

Atividade antioxidante de extratos de plantas amazônicas: Um estudo comparativo

Antioxidant activity of amazonian plant extracts: A comparative study

T. S. Almeida¹; E. A. M. Mendonça²; N. N. N. Alves^{1,3}; L. V. Oliveira¹;
J. A. M. Evaristo¹; F. B. Zanchi²; G. P. C. Evaristo¹

¹Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicados à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz –RO, 76801-059, Porto Velho, Rondônia, Brasil

²Laboratório de Bioinformática e Química Medicinal (LABIOQUIM), Fundação Oswaldo Cruz –RO, 76801-059, Porto Velho, Rondônia, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Uso de Recursos Naturais (PPGREN), Universidade Federal de Rondônia, 76801-059, Porto Velho, Rondônia, Brasil

*thiagosilva.almeida@fiocruz.br

(Recebido em 06 de fevereiro de 2026; aceito em 19 de junho de 2026)

A região amazônica abriga uma das maiores biodiversidades vegetais do planeta, incluindo espécies com potencial bioativo ainda pouco explorado. Este estudo avaliou a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de extratos de plantas amazônicas. Foram analisados o extrato metanólico da casca do caule de *Bertholletia excelsa* (castanha-da-Amazônia), o extrato aquoso das folhas de *Capirona macrophylla* (mulateiro) e o óleo-resina de *Copaifera* sp. (copaíba). O extrato de mulateiro também foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de inibição do radical DPPH, expressa em porcentagem de inibição e valores de IC₅₀, com análise estatística por regressão linear e não linear. Todas as espécies apresentaram atividade antioxidante mensurável, sendo o mulateiro o mais potente (IC₅₀ = 12,996 e 11,79 µg/mL), seguido da castanha-da-Amazônia (27,022 e 32,13 µg/mL) e da copaíba (82,71 e 33,61 *10³ µg/mL). O fracionamento do extrato de mulateiro revelou frações com desempenho igual ou superior ao extrato bruto. A comparação entre os modelos estatísticos demonstrou que, embora ambos sejam aplicáveis, a regressão não linear apresentou melhor ajuste aos dados, descrevendo com maior precisão o comportamento sigmoide característico das reações de inibição. Os resultados foram promissores, evidenciando o potencial das espécies e a viabilidade do método DPPH para diferentes tipos de amostras, com boa confiabilidade estatística. Espera-se que o detalhamento metodológico contribua para a reprodutibilidade dos ensaios e facilite estudos futuros semelhantes.

Palavras-chave: *Capirona macrophylla*, *Bertholletia excelsa*, *Copaifera* sp.

The Amazon region is home to one of the planet's greatest plant biodiversities, including species with bioactive potential that remains largely unexplored. This study assessed the antioxidant activity of extracts from Amazonian plants using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) radical method. The following were analysed: the methanolic extract of the stem bark of *Bertholletia excelsa* (Brazil nut), the aqueous extract of the leaves of *Capirona macrophylla* (mulateiro) and the resin oil of *Copaifera* sp. (copaiba). The mulateiro extract was also fractionated by high-performance liquid chromatography (HPLC). The samples were evaluated for their ability to inhibit the DPPH radical, expressed as a percentage of inhibition and IC₅₀ values, with statistical analysis using linear and non-linear regression. All species exhibited measurable antioxidant activity, with mulateiro being the most potent (IC₅₀ = 12.996 and 11.79 µg/mL), followed by Amazonian nut (27.022 and 32.13 µg/mL) and copaiba (82.71 and 33.61 × 10³ µg/mL). Fractionation of the mulateiro extract revealed fractions with performance equal to or superior to that of the crude extract. Comparison between the statistical models demonstrated that, although both are applicable, non-linear regression provided a better fit to the data, describing with greater precision the characteristic sigmoid behaviour of the inhibition reactions. The results were promising, highlighting the potential of the species and the viability of the DPPH method for different types of samples, with good statistical reliability. It is hoped that the methodological details will contribute to the reproducibility of the assays and facilitate similar future studies.

Keywords: *Capirona macrophylla*, *Bertholletia excelsa*, *Copaifera* sp.

1. INTRODUÇÃO

A região amazônica abriga uma das maiores biodiversidades do planeta, constituindo-se em um vasto reservatório de espécies vegetais com potencial medicinal, ainda pouco explorado cientificamente. Esta floresta tropical contém aproximadamente 16.000 espécies de árvores e 50.000 espécies de plantas superiores sendo que menos de 1% foram adequadamente estudadas quanto às suas propriedades bioativas [1-3]. Entre as diversas propriedades destas plantas destaca-se a capacidade antioxidante, essencial para o combate aos radicais livres e ao estresse oxidativo, fatores associados a diversas patologias degenerativas, e ao envelhecimento celular [4].

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, destacando-se por sua simplicidade, rapidez e confiabilidade. Esta metodologia, baseia-se na capacidade dos antioxidantes em reduzirem o radical DPPH, que apresenta coloração violeta em solução, para uma forma não-radicalar amarelada/incolor, permitindo uma quantificação espectrofotométrica desta redução [5]. A variação da absorbância em aproximadamente 517 nm permite calcular a porcentagem de inibição e, consequentemente, determinar a concentração de inibição (IC_{50}), definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% os radicais livres presentes no meio reacional [6].

Espécies nativas da Amazônia, como a castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa*) e a copaíba (*Copaifera* spp.), destacam-se pelo elevado teor de compostos bioativos, os quais estão associados a diversas atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes [7, 8]. Para *Bertholletia excelsa*, estudos relatam a presença, em diferentes partes da planta, de compostos fenólicos como o ácido gálico, galocatequina, ácido protocatecuico, catequina, ácido vanílico, taxifolina, miricetina, ácido elágico e quercetina, que apresentam reconhecido potencial antioxidante e funcional [7]. Por sua vez, espécies do gênero *Copaifera* apresentam elevada concentração de diterpenos e sesquiterpenos, compostos amplamente associados a atividades biológicas, como ação anti-inflamatória e cicatrizante [8]. Adicionalmente, investigações recentes envolvendo espécies amazônicas menos exploradas, como o mulateiro (*Capirona macrophylla*), têm demonstrado a presença de metabólitos secundários com potencial atividade antioxidante e outras propriedades biológicas relevantes, ampliando o interesse científico e o potencial de aplicação dessas espécies [9].

A biodiversidade amazônica representa não apenas um patrimônio natural a ser preservado, mas também uma fonte potencial de novos compostos bioativos com aplicações farmacêuticas e nutraceuticas. A aplicação de métodos de referência para avaliação da atividade antioxidante, como o ensaio de DPPH, associados a técnicas cromatográficas e espectrométricas avançadas têm permitido identificar e isolar compostos com propriedades antioxidantes superiores aos seus equivalentes sintéticos. Essa abordagem contribui significativamente para a valorização sustentável da flora amazônica e para o desenvolvimento de novos fármacos, derivados dessas matrizes vegetais naturais [10].

Este trabalho tem como objetivo descrever, de forma clara e reprodutível, a metodologia do ensaio de DPPH, demonstrando sua aplicação na avaliação de produtos naturais obtidos da biodiversidade amazônica, como *Bertholletia excelsa*, *Capirona macrophylla* e *Copaifera* spp., na forma de extratos, frações e óleos, bem como detalhar o processamento e a análise dos resultados obtidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Ácido gálico e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e o metanol P.A. da Tedia Company (Fairfield, Ohio, EUA).

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

2.2.1. Castanha-da-Amazônia- *Bertholletia excelsa*

Foram coletadas amostras da casca do caule de *B. excelsa* a partir de exemplar localizado no Campo Experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Porto Velho, Rondônia - Brasil. Uma exsicata do material botânico foi depositada no Herbário Rondoniense João Geraldo Kuhlmann, da Universidade Federal de Rondônia, sendo identificado pelo botânico Adelciano Alves Soares e registrado sob o código RON18708. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o código A29CF67. O processo de obtenção de extratos, e realização de ensaios de DPPH foram desenvolvidos no Centro de Biomoléculas aplicadas à Saúde (CEBio), da Fiocruz Rondônia, localizado na Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

A amostra da casca do caule foi desidratada em estufa, com circulação de ar forçada, a 40 °C por 72 h, triturada e 50 g do pó seco foi submetido a extrações sucessivas com 1000 mL de metanol puro. As amostras foram então filtradas e, a cada 24 h, o solvente foi renovado, por um período de três dias consecutivos. Os extratos metanólicos foram concentrados em equipamento *SpeedVac*TM (Waltham, Massachusetts, EUA), para evaporação do solvente, sob temperatura de 25 °C. O extrato seco resultante foi pesado, para obtenção do valor de rendimento, devidamente protegido da luminosidade, e armazenado sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises, adaptado de Kedir et al. (2024) [11].

2.2.2. Mulateiro - *Capirona macrophylla*

Foram coletadas amostras das folhas de *C. macrophylla* a partir de exemplar localizado nas coordenadas 8°51'56,4" S e 63°45'26" W, na cidade de Porto Velho/Rondônia/Br. Uma exsicata do material botânico foi depositada no Herbário Rondoniense João Geraldo Kuhlmann, sendo identificado pelo botânico Adelciano Alves Soares registrado sob o código RON22537. O SisGen registrado com o código A5E7ED4, e o processamento da amostra foi realizado no CEBio.

As folhas foram higienizadas em solução de hipoclorito de sódio (0,1%). Após essa etapa, foram desidratadas em estufa, com circulação de ar forçada, na temperatura de 40 °C por 72 h. O material seco foi pulverizado com auxílio de moinho de facas e, 10 gramas foram submetidos à extração aquosa por decocção (1:15 massa:volume 3X) a 80 °C por 20 min, sob agitação. Em seguida, o extrato foi tratado em banho ultrassônico por 60 min e filtrado a vácuo. Os filtrados foram congelados e liofilizados. O extrato seco resultante foi pesado, para obtenção do valor de rendimento, devidamente protegido da luminosidade, e armazenado sob refrigeração (4 °C) [9].

2.2.3. Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

O extrato bruto de mulateiro, preparado conforme descrito anteriormente, foi ressuspenso em solução metanólica a 10% para obtenção da concentração de 100 mg/mL. Para evitar a presença de quaisquer partículas que eventualmente não tenha sido solubilizada, a solução foi centrifugada a 5000 × g, a 20 °C, por 15 min. Em seguida, 1 mL da solução foi injetada para fracionamento em CLAE (Shimadzu 20A/AD), utilizando coluna de fase reversa C18 (Phenomenex Jupiter, 250 × 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula e 300 Å de porosidade).

Para a análise cromatográfica, a fase móvel A consistiu em solução aquosa de ácido acético a 0,1%, enquanto a fase móvel B consistiu em metanol contendo 0,1% de ácido acético. O modo gradiente de eluição foi programado da seguinte forma: 10% de B em 0 min; mantido em 10% de B até 1 min; seguido de gradiente linear até 100% de B em 60 min. O volume de injeção foi de 1 mL, com fluxo de 5 mL/min. As frações foram coletadas a cada minuto de corrida cromatográfica, totalizando 60 frações por fracionamento.

O processo foi realizado cinco vezes, e as frações correspondentes de cada corrida foram reunidas e concentradas em concentrador a vácuo (SpeedVac, Labconco®) para evaporação do solvente, sob temperatura de 25 °C. As frações obtidas foram devidamente protegidas da luz e armazenadas sob refrigeração (4 °C) [9].

2.2.4 Óleo-resina de copaíba

O óleo-resina de copaíba foi obtido por doação durante visita em comunidade extrativista localizada no estado de Rondônia – Brasil. O material foi coletado de forma tradicional pelos próprios extrativistas, seguindo os métodos usuais de extração do óleo-resina: com furo diretamente do tronco das árvores do gênero *Copaifera*. Após a coleta, o óleo foi acondicionado em frascos de vidro âmbar, devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente até sua utilização nas análises laboratoriais. O SisGen foi cadastrado sob o código AEE1701.

2.3. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando o método fotolorimétrico do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), descrito por Mensor et al. (2001) [12] e Polez et al. (2023) [13].

2.3.1. Preparo das soluções

A solução de DPPH 0,1 mM foi preparada dissolvendo-se 1,97 mg de DPPH (MM: 394,32 g/mol) em solvente alcoólico (podendo ser utilizado etanol ou metanol) completando-se o volume para 50 mL em balão volumétrico.

Os produtos naturais (extratos, frações e óleo) obtidos das três espécies castanha-da-Amazônia, mulateiro e copaíba, foram inicialmente solubilizados em solvente alcoólico para obtenção de uma solução-estoque a 10 mg/mL. A partir desta, foi preparada uma solução de uso a 1 mg/mL, diluindo-se 100 µL da solução-estoque em 900 µL de solvente alcoólico. Em seguida, realizou-se diluições seriadas para obtenção de oito concentrações decrescentes (250 a 1,95 µg/mL) como descrito na sequência abaixo e esquematizado na Figura 1. O controle positivo utilizando o ácido gálico foi preparado da mesma forma:

- Solução estoque (10 mg/mL) = 10 mg de extrato + 1000 µL de etanol;
- Solução de uso (1 mg/mL) = 100 µL da solução estoque + 900 µL de etanol;
- Solução A (250 µg/mL) = 250 µL da solução de uso + 750 µL de etanol;
- Solução B (125 µg/mL) = 500 µL da solução A + 500 µL de etanol;
- Solução C (62,5 µg/mL) = 500 µL da solução B + 500 µL de etanol;
- Solução D (31,25 µg/mL) = 500 µL da solução C + 500 µL de etanol;
- Solução E (15,625 µg/mL) = 500 µL da solução D + 500 µL de etanol;
- Solução F (7,813 µg/mL) = 500 µL da solução E + 500 µL de etanol;
- Solução G (3,906 µg/mL) = 500 µL da solução F + 500 µL de etanol;
- Solução H (1,953 µg/mL) = 500 µL da solução G + 500 µL de etanol.

O ensaio foi acompanhado com os seguintes controles: um branco do reagente (apenas solvente), branco das amostras (solvente + amostra diluída), controle negativo (DPPH + solvente) e controle positivo (DPPH + ácido gálico), utilizado este último nas mesmas concentrações das amostras teste.

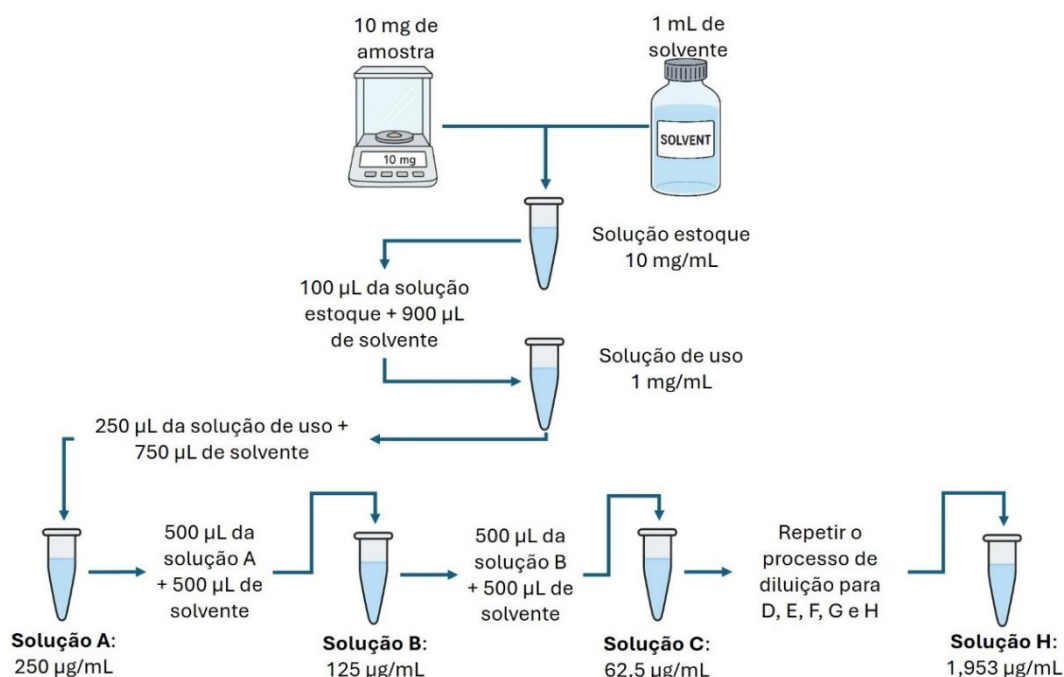


Figura 1: Fluxograma de preparo de soluções de amostras para realização do ensaio DPPH. Como solvente pode ser utilizado etanol (biodegradável) ou metanol (baixo custo).

2.3.2. Preparo da placa de microdiluição

Em uma placa de 96 poços foram pipetados 100 µL de cada solução das amostras (A – H) em triplicata, seguido da adição de 100 µL da solução de DPPH 0,1 mM. As concentrações finais das amostras corresponderão às dispostas na Tabela 1. Foram estabelecidos os seguintes controles e brancos: Controle positivo - poços contendo 100 µL da solução de ácido gálico (nas concentrações iguais das amostras A – H) e 100 µL da solução de DPPH. Controle negativo - poços contendo 100 µL do solvente e 100 µL de solução de DPPH 0,1 mM. Branco das amostras - 100 µL de cada extrato (A – H) com 100 µL do solvente, para corrigir a cor das amostras. Branco do reagente - um poço contendo 200 µL de solvente. A sequência de preparo das amostras e controles pode ser visualizada na Figura 2.

Tabela 1: Concentração das amostras no ensaio de DPPH. As Concentrações iniciais referem-se à concentração no poço após a adição de 100 µL das amostras diluídas (1 mg/mL). A concentração final refere-se à concentração após a adição de 100 µL de solução DPPH (concentração inicial).

Solução	Concentração inicial (µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
A	250	125
B	125	62,5
C	62,5	31,25
D	31,25	15,625
E	15,625	7,8125
F	7,8125	3,90625
G	3,90625	1,953125
H	1,953125	0,9765625

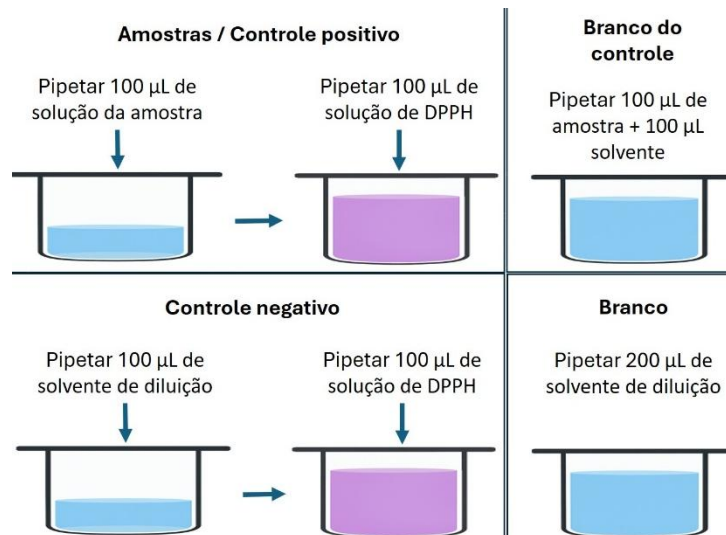


Figura 2: Esquema de sequência de soluções aplicadas aos poços da placa microdiluição para as amostras e controles.

Na organização da disposição das soluções na placa as colunas 1, 2 e 3 de A – H foram reservadas para uma amostra (Amostra 1), as colunas 4, 5 e 6 de A – H para uma segunda amostra (Amostra 2) e as colunas 7, 8 e 9 para o controle positivo (Controle +). As soluções A – H foram dispostas em sequência da parte superior para a parte inferior da placa (linhas A – H). A coluna 10 foi reservada para o branco da amostra. A coluna 11 para o controle negativo e a coluna 12 para o branco do reagente. O diagrama de pipetagem pode ser observado na Figura 3.

As microplacas foram incubadas em ambiente escuro por 30 min à temperatura ambiente e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (EONC BioTek Instruments Inc.- Winooski, Vermont, EUA) a 517 nm.

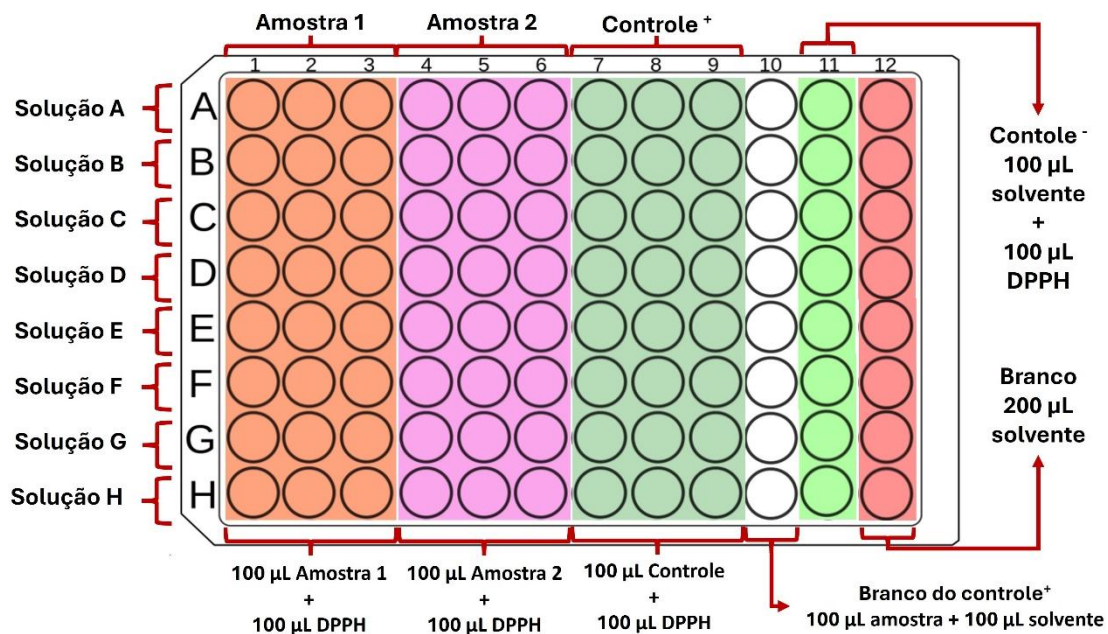


Figura 3: Diagrama de pipetagem de amostras, controles e brancos para o ensaio de DPPH.

2.4. Análise de dados

Para o tratamento inicial das absorbâncias obtidas por espectrofotometria, primeiro foi calculada a média da absorbância do branco, e esse valor foi subtraído de todas as demais medições. Em seguida, a atividade antioxidante foi estimada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Inibição} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

onde:

%inibição é o percentual de neutralização;

Abs_{controle} é a absorbância do controle negativo (DPPH + solvente);

Abs_{amostra} é a absorbância das amostras.

Os valores de atividade antioxidante expressos %inibição (percentual de neutralização) foram utilizados para determinar a concentração necessária capaz de inibir 50% do radical DPPH (IC₅₀), expressa em µg/mL. Na literatura, alguns trabalhos utilizam regressão linear, para determinar o ponto médio da atividade inibitória [14-16], enquanto outros utilizam a regressão não linear [17]. Para efeito de comparação dos métodos e consequentemente dos resultados obtidos, ambas as abordagens foram adotadas neste estudo.

2.4.1. Análise por regressão linear

É comum que a relação entre % de inibição e concentração não se apresente completamente de forma linear, e sim como uma curva de dose-resposta com efeito sigmoide [6, 17]. Nesse caso, aplicar a regressão linear diretamente sobre a concentração pode gerar IC₅₀ impreciso, e a transformação logarítmica permite linearizar a parte central da curva para facilitar o cálculo.

As concentrações da amostra (C, em µg/mL) foram transformadas utilizando o logaritmo natural (lnC), para linearizar a curva de resposta:

$$x' = \ln(C)$$

onde:

- x' é a concentração transformada (ln),
- C é a concentração original da amostra.

Construindo a curva de regressão, foi plotado no eixo y a porcentagem de inibição, calculada previamente, e no eixo x a concentração transformada (lnC), resultando na equação da reta:

$$y = a \cdot \ln(C) + b$$

onde:

- y é a porcentagem de inibição,
- a é o coeficiente angular da reta,
- b é o intercepto no eixo y.

O valor de IC₅₀ corresponde à concentração que provoca 50% de inibição. Substituiu-se então na equação da reta obtida (y=50) e resolveu-se para lnC:

$$50 = a \cdot (\ln IC_{50}) + b$$

$$\ln IC_{50} = ((50-b)/a)$$

Por fim, aplicou-se a função exponencial para retornar à concentração para a unidade original em µg/mL e não mais em escala logarítmica:

$$IC_{50} = e^{\frac{50-b}{a}}$$

Os valores de IC_{50} , em conjunto com os valores de porcentagem de inibição, quando plotados nos *softwares* de análise estatística (Excel, GraphPad Prism, R, Python, etc.) para determinação da equação da reta, também geram automaticamente o valor de R^2 que é utilizado para identificar quão bem a regressão linear se ajusta aos dados experimentais.

2.4.2. Análise por regressão não linear

O modelo mais usado para curvas de dose-resposta (inibição) é o modelo logístico de 4 parâmetros (4PL). Duas formas equivalentes (uma com X = concentração, outra com $X = \log_{10}(\text{concentração})$) [18]:

$$y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + (X / IC_{50})^{\text{Hill}})$$

onde:

- y = % de inibição observada;
- X = concentração (mesma unidade usada nos dados);
- Bottom = resposta mínima assintótica (por exemplo 0% ou valor experimental mínimo);
- Top = resposta máxima assintótica (por exemplo 100% ou valor experimental máximo);
- IC_{50} = parâmetro que corresponde à concentração que produz 50% da resposta entre Top e Bottom;
- Hill = coeficiente de inclinação (slope / Hill slope).

O ajuste não linear procura os parâmetros (Bottom, Top, IC_{50} , Hill) que minimizam a soma dos quadrados dos resíduos (SSE):

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_{i,obs} - y_{i,pred})^2$$

Isso é feito por algoritmos iterativos (ex.: Levenberg–Marquardt). O resultado traz os parâmetros ótimos e estimativas de erro padrão (SE) e intervalos de confiança (IC 95%) do IC_{50} .

Para realização desta análise, foi utilizado o *software* GraphPad Prism, na versão 8.0.4, (San Diego, Califórnia, EUA). Criou-se uma tabela do tipo “XY” → marcando a opção “enter 3 replicate values in side-by-side subcolumns” Inserindo em X os dados das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) e em Y a % inibição correspondente. Em seguida clicou-se em “Analyze → Transform concentrations x → Transform to logarithms → log10 common → OK” e, com isso, foi criada uma nova tabela agora com as concentrações convertidas para escala logarítmica.

A partir dessa nova tabela foi realizado um novo processamento clicando em “Analyze” → “Nonlinear regression (curve fit)” → “Choose a model” → Dose–response — Inhibitor vs response — Variable slope (four parameters) → “ok”. O programa entregou uma nova tabela com valores ajustados de Bottom, Top, IC_{50} (ou $\log IC_{50}$), Hill slope, SE dos parâmetros, IC 95% para IC_{50} e gráficos com curva ajustada.

Simultaneamente à criação da tabela com os valores de IC_{50} e outros parâmetros, o *software* gera um gráfico para visualização dos dados processados. Na janela ao lado esquerdo da interface, ao clicar em “Graphs” abrirá uma janela de formatação das características e do tipo de gráfico desejado. Para este trabalho foi utilizado o modo “Grouped” → “summary data” → foi selecionada a décima opção, da esquerda para a direita, com pontos ligados por uma linha contínua que representam a média dos resultados obtidos para cada concentração, acompanhada pelo respectivo desvio padrão ($\pm$ SD) → plot “mean with SD” → “ok”. A imagem gráfica final recebeu ajustes de título e legendas antes de serem incorporados ao corpo da discussão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento dos processos de extração

Foi obtido uma massa de 11,97 g de extrato da casca do caule de *Bertholletia excelsa*, com rendimento determinado de 23,93%. Silva et al. (2018) [19] relataram rendimentos variando entre 9,4% e 10,4% para extratos aquosos obtidos da casca do caule da mesma espécie, valores, portanto, inferiores aos observados no presente estudo. Por outro lado, Azevedo et al. (2017) [20] reportaram um rendimento de 24,36% para o extrato obtido com etanol 95%, resultado mais próximo ao determinado neste trabalho. As variações de rendimento observadas entre diferentes estudos podem estar associadas a fatores intrínsecos ao material vegetal, como idade, local de ocorrência e época de coleta, bem como a diferenças no método de extração e no tipo de solvente empregado [21].

Em relação ao mulateiro (*Capirona macrophylla*), foi obtido 2,106 g de extrato bruto, com rendimento calculado de 21,06%. Até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura acerca do rendimento de extratos obtidos a partir das folhas dessa espécie, sendo este trabalho pioneiro nesta análise. Para fins comparativos dentro do mesmo gênero, Barbosa et al. (2018) [22] reportaram um rendimento de 1,81% para o extrato etanólico das folhas de *Capirona decorticans*.

3.2. Validação do ensaio antioxidante

O ensaio de atividade antioxidante foi considerado válido, uma vez que atendeu aos principais parâmetros de verificação da qualidade experimental. Os brancos apresentaram a resposta esperada, com valores de absorbância próximos de zero; o controle positivo comportou-se de maneira adequada, promovendo a neutralização do radical de forma concentração-dependente, refletida nas leituras de absorbância. Além disso, as replicatas mostraram concordância entre si, e as respostas obtidas foram reprodutíveis, indicando consistência nos resultados.

Com relação aos critérios necessários para o prosseguimento das análises estatísticas e para o cálculo dos valores de IC_{50} , observou-se que a maioria das amostras também atendeu aos parâmetros de validação estabelecidos. Dentre eles destacam-se:

- Resultados reprodutíveis entre replicatas;
- Comportamento concentração-dependente, com pelo menos cinco pontos experimentais válidos;
- Presença de concentrações capazes de promover neutralização superior a 80% do radical DPPH;
- Presença de concentrações com neutralização inferior a 20% do DPPH;
- Baixa ocorrência de valores discrepantes (*outliers*).

3.3. Perfil antioxidante

O extrato metanólico da castanheira (*B. excelsa*) apresentou comportamento claramente concentração-dependente. Na menor concentração testada para esta amostra (3,906 $\mu\text{g/mL}$), observou-se uma capacidade de neutralização em torno de 10% do radical livre DPPH, alcançando valores superiores a 80% na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 125 $\mu\text{g/mL}$, verificou-se a formação de um platô, com neutralização ligeiramente acima de 90%, indicando saturação da resposta (Figura 4). Não foram observados aumentos abruptos na atividade antioxidante entre as diferentes concentrações testadas, o que contribui para a confiabilidade estatística e robustez dos dados experