.

ROLEIRA, Fernanda M.F.; VARELA, Carla L.; COSTA, Saul C.; TAVARES-DA-SILVA, Elisiário J.. Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: anticancer effects and synthetic approaches to modulate biological activity. *Studies In Natural Products Chemistry: Products Chemistry*, [S.L.], p. 115-156, 2018. Anual. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-64057-4.00004-1>.

SANCHITA, SHARMA, A. Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress. **Gene Expression Analysis in Medicinal Plants under Abiotic Stress Conditions**. p. 407–414, 2018.

SASSAKI, B., et al. Levantamento etnofarmacológico de espécies medicinais na reserva de desenvolvimento sustentável da Barra do Uma. **UNISANTA Bioscience**. Vol. 5 n° 1 (2016) p.112 - 119. 2016.

SILVA, Leomara Andrade da *et al.* Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 117-126, 2018. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20180011>.

SILVA, Maira Oliveira *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to cooking. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 21, p. 1-8, 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7216>.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 16, p. 144-158, 1965.

SOETHE, C., et al. Qualidade, Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante de Amoras-Pretas 'Tupy' e 'Guarani' Armazenadas a Diferentes Temperaturas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 51, n. 8, p. 950-957, ago. 2016.

SUCUPIRA, N. R., et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

UGBOGU, Ositadinma Chinyere *et al.* A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Heliyon**, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 1-17, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08404>.

VENUPRASAD, M.P.; KANDIKATTU, Hemanth Kumar; RAZACK, Sakina; KHANUM, Farhath. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. **South African Journal Of Botany**, [S.L.], v. 92, p. 151-158, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.010>.

VILANOVA, C. M., et al. *Ocimum gratissimum* L.: Uma revisão das atividades farmacológicas da espécie e do seu óleo essencial. **Conexão Ci.** Formiga-MG, v. 14, n. 1, p.64-78, 2019.

VIZZOTTO, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. 10p.

YUNES, R. A.; PEDROSA R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, vol.24, n. 01, p. 147 – 152, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>.

ZHANG, Qing-Wen *et al.* Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-26, 17 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.