

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

TATIANE BARBERÁ GALLEGO

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CHÁ DA *Artemisia annua* EM DIFERENTES
MODOS DE PREPARO

Patos de Minas

2017

TATIANE BARBERÁ GALLEGO

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CHÁ DA *Artemisia annua* EM DIFERENTES
MODOS DE PREPARO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia - Campus de Patos de Minas como parte dos requisitos para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes

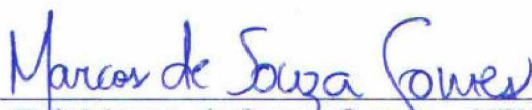
Patos de Minas

2017

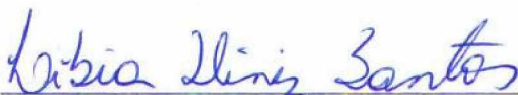
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO CHÁ DA *Artemisia annua* EM DIFERENTES
MODOS DE PREPARO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do título de Bacharel no curso de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Federal de Uberlândia - *Campus* de Patos de
Minas, pela banca examinadora, formada por:

Patos de Minas, 01 de Agosto de 2017.



Prof^o. Dr^o. Marcos de Souza Gomes – UFU/MG



Prof^a. Dr^a Líbia Diniz Santos – UFU/MG



Prof^a Dr^a Ana Clara Garcia Guimarães

Dedico esse trabalho aos meus pais João Carlos e Nara, irmã Patrícia e meus avós com toda minha gratidão, por todo apoio e orações que fizeram por mim ao longo desses cinco anos de graduação.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos sendo o meu maior guia.

Agradeço ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Marcos de Souza Gomes pela oportunidade, dedicação, orientação e apoio na elaboração deste trabalho.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso, em especial a Professora Dr^a. Líbia Diniz Santos, por ter sido minha orientadora desde 2014 me incentivando nessa área acadêmica. Ao Professor Dr^o. Danylo de Oliveira e aos petianos do Programa de Educação Tutorial, que contribuíram na minha formação profissional e principalmente no crescimento pessoal, com todo o incentivo e aprendizado.

Meu pai e mãe, João Carlos e Nara, pelo amor, incentivo, confiança, conforto, conselhos e orientações e por estarem ao meu lado em todos os momentos mesmo com a distância. E que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. A minha irmã, Patrícia, pelo ombro amigo e apoio em qualquer circunstância e por me transmitir calma nos momentos difíceis. Aos meus avós, Alcides, Jandira, João (*in memorian*) e Tereza e meus familiares, por todas as orações, torcidas e apoio. A vocês, meu muito obrigada por todo o auxílio para que eu concluísse essa importante etapa da minha vida.

Agradeço aos meus amigos de faculdade, Anielle, Roberto, Eduardo, Lúcio e Paulo que contribuíram cada um de alguma maneira durante a minha formação. E em especial, a Jéssica e Sara que estiveram os cinco anos sempre ao meu lado, dando suporte em cada passo dado, na alegria, nas conquistas, tristezas, dificuldades, sendo o desabafo e apoio uma da outra. Enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A *Artemisia annua* é uma planta com diversos benefícios e importantes propriedades, um desses benefícios é sua atividade antioxidante. Devido à importância desses compostos antioxidantes, o trabalho teve como objetivo estudar diferentes métodos de atividade antioxidante na planta e avaliar o teor de compostos fenólicos na planta *A. annua*, utilizando três métodos de preparo do chá da referida planta. No primeiro método de preparo do chá, as folhas foram fervidas em água durante 10 minutos, deixadas em repouso e filtrada. No segundo, foi adicionada água fervente nas folhas secas, agitada, deixada em repouso durante 10 minutos, e filtrada. E no terceiro método, após a adição de água fervente, a mistura foi agitada e coberta durante 10 minutos e em seguida, filtrada. Após esse procedimento, foram feitas as atividades antioxidantes, pelos métodos de DPPH, ABTS e o teor de compostos fenólicos foi determinado pelo reagente Folin-Ciocalteu. Nota-se que nos resultados obtidos pelos métodos DPPH e ABTS, todas as amostras e o padrão BHT apresentaram uma atividade dose dependente, ou seja, a medida em que aumentou a concentração a atividade antioxidante aumentou. Observou-se nos dois métodos que, a amostra que teve maior atividade antioxidante foi a que as folhas foram fervidas em água durante 10 minutos. Isso corrobora com os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu onde o mesmo tratamento foi que obteve maior teor de compostos fenólicos. A análise antioxidante demonstrou que o chá da *A. annua* tem uma capacidade elevada de reduzir os radicais DPPH e ABTS e possui um significativo teor de fenólicos demonstrando ação antioxidante natural.

Palavras chaves: DPPH; ABTS; Antioxidante; Radical livre; Fenólicos; Extrato da planta.

ABSTRACT

Artemisia annua, is a plant with several important benefits and properties and an antioxidant. Due to the importance, the antioxidants, the work with the objective, perform different methods of antioxidant activity and evaluate the content of phenolic compounds in the plant. *A. annua*, use three methods of preparation of tea from the direct plant. It is not the first method of tea preparation, as leaves were boiled in water for 10 minutes, allowed to stand and filtered. In the second, boiling water was added to the dried leaves, stirred, allowed to stand for 10 minutes, and filtered. And in the third method, after an addition of boiling water, a mixture held in the decade 10 minutes and then filtered. After this procedure, they were made as antioxidant activities, by the DPPH methods, ABTS and the phenolic compounds content were determined by the Folin-Ciocalteu reagent. It is noted that in the results obtained by DPPH and ABTS methods, all samples and the BHT standard showed a dose-dependent activity, that is, a measure in which increased concentration increased antioxidant activity. It was observed in the two methods that the sample that had the highest antioxidant activity was that as leaves were boiled in water for 10 minutes. This corroborates with the results obtained by the method of Folin-Ciocalteu where the same treatment is the best content of phenolic compounds. An antioxidant analysis demonstrated that *A. annua* tea has a high capacity of reducing radicals DPPH and ABTS and has a phenolic content demonstrating natural antioxidant action.

Key words: DPPH; ABTS; Antioxidant; Free radicals; Phenolic; Plant extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação de radicais livres e possibilidades de controle com antioxidantes.....	15
Figura 2 – Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos.	18
Figura 3 - Reação química entre o BHT e o radical DPPH.....	20
Figura 4 - Redução do ABTS por um antioxidante e sua formação.....	21
Figura 5 - Os três modos de preparo do chá das folhas de <i>A. annua</i>	23
Figura 6 – Análise do método DPPH dos quatro tratamentos.	27
Figura 7 - Atividade antioxidante do teste do radical livre DPPH	28
Figura 8 - Análise do método ABTS dos quatro tratamentos.....	30
Figura 9 - Atividade antioxidante pelo método de ABTS.	31
Figura 10 - Gráfico da curva da concentração de ácido gálico pela absorbância.....	32
Figura 11 - Teste de fenólicos totais utilizando os três tipos de preparo de <i>Artemisia annua</i> .	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1	<i>Artemisia annua</i>	13
3.2	Chá.....	13
3.3	Antioxidante	14
3.3.1	Antioxidante sintético	17
3.3.2	Antioxidante natural.....	18
3.4	Métodos de avaliação da atividade antioxidante.....	20
3.4.1	Método do sequestro do radical livre DPPH	20
3.4.2	Método ABTS	20
3.5	Fenólicos Totais	21
4	METODOLOGIA	23
4.1	Matéria Prima e extração.....	23
4.2	Determinação da atividade antioxidante	24
4.2.1	DPPH.....	24
4.2.2	ABTS	24
4.3	Determinação dos fenólicos totais.....	25
4.4	Análise Estatística	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Análise do teste do Radical livre DPPH	27
5.2	Análise do teste utilizando o método ABTS.....	29
5.3	Análise do teste de fenólicos totais do chá.....	31
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua*, conhecida por qinghao, é uma planta com diversos benefícios e importantes propriedades como inseticida, herbicida e antiulcerogênica. Ela é utilizada no tratamento de febre, lúpus eritematoso e principalmente no tratamento de malária, além de apresentar componentes que ainda estão sendo estudados, em trabalhos como Efferth (2017); Cai et al., (2004); Prota (2015), com a capacidade de “eliminar” as células cancerosas.

A *A. annua* apresenta como um dos seus compostos a artemisinina, seu principal princípio ativo utilizado nos tratamentos de malária, febres, entre outros. De acordo com Hsu (2006), a estrutura química presente no extrato aquoso da *A. annua* analisado foi identificada no final dos anos 70. No entanto, a produção farmacêutica de medicamentos contendo esse composto teve início apenas em 1986, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) começou a investigar a artemisinina e seus derivados e os produziu em grande escala desde 2004.

Os chás cada vez mais têm atraído muita atenção, principalmente nos últimos anos, devido a sua capacidade antioxidante e sua abundância na dieta de milhares de pessoas em todo o mundo. Possuem diversos benefícios e são ricos em catequinas, uma das seis classes dos flavonóides. As catequinas dos chás apresentam propriedades biológicas como atividade antioxidante e são sequestradoras de radicais livres (ASSOLINI; TEDESCO; CARPES, 2006).

A infusão clássica da planta é um método que extrai uma fonte rica em compostos fenólicos antioxidantes e artemisinina (RÄTH et al., 2004; ROSTKOWSKA, 2012), sendo que o conteúdo dos flavonoides parece acumular em maiores quantidades durante o florescimento da planta (ROSTKOWSKA, 2012). A infusão consiste em despejar água fervendo em um recipiente fechado ou não com a planta dentro e deixá-la repousar por um determinado tempo. Outro processo é a decocção, que consiste em colocar a erva em um recipiente com água fria e cozinhar de cinco a trinta minutos, dependendo da erva utilizada. Esse outro método geralmente é utilizado para cozimento de raízes e ervas secas (BADKE et al., 2011).

Pesquisas nacionais e internacionais sobre a propriedade antioxidante de vegetais e plantas foram realizadas nas últimas décadas em decorrência da busca de um estilo de vida mais saudável e da constatação de que certos alimentos apresentam substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis. Com isso, plantas e vegetais que apresentam propriedade antioxidante integram o grupo dos alimentos que contêm essas substâncias, denominadas funcionais, por estarem potencialmente envolvidas na redução do risco de doenças (SOUZA, 2013).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos. O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, presentes na maioria das plantas, estão associados a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002; ASSOLINI; TEDESCO; CARPES, 2006).

Diversas técnicas são utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas, que resultam em uma seleção de substâncias ou misturas como o ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), fenólicos totais entre outras. A eficiência antioxidante de compostos depende de sua estrutura e concentração, além de ser influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração, bem como pelo tempo e temperatura utilizados. Embora haja uma diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal. Assim, as metodologias utilizadas devem ser validadas e padronizadas. Dessa forma, é importante avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (PINHEIRO; CARPES, 2012).

Compostos com atividade antioxidante presentes nos alimentos e plantas vem sendo cada vez mais estudados, devido a sua importância ao nosso organismo, protegendo dos radicais livres que podem causar danos ao DNA, lipídeos e dessa forma resultar em doenças como o câncer. Resultados preliminares demonstram que a *A. annua* pode ser utilizada como um antioxidante natural, possuindo assim um efeito bioativo benéfico além de vários outros efeitos fisiológicos. Assim, a realização de novos estudos que avaliem a atividade antioxidante do extrato é de extrema importância.

2 OBJETIVO

Realizar diferentes métodos de atividade antioxidante e também avaliar o teor de compostos fenólicos presentes na planta *A. annua*, utilizando diferentes métodos de preparo do chá da referida planta.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Artemisia annua*

A *Artemisia annua* é uma planta que pertence à família *Asteraceae* que engloba mais de 300 espécies (ROSTKOWSKA, 2012). Essa espécie recebe o nome de *annua* por ser a única da família com ciclo anual. É originária da China e conhecida como “qinghao”, que significa erva verde (SILVA, 2009). Ela é uma espécie altamente aromática, herbácea e sua altura pode variar entre 30 e 250 cm, fator esse dependente da sua localização e de caracteres agronômicos durante seu crescimento. As flores da *A. annua* são heterogâmicas, com coloração amarelada que variam de 2 a 3 mm (ROSTKOWSKA, 2012).

A *A. annua* é utilizada pela medicina tradicional chinesa para o tratamento de febre e malária (SILVA, 2009). De acordo com Prota (2015), a planta apresenta componentes capazes de matarem além dos parasitas da malária, as células cancerosas, sendo uma nova alternativa no tratamento do câncer. Ela também é utilizada no tratamento das crises de febre e no tratamento do lúpus eritematoso e apresenta propriedades como inseticida, herbicida e antiulcerogênica (LORENZI; MATOS, 2008). Tem grande importância principalmente por ser a principal fonte natural viável para a extração de artemisinina, seu principal princípio ativo, que é uma lactona sesquiterpênica (CONDORI, 2005; SILVA, 2009).

Além da planta possuir essa importante propriedade química devido a esse composto, existem também aplicações funcionais dos extratos, como o etanólico de *A. annua*, que apresenta atividade antiulcerogênica e antitumoral. E seu óleo essencial, que apresenta atividade repelente, antibacteriana e antioxidante (CONDORI, 2005).

3.2 Chá

O chá de *A. annua*, é utilizado há mais de dois mil anos principalmente para o tratamento de febre e malária (BRAZ FILHO, 2010). Sendo que como remédio para o tratamento da malária, a atual farmacopéia da República da China, recomenda o preparo de uma dose diária de 4,5 a 9 g de folhas secas de *A. annua* em 1 litro de água fervente (infusão) (RÄTH et al., 2004). Um estudo realizado para o tratamento da malária com essas recomendações demonstrou um eficiente controle do parasitismo (ROSTKOWSKA, 2012).

Os chás ingeridos na forma de infusão contribuem para a extração dos compostos fenólicos, compostos esses benéficos à saúde (ASSOLINI; TEDESCO; CARPES, 2006).

Assim, o uso como infusão representa uma alternativa viável e segura, como solução em alguns países onde o princípio ativo ou seus derivativos não chegam à população carente que necessita da medicação. Com isso, a artemisinina e vários flavonoides que já foram isolados da planta estão sendo cada vez mais estudados para sua atividade antimalárica, anticancerígena, antioxidante ou outras funções biológicas relevantes em ensaios *in vivo* e *in vitro* (ROSTKOWSKA, 2012).

Alguns estudos realizados na China mostraram que a utilização de 72 a 125 g de folhas secas por dia durante três dias consecutivos são altamente eficientes no tratamento da malária. E outros demonstraram que a infusão de *A. annua* é segura também para gestantes (WILLCOX et al., 2007; ROSTKOWSKA, 2012).

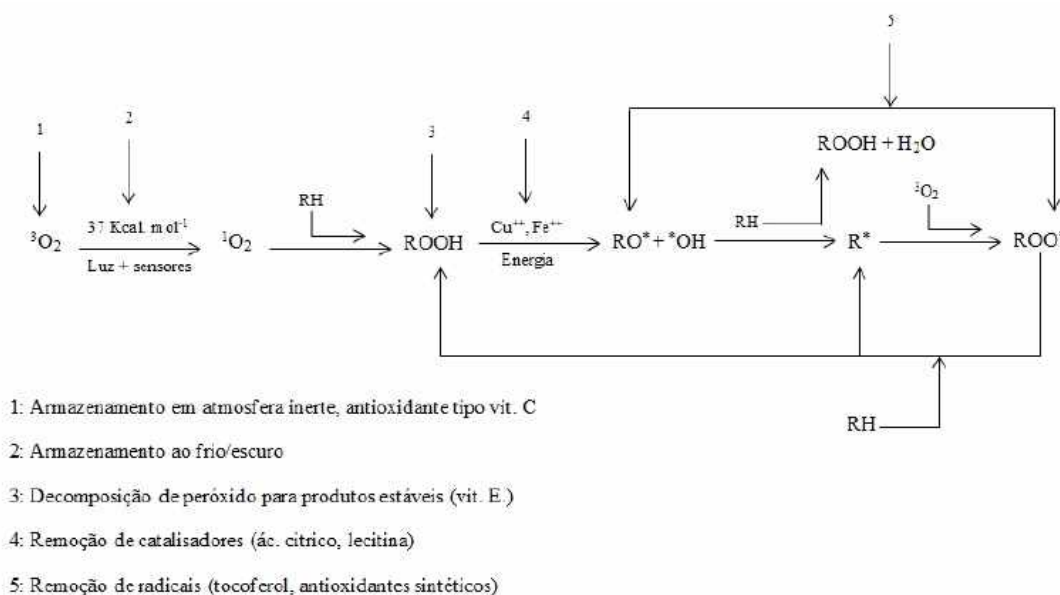
Pesquisas realizadas no Japão mostraram que o consumo de cinco ou mais xícaras de chá por dia correlacionava-se negativamente com a recorrência das Fases I e II do câncer de mama em mulheres (JANKUN; SELMAN; SWIERCZ, 1997; ASSOLINI; TEDESCO; CARPES, 2006).

A infusão de *A. annua* também é utilizada em medicina veterinária, onde Lans et al. (2007) utilizaram essa infusão para o tratamento de verminoses e giardíase e verificaram diminuição de 81,6% a 83,2% do desenvolvimento de *Cryptosporidium parvum*, quando utilizaram a infusão em camundongos. Outro estudo realizado por Bhakuni et al. (2001) demonstraram atividades biológicas do extrato de *A. annua* no controle de infecções bacterianas causadas por *Salmonella typhi*, *Proteus vulgares*, *Staphylococcus aureus*, como também sua atividade alergênica (ROSTKOWSKA, 2012).

3.3 Antioxidante

O termo antioxidante de forma geral “são substâncias que impedem a oxidação de outras substâncias químicas”. Ou seja, são definidos como compostos capazes de retardar ou inibir a oxidação ocorrida em lipídios ou em outras moléculas, evitando o início ou bloqueando a propagação das reações de oxidação em cadeia de diferentes modos, como representado na Figura 1 (ARAÚJO, 2004; CRUZ, 2014).

Figura 1 - Formação de radicais livres e possibilidades de controle com antioxidantes.



Fonte: Araújo (2004).

A importância dos antioxidantes que inibem a oxidação de moléculas orgânicas não é somente na preservação de alimentos, mas também na defesa contra o stress oxidativo em sistemas vitais (PINHEIRO; CARPES, 2012). Pois, os antioxidantes também atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, impedindo a formação de radicais livres, e consequentemente seu ataque sobre lipídios, aminoácidos, as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Isso evita a formação de lesões e a perda da integridade celular, além de influenciar na reparação das lesões causadas pelos radicais (removendo danos da molécula de DNA e reconstituindo as membranas celulares danificadas) e ainda aumentar a síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MIRANDA, 2010).

Nenhum antioxidante possui todas as características de um oxidante “bom” ou “perfeito”, como por exemplo: ser um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais; ser ativo na proteção de moléculas de proteínas e lipídios; ter uma boa biodisponibilidade, após administração tanto oral, quanto parenteral; ter meia vida longa; ser ativo no espaço intra e extracelular e ser capaz de cruzar a membrana celular intacto (ROSTKOWSKA, 2012).

Esses compostos antioxidantes são aplicados na indústria para diversas funções, como, proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a sua decomposição oxidativa pela ação da luz, temperatura e umidade. Eles podem ser classificados quanto à afinidade química, em lipofílicos, que são os que apresentam maior afinidade pela fase oleosa (tocoferóis, BHA, BHT, GP e ácido ascórbico) e hidrofílicos, que apresentam maior afinidade pela fase aquosa

(combinações inorgânicas contendo enxofre, combinações orgânicas sulfuradas e ácido ascórbico) (MIRANDA, 2010).

Para minimizar os problemas da oxidação de alimentos, podem ser utilizados os antioxidantes sintéticos. Esses apresentam problemas de solubilidade, alguns provocam sabores estranhos e outros são altamente tóxicos, limitando assim seu emprego em alimentos ou material de embalagem, conforme o exigido pela legislação. Pode-se também utilizar os antioxidantes naturais. Dessa forma, na escolha de um antioxidante, devem ser considerados alguns fatores, como a legislação, o custo e se este é um antioxidante natural ou sintético (MIRANDA, 2010).

A eficiência antioxidante de um composto depende de sua estrutura e concentração, além de ser influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo tempo e temperatura utilizados. Além disso, a quantidade desses compostos nos vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. Além da diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal. Assim, as metodologias utilizadas devem ser validadas e padronizadas. Dessa forma, é importante avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (MIRANDA, 2010).

De acordo com Miranda (2010), os antioxidantes recebem a seguinte classificação:

- **Antioxidantes primários:** são compostos fenólicos que doam átomos de hidrogênio aos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, removendo-os ou inativando-os, interrompendo a reação em cadeia. Como os polifenóis, como BHA, BHT, TBHQ (*tert*-butil-hidroquinona) e GP (galato de propila), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais;
- **Antioxidantes sinérgicos:** atuam sinérgicamente. Possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidante, podendo aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em associação com eles;
- **Antioxidantes removedores de oxigênio:** capturam o oxigênio presente no meio, por meio de reações químicas estáveis, tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Como o ácido ascórbico;
- **Antioxidantes biológicos:** podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício, podendo ser incluídas enzimas, como glicose oxidase, superóxido dismutase e catalases;

- **Antioxidantes quelantes ou sequestrantes:** complexam íons metálicos, como cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica, em que um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove essa ação de complexação;
- **Antioxidantes mistos:** são compostos provenientes de plantas e animais, como proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados dos terpenoides e dos fenilpropanoides.

Antioxidantes podem ser sintético ou natural. No entanto, mesmo com a alta eficiência dos antioxidantes sintéticos cientificamente comprovada, a partir do início da década de 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para a utilização na indústria de alimentos, aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir os sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (CRUZ, 2014).

Devido a isso, uma série de trabalhos visam estudar o potencial de extratos de diversas fontes naturais a fim de substituir os antioxidantes sintéticos, que são largamente utilizados para aumentar a vida útil de alimentos lipídicos (DURÁN; PADILLA, 1993). Além disso, o crescente aumento da medicina alternativa e a atração pelo apelo de natural faz com que a população consuma cada vez mais produtos e/ou preparados contendo altas doses de antioxidantes naturais (CRUZ, 2014).

Na literatura é encontrado muitos estudos e que muitas vezes possuem conclusões conflitantes sobre o real efeito no organismo dos antioxidantes sintéticos e naturais e se esses realmente representam um risco à saúde para humanos durante a ingestão. Dessa forma, mais trabalhos e pesquisas são fundamentais para verificar o efeito dos antioxidantes naturais no organismo e nos alimentos, uma vez que esses compostos podem possuir efeitos indesejáveis quando consumidos em doses acima do normal. É importante ressaltar, que tais estudos são de extrema importância, devido à relevância que os antioxidantes apresentam não só em aspectos tecnológicos, mas também fisiológicos. Logo determinar concentrações seguras de consumo e evidenciar os efeitos desses, tornam-se questões essenciais e imprescindíveis (CRUZ, 2014).

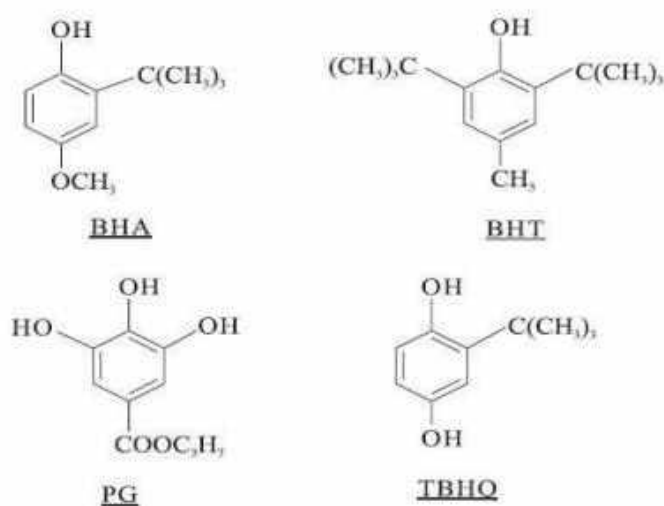
3.3.1 Antioxidante sintético

Antioxidantes sintéticos são compostos fenólicos que possuem substitutos de alquila. São bastante utilizados na indústria de alimentos devido a sua alta capacidade antioxidante e sua atuação no retardo das reações de oxidação (CRUZ, 2014).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os polifenóis, sendo os principais o butil hidroxianisol (BHA) (IUPAC: 2-terc-butil-4- metoxifenol), butil

hidroxitolueno (BHT) (IUPAC: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol), terc butil hidroquinona (TBHQ) (IUPAC: 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol) e propil galato (PG) (IUPAC: propil 3,4,5-trihidroxibenzoato), (Figura 2) . A estrutura destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre gerado no processo de oxidação, interrompendo assim o mecanismo pelo qual a reação ocorre e a geração de compostos indesejáveis às características sensoriais e nutricionais dos alimentos. Desse modo, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres que possuem baixa reatividade graças à estabilização que a ressonância do anel aromático proporciona, não propagando ou promovendo as reações de oxidação (CRUZ, 2014).

Figura 2 – Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos.



Fonte: Ramalho; Jorge (2006).

Em razão dos riscos potenciais dos antioxidantes sintéticos sobre a saúde, autoridades governamentais e consumidores estão voltados para questões relacionadas à segurança alimentar e aos efeitos nocivos potenciais dos antioxidantes sintéticos na saúde. Com isso, pesquisas estão voltadas para a procura de compostos naturais que exibam essa propriedade funcional de antioxição, atuando sozinhos ou sinergisticamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e reduzir o uso dos antioxidantes sintéticos (RAMALHO; JORGE, 2006).

3.3.2 Antioxidante natural

Os antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos, quinona, lactona entre outros. Eles compreendem uma vasta classe de compostos químicos, que atuam de diferentes meios na oxidação de lipídios, doando prótons (antioxidante primário), como os compostos

fenólicos, e/ou quelando com catalisadores da reação de oxidação (sinérgicos), como os ácidos cítrico e ascórbico. (CRUZ, 2014).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de diferentes matrizes alimentares ou orgânicas, sendo muito comum a utilização de vegetais e plantas. Estes abrangem uma série de substâncias químicas com diferentes funções orgânicas e mecanismos de atuação. Uma grande quantidade de frutas, ervas e especiarias são fontes de compostos fenólicos. Essas substâncias frequentemente têm demonstrado uma alta atividade antioxidante em sistemas *in vitro*, o que sugere sua utilização como conservante natural em alimentos propensos à oxidação lipídica (CRUZ, 2014).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm descrito a presença de antioxidantes e compostos com atividade sequestradora de radicais em frutas, vegetais, ervas e extratos de cereais. Entre os antioxidantes naturais mais utilizados, podem ser citados tocoferóis, compostos fenólicos e outros (RAMALHO; JORGE, 2006).

A utilização de antioxidantes naturais, apresenta vantagens devido a implicações na área de saúde, pois os consumidores estão buscando cada vez mais alimentos ou aditivos considerados naturais, e na funcionalidade, como, por exemplo, a maior solubilidade dos antioxidantes naturais tanto em água como em óleo, importante na preparação de emulsões e outras formulações, como os hidrogéis. Há também vantagem em nível preservacionista, decorrente do aproveitamento dos resíduos das indústrias alimentícias, com destinação adequada desse resíduo gerado, o que favorece o homem e o meio ambiente. Como exemplo, destaca-se a indústria de sucos e doces de frutas, que geram grande quantidade de sementes, cascas e bagaços, que poderiam ser reaproveitadas como possíveis fontes de antioxidantes naturais, em vez de serem desperdiçadas (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; MORAIS et al., 2009).

Há um grande interesse em ervas e especiarias como fontes naturais de antioxidantes, destacando-se aquelas que são usadas há muitos anos para realçar as características sensoriais dos alimentos, aumentando e/ou acrescentando sabor ao alimento, e, secundariamente, com finalidade de conservação, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (MORAIS et al., 2009).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propila, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos. Em função dos possíveis problemas provocados pelo

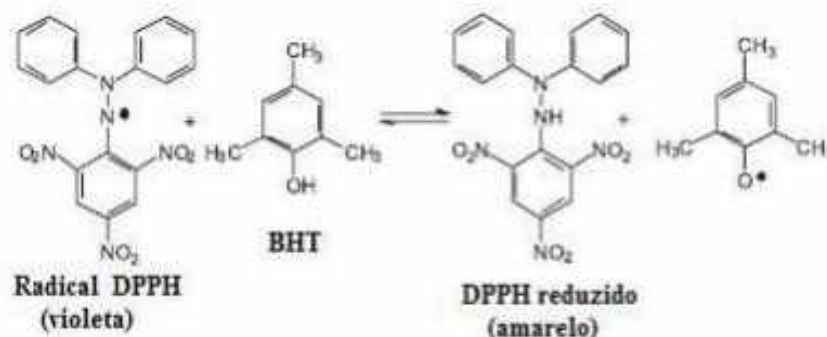
consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

3.4 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

3.4.1 Método do sequestro do radical livre DPPH

O método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) tem o intuito de descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, determinando o potencial antioxidante principalmente em compostos fenólicos individuais e alimentos. É um dos métodos mais utilizados para verificação da atividade antioxidante. A absorbância encontrada pela quantidade remanescente do radical DPPH depende e varia com os diferentes tipos e concentrações de antioxidantes (TIVERON, 2010). A Figura 3 ilustra a reação do radical DPPH com o antioxidante sintético BHT.

Figura 3 - Reação química entre o BHT e o radical DPPH



Fonte: Tiveron (2010).

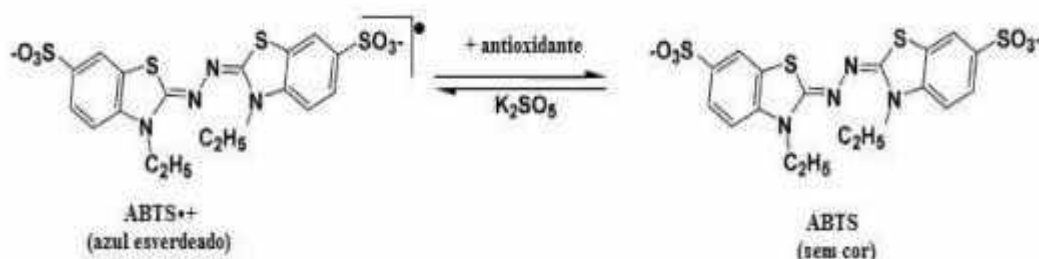
3.4.2 Método ABTS

O método do sequestro do radical ABTS 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) também é muito utilizado e simples de realizar. Assim como o radical DPPH, o ABTS apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, de acordo com Arnao (2000), esses radicais apresentam algumas diferenças, pois o radical DPPH• já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas e, é solúvel

tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. A cor esverdeada representa a formação do radical ABTS e essa cor ocorre devido a adição do persulfato de potássio (TIVERON, 2010).

Conforme o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional. O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ apresenta forte absorção no intervalo de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado espectrofotometricamente, sendo um radical estável na ausência de antioxidantes (TIVERON, 2010). A Figura 4 representa a reação citada.

Figura 4 - Redução do ABTS por um antioxidante e sua formação.



Fonte: Huang; Ou; Prior, (2005).

3.5 Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como uma classe de substâncias orgânicas aromáticas com pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel benzênico. São substâncias conhecidas também por fornecer proteção contra diversas doenças como doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral e certos tipos de cânceres (MIRANDA, 2010).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007).

Eles agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e possuem atividade antioxidante devido às suas propriedades de oxirredução. Ou seja, esses compostos interrompem a propagação da auto-oxidação em cadeia de radicais livres ao contribuir com a doação de um átomo de hidrogênio para a formação de um radical mais estável que não inicia

ou propaga o processo oxidativo (PINHEIRO; CARPES, 2012). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

A *A. annua*, apresenta alta capacidade antioxidante e a mesma está relacionada ao alto conteúdo de compostos fenólicos presentes (ROSTKOWSKA, 2012). Em vista disso, o efeito antioxidante devido aos anéis benzênicos é atribuído à presença de grupamentos hidroxilas em seus compostos fenólicos e, entre as classes de compostos químicos com essa atividade, podem-se destacar os polifenóis, flavonoides e taninos (MORAIS et al., 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Matéria Prima e extração

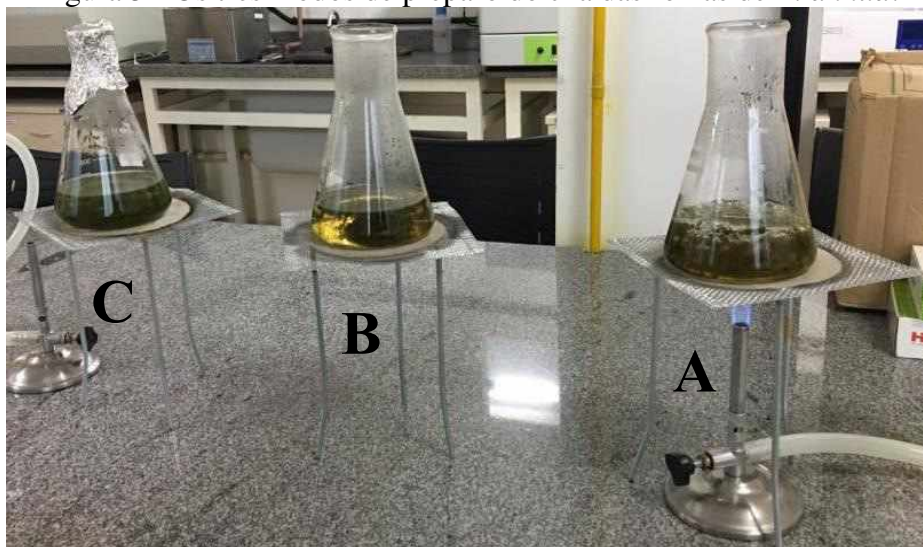
A matéria-prima vegetal, *A. annua* foi doada seca pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP).

Foram realizadas três formas de preparação do chá da *A. annua* como pode ser observado na Figura 5. Sendo que em cada modo de preparo, foi pesado 1 grama da planta a cada 200 mL de água.

A seguir, apresentam-se as formas de preparo:

- A.** As folhas foram fervidas em água por 10 minutos e deixadas em repouso a temperatura ambiente até a mistura esfriar. Posteriormente, a mesma foi filtrada para retirada das folhas.
- B.** Foi adicionada água fervente nas folhas secas. A mistura foi agitada e deixada em repouso em temperatura ambiente durante 10 minutos, sendo posteriormente filtrada para retirada das folhas.
- C.** Após a adição de água fervente nas folhas, a mistura foi agitada e o conteúdo coberto durante 10 minutos. Em seguida, foi filtrada para retirada das folhas.

Figura 5 - Os três modos de preparo do chá das folhas de *A. annua*.



Fonte: A autora.

Após a preparação das três formas de chás, foram realizados os testes de atividade antioxidante e análise do teor de compostos fenólicos.

4.2 Determinação da atividade antioxidante

4.2.1 DPPH

Após a obtenção das três formas de chás, foi preparado as concentrações para a utilização nos testes. O primeiro teste foi a avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), realizada de acordo com a metodologia de Lopes-Lutz et al. (2008) seguida de pequenas modificações. As concentrações utilizadas foram de 5000, 1000, 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a diluição da primeira concentração foi utilizado 1 mL do chá, junto com 4 mL de água em tubos de ensaio (diluição de 5000 para 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para as outras duas concentrações foram utilizadas 1 mL de chá e 1 mL de água. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e adicionadas em tubos de ensaio.

Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição do extrato aquoso dos três tipos de preparo dos chás de *A. annua* (5000, 1000, 500, 250 e 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em paralelo, foi preparado também em um tubo de ensaio, o branco para retirada da cor e o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Para a comparação das atividades o padrão BHT foi avaliado nas mesmas concentrações citadas acima. Após 60 minutos deixados no escuro, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte Equação (1):

$$AA\% = \left[\frac{(A_{CN} - A_{amo})}{A_{CN}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Em que:

AA % = Porcentagem de atividade antioxidante.

A_{amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

4.2.2 ABTS

O segundo teste realizado foi do radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), de acordo com Antunes et al. (2010). Para o ensaio foram misturados 10 μL do extrato aquoso dos três tipos de preparo dos chás de *A. annua* (5000, 1000, 500, 250 e 0 μg

mL^{-1}) e 990 μL da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. As amostras foram deixadas no escuro durante 6 minutos e após esse tempo, a absorbância foi monitorizada espectrofotometricamente a 735 nm. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ atuou como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte Equação (2):

$$AA\% = \left[\frac{(A_{CN} - A_{Am})}{A_{CN}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Em que:

$AA\%$ = Porcentagem de atividade antioxidante.

A_{CN} = Absorbância do controle negativo

A_{Am} = Absorbância da amostra

Os valores foram comparados com uma curva para várias concentrações do padrão BHT (5000, 1000, 500, 250 e 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.3 Determinação dos 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 da amostra diluída (2,5; 1,25 e 0,625 g L^{-1}) com 2,5 mL de 0,2 mol L^{-1} do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L^{-1}) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (16,125; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.4 Análise Estatística

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (3 x 5), sendo 3 (3 métodos de preparo do chá) e 5 concentrações (5000, 1000, 500, 250 e 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 3 repetições. Já

para o teor de fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (3 x 3), sendo 3 (3 métodos de preparo do chá) e 3 concentrações (2,5; 1,25 e 0,625 g L⁻¹), com 3 repetições. 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 em relação às concentrações analisadas (DPPH e ABTS). 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 (mg GAE) por grama de peso seco de material vegetal. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do teste do Radical livre DPPH

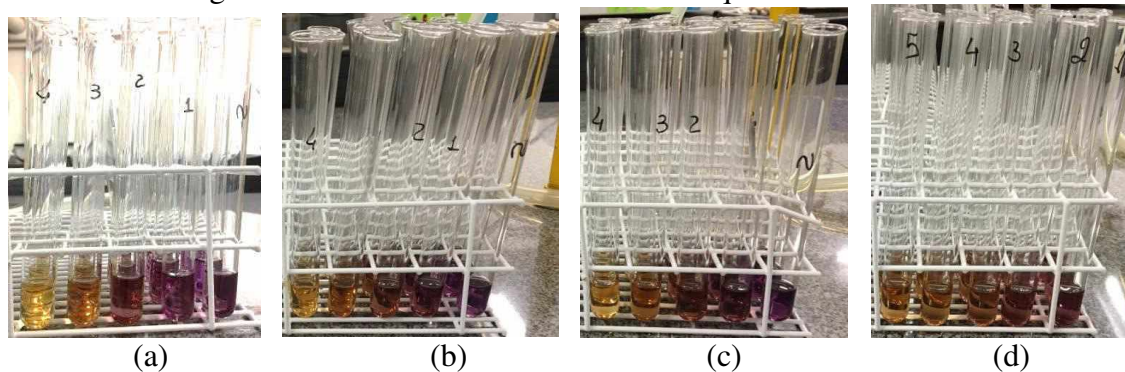
Nota-se através dos resultados que fatores como a polaridade do solvente, tempo, temperatura e agitação, utilizados no preparo dos extratos, influenciam na extração das substâncias bioativas dos vegetais, de forma que os extratos preparados a partir de diferentes modos de preparo, mesmo sendo da mesma espécie vegetal, podem apresentar atividade antioxidante diferentes como verificado através dos testes realizados.

Após o tempo determinado de reação das amostras no teste de DPPH, pode-se notar a diferença de coloração entre as concentrações utilizadas e em cada modo de preparo. Na Figura 6 é mostrado o resultado da reação nos quatro tratamentos, onde em cada teste, os tubos de ensaio estão ordenados da direita para esquerda de forma crescente de concentração, ou seja, da menor concentração para maior.

Sendo observado na (Figura 6 a), o teste da amostra utilizando o preparo fervente, na (Figura 6 b), utilizando o preparo tampado, na (Figura 6 c), o preparo sem tampar e na (Figura 6 d) o preparo com o antioxidante sintético BHT.

Em todas as amostras, notou-se que na menor concentração a solução apresentou uma coloração roxa e com a maior concentração a solução apresentou uma cor amarelada. Isso se deve a redução do DPPH na solução, onde o antioxidante doa um hidrogênio (oxida) para o composto DPPH (reduz). Sendo assim quanto maior a concentração, mais clara é a coloração da solução (amarelada) e quanto menor a concentração, mais escura é a coloração da solução.

Figura 6 – Análise do método DPPH dos quatro tratamentos.

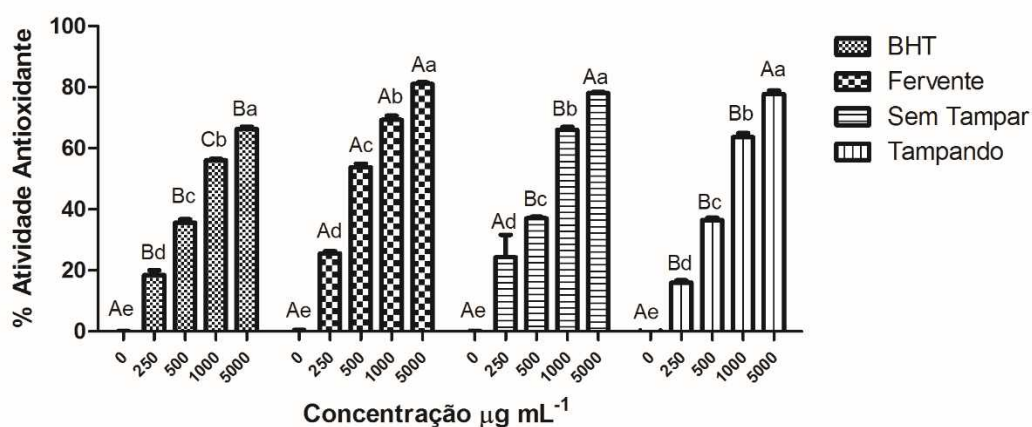


Fonte: A autora.

Observa-se no teste DPPH realizado, que os modos de preparo testados são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Pode-se notar que as três amostras apresentaram

porcentagem de atividade antioxidante maior que a porcentagem antioxidante utilizando o BHT em algumas concentrações utilizadas. Através dos dados apresentados (Figura 7), verificou-se que, dentro de cada tratamento, os resultados apresentaram uma atividade dose-dependente, onde a porcentagem de atividade antioxidante é dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a porcentagem de antioxidante nas quatro amostras, sendo a maior concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, depois 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a menor porcentagem foi com a concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Verificou-se que a amostra fervente foi o tratamento que apresentou maior atividade antioxidante em todas as concentrações utilizadas.

Figura 7 - Atividade antioxidante do teste do radical livre DPPH



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre as amostras (três modos de preparo ou BHT) e minúsculas para comparar a concentração dentro das amostras (três modos de preparo ou BHT), não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: A autora.

Melo et al. (2008), em seu estudo da capacidade antioxidante das frutas, verificou também que extratos aquosos de frutas como da acerola, mamão Formosa, caju e mamão Havaí exibiram uma porcentagem de sequestro do radical acima de 70%. Essas amostras foram classificadas como frutas com forte capacidade antioxidante, superiores a porcentagem antioxidante do padrão BHT. Resultados esses similares ao presente estudo, onde o percentual também foi acima de 70 % para concentrações de 5000 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e esses foram superiores ao BHT.

De acordo com Ferrari (2013), o resultado do seu estudo de atividade antioxidante do extrato etanólico de *Quassia amara*, em comparação ao antioxidante comercial BHT, demonstra o potencial uso dessa planta na substituição desse produto. O mesmo pode ser verificado no presente trabalho, onde a atividade antioxidante da *A. annua*, no teste do radical

livre DPPH foi superior ao antioxidante BHT, demonstrando um potencial na substituição dos antioxidantes sintéticos.

Corroborando com o trabalho Sousa et al. (2007), analisaram a atividade antioxidante pelo método DPPH de cinco espécies de plantas e verificaram que com o aumento da concentração houve um aumento na atividade antioxidante. Da mesma forma Silva (2014), estudou a porcentagem da atividade antioxidante da *Raphanus sativu*, utilizando as concentrações de 250, 500, 1000 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pode-se observar que os resultados da porcentagem da atividade antioxidante aumentaram com o aumento das concentrações, sendo que na concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obteve-se a maior porcentagem de atividade antioxidante (59,37%), similarmente ao resultado do presente trabalho (81,02 % - Modo de preparo – A – Fervente).

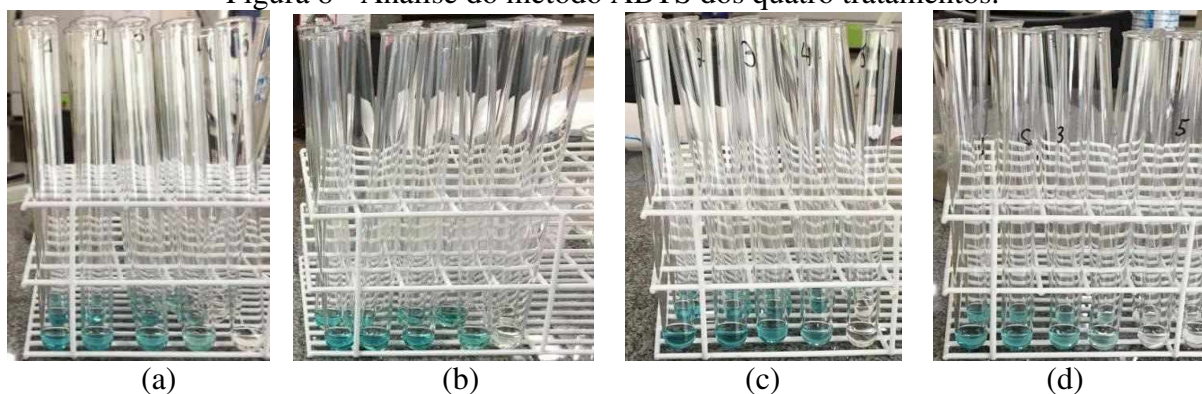
5.2 Análise do teste utilizando o método ABTS

Abaixo segue as imagens do teste ABTS realizado nas diferentes concentrações e nos diferentes modos de preparo. A Figura 8 representa o resultado da reação nos quatro tratamentos, onde em cada teste, os tubos de ensaio estão ordenados da esquerda para direita de forma crescente de concentração, ou seja, da menor concentração para maior.

Sendo observado na (Figura 8 a), o teste da amostra utilizando o preparo fervente, na (Figura 8 b), utilizando o preparo tampado, na (Figura 8 c), o preparo sem tampar e na (Figura 8 d) o preparo com o antioxidante sintético BHT.

Em todos os tratamentos foi verificado que com uma menor concentração a amostra estava com a coloração azul mais forte e essa cor é devido a reação exemplificada por Huang; Ou; Prior, (2005), onde o antioxidante doa hidrogênio (oxidando) e o radical ABTS recebe esse hidrogênio (reduzindo). Sendo assim quanto maior a concentração mais clara é a coloração da solução e quanto menor a concentração mais escura é a coloração da solução.

Figura 8 - Análise do método ABTS dos quatro tratamentos.

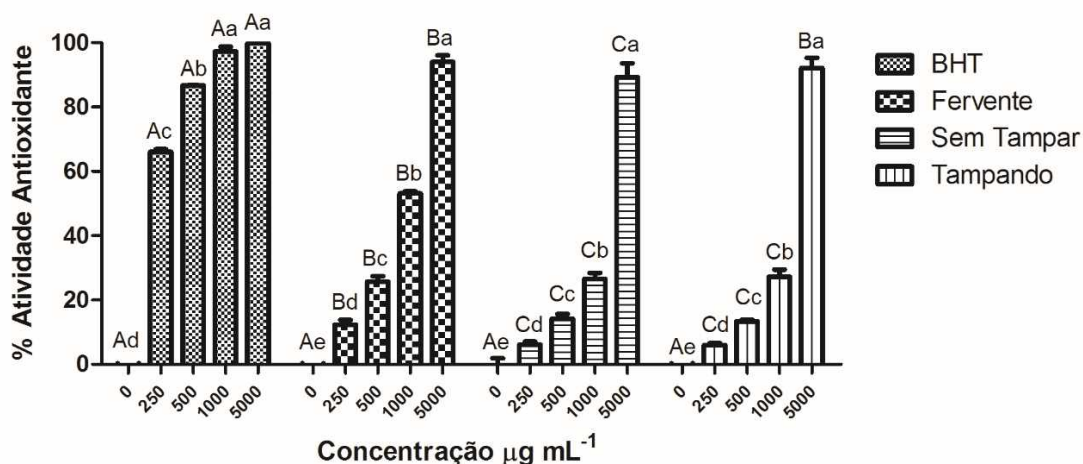


Fonte: A autora.

No gráfico representado na Figura 9, observa-se que nas três amostras, A (fervente), B (sem tampar) e C (tampando), a porcentagem de atividade antioxidante foi maior conforme superior foi a concentração, mostrando assim um efeito dose-dependente. Entretanto, na amostra utilizando o antioxidante sintético BHT as concentrações de 5000 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram valores estatisticamente iguais e maiores quando comparados com as outras duas concentrações (250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) utilizadas.

Verificou-se que a atividade antioxidante do padrão sintético BHT, foi a que obteve em todas as concentrações (250, 500, 1000, 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as maiores porcentagens de atividade antioxidante respectivamente (66,07; 86,72; 97,26; 99,76%) e isso pode ser justificado devido a seletividade do método como foi citado por Arnao (2000). Já entre as três amostras, A (fervente), B (sem tampar) e C (tampando) observou-se da mesma forma que no teste do DPPH que a amostra fervente foi a que obteve os maiores resultados de atividade antioxidante entre os três tratamentos.

Figura 9 - Atividade antioxidante pelo método de ABTS.



Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre as amostras (três modos de preparo ou BHT) e minúsculas para comparar a concentração dentro das amostras (três modos de preparo ou BHT), não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: A autora.

Floegel et al. (2011), avaliaram a capacidade antioxidante de algumas frutas, vegetais e bebidas pelo método ABTS e DPPH onde pode ser verificado que nas três variedades testadas, o percentual de atividade antioxidante pelo método ABTS foi maior do que o do método de DPPH. Isso também foi verificado no presente trabalho, onde as porcentagens pelo método do ABTS nos três tipos de preparo, A, C e B na concentração de 5000 µg mL⁻¹ foram superiores as porcentagens do método de radical livre DPPH e também quando foi utilizado o antioxidante sintético BHT. Isso pode ser devido a diversos fatores como, diferentes radicais utilizados, tempo de reação em cada método, entre outros fatores intrínsecos de cada método.

De acordo com Oliveira (2014), os resultados antioxidantes mostraram que o extrato das folhas da *Copernicia prunifera* tem uma capacidade antioxidante elevada frente aos radicais DPPH• e ABTS•+. Ambos os métodos se baseiam na redução ou perda da absorbância da solução alcoólica de DPPH• e ABTS•+. E essa alta capacidade antioxidante pode ser observada também no extrato das folhas da *A. annua*, pelos mesmos dois métodos.

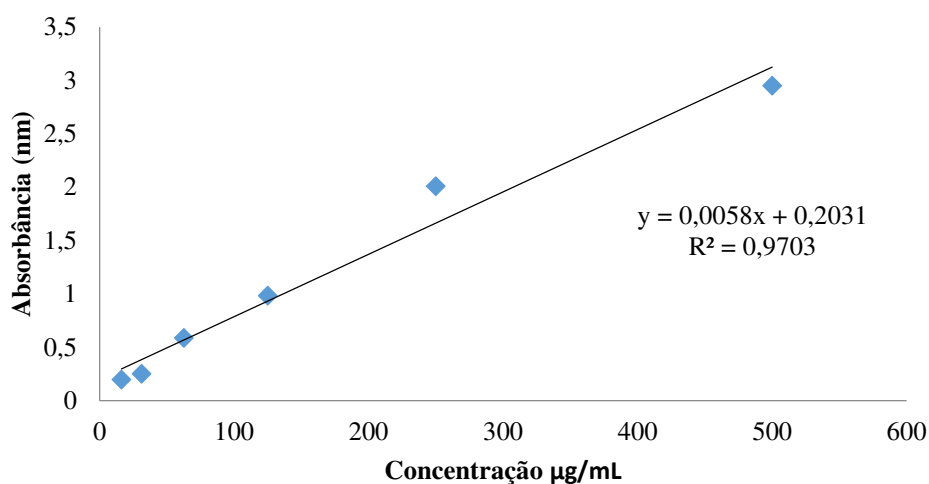
5.3 Análise do teste de fenólicos totais do chá

O método de Folin-Ciocalteu, utilizado para a determinação dos compostos fenólicos é também um método de determinação da capacidade antioxidante, baseado nas propriedades redox das substâncias. Assim, os valores da concentração dos compostos fenólicos expressam a capacidade antioxidante da amostra em estudo, confirmando uma correlação altamente

significativa entre o valor do método de Folin-Ciocalteu, o método DPPH e ABTS (OLIVEIRA, 2014).

O teor de fenólicos totais foi determinado pelos valores da absorbância das amostras e por uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico, representada na Figura 10, cuja equação da reta foi utilizada para o cálculo da quantidade de compostos fenólicos nos extratos. O coeficiente de correlação foi de $R = 0,9703$, sendo similar ao coeficiente de correlação de Sousa et al. (2007), o qual foi de $R = 0,999$. O autor citado realizou o teste para determinar o teor de compostos fenólicos de 5 espécies de plantas.

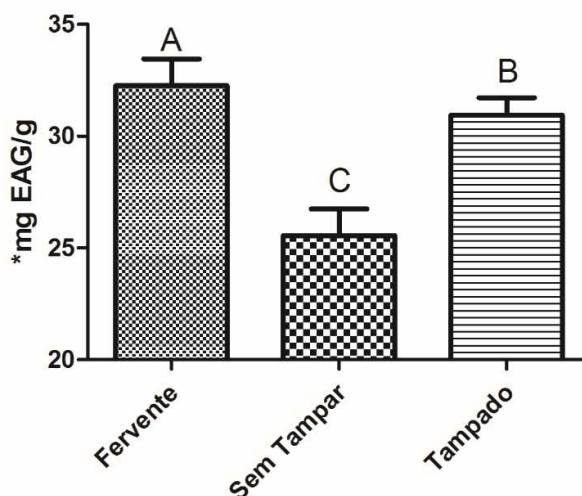
Figura 10 - Gráfico da curva da concentração de ácido gálico pela absorbância.



Fonte: A autora.

Na Figura 11, observa-se que estatisticamente os modos de preparo diferem um do outro, ou seja, houve diferença significativa entre o teor de compostos fenólicos presentes nos três modos de preparo do chá de *A. annua*. O modo de preparo A (fervente), foi o que obteve o maior valor, seguido do preparo C (tampado) e depois do preparo B (sem tampar).

Figura 11 - Teste de fenólicos totais utilizando os três tipos de preparo de *Artemisia annua*.



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

Fonte: A autora.

A correlação entre os métodos de Folin-Ciocalteu e o método do radical livre DPPH, foi observado no presente trabalho e no estudo de Quintão et al. (2013). Os resultados obtidos desse autor corroboram com os obtidos no presente trabalho, os quais mostram uma relação positiva entre o conteúdo fenólico total e o teste de DPPH de extratos de plantas. No estudo, o maior conteúdo fenólico total de extratos de plantas resultou em maior atividade antioxidante.

Sousa et al. (2007), obtiveram resultados similares ao presente estudo, onde ao realizar o teste de fenólicos totais na planta *Terminalia brasiliensis*, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, o valor encontrado foi de 38,53 mg de EAG/ g de material vegetal seco, enquanto que o teste de fenólicos com a folha de *A. annua*, utilizando o modo de preparo A (fervente), foi de 33,16 mg EAG/g de chá.

Asolini; Tedesco; Carpes (2006), estudaram o teor de compostos fenólicos dos extratos etanólicos de chás de diferentes espécies de plantas. O teste realizado pelos extratos de *Sálvia* e *Camomila*, resultaram em aproximadamente 25 mg EAG/g de folha seca. Esse valor de equivalência encontrado pelos autores corrobora com o valor encontrado no teste de fenólicos realizado com o modo de preparo B (sem tampar) do chá de *A. annua*, que foi um valor médio de 25,55 mg EAG/g de chá.

Cai et al. (2004), analisaram o conteúdo de fenólicos totais de 112 espécies de plantas da tradicional medicina Chinesa associada com a atividade anticâncer. Uma dessas plantas analisadas foi a *A. annua*, a qual apresentou valor de compostos fenólicos totais de extrato aquoso e metanólico respectivamente 34,4 e 35,1 mg EAG /100g de peso seco. Resultados esses

que corroboram com os valores analisados de fenólicos da mesma planta no presente trabalho, os quais apresentaram valores de EAG similares aos valores do extrato aquoso do autor citado, sendo esses para a amostra fervente (32,26 mg EAG/g chá), amostra sem tampar (25,55 mg EAG/g chá) e amostra tampado (30,94 mg EAG/g chá).

6 CONCLUSÃO

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante significativa contra os radicais ABTS e DPPH. A análise antioxidante demonstrou que o extrato da *A. annua* tem uma capacidade elevada de reduzir os radicais DPPH e ABTS, demonstrando ação antioxidante natural. Com isso, foi evidenciado que houve diferença significativa entre os três modos de preparo, demonstrando influência desses nos resultados obtidos.

Por meio dos métodos DPPH e ABTS, observou-se que todas as amostras do chá de *A. annua* e o padrão BHT apresentaram uma atividade dose-dependente, ou seja, a medida em que aumentou a concentração a atividade antioxidante aumentou. Dessa forma, nota-se que quanto maior a concentração de compostos fenólicos, maior é a capacidade antioxidante. Observou-se também que nos dois métodos antioxidantes a amostra A (fervente) teve maior atividade. Este resultado pode ser devido aos maiores valores de compostos fenólicos obtidos pelo mesmo tratamento por meio do método de Folin-Ciocalteu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, M.D.C. et al. Effects of postharvest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v.58, p. 6173–6181, 2010.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2004. 478 p., il., 23 cm. Inclui apêndices e índice. ISBN: 85-7269-044-1.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food & Technology**, London, v.11, n. 11, p.419-421, 2000.

ASOLINI, S. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of food technology**. V.9, n.3, p. 209-215, jul./set., 2006.

BADKE et al. **Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular**. Jan-mar; p.: 132-139, 2011.

BHAKUNI, R. S. et al. **Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity**. Current Science, Bangalore. v. 80, n. 1, p. 35- 48, 2001.

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, ago. 1999.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim. Nova**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Vol. 33, No. 1, p. 229-239, 2010.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**. p. 2157–2184, 2004.

CONDORI, S. Q. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenacea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare***. 2005. 239 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Unicamp-Campinas, 2005.

CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo, 2014.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DURÁN, R.M.; PADILLA, B. **Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos**. Grasas y Aceite, Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

EFFERTH, T. **From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy**. Seminars in Cancer Biology. p. 19, 2017.

FERRARI, A. P. **Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Produção Vegetal, Pato Branco, 2013.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 1043–1048, 2011.

HSU, E. Reflections on the ‘discovery’ of the antimalarial *qinghao*. **British Journal of Clinical Pharmacology**. p. 666–670, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.53, p.1841-1856, 2005.

JANKUN, J.; SELMAN, S. H.; SWIERCZ, R. Why drinking tea could prevent cancer. **Nature**, p.387-561, 1997.

LANS, C. et al. **Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia**, Canadá Veterinary Parasitology, v.148, n. 3-4, p. 325-340, Set. 2007.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Plantarum, 2008.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGANOLO, N. Antioxidantes naturais da família *Lamiaceae* - Aplicação em produtos alimentícios. **Braz J Food Technol**, p. 96-103, 2007.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. Pós- Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Lavras, 2010.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 315-320, Jan./Mar. 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. et al. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. p. 293-300, 2014.

PINHEIRO, R. S.; CARPES, S. T. **Caracterização fenólica, atividade antioxidante *in vitro* de Artemisia (Artemisia annua L.) e Sálvia (Salvia officinalis).** Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, 2012.

PROTA, A. **Artemisia Annua: una speranza per i cani malati di tumore.** Fev. 2015. <<http://www.cani.com/salute-e-benessere/veterinaria/artemisia-annua-una-speranza-i-cani-malati-di-tumore>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

QUINTÃO, F. J. O. et al. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, p. 101-107, Jan./Feb. 2013.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n. 4, p.755-760, 2006.

RÄTH, K. et al. **Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of Artemisia annua L. (Annual wormwood).** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. p. 128–132, 2004.

ROSTKOWSKA, C. **Efeito da infusão de Artemisia annua cultivada em solo com aplicação de silicato de cálcio e magnésio sobre o controle de Toxoplasma gondii in vitro.** Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Uberlândia, 2012.

SILVA, L. F. R. **Susceptibilidade in vitro de isolados de campo de Plasmodium Falciparum a infusão (chá) de Artemisia annua cultivada na região Amazônica.** 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2009.

SILVA, R. M. G. et al. **Phytotoxicity of ethanolic extract of turnip leaves (Raphanus sativus L.).** Biosci. J., Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 891-902, May/June, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents.** Am. J. Enol. Vitic, p. 144-158, 1965.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUZA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais.** 2013. 31 f. Trabalho de conclusão de curso do curso de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Campo Mourão, 2013.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil.** 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Piracicaba, 2010.

WILLCOX, M. et al. *Artemisia annua* as a herbal tea for malaria. **The African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 121-123, 2007.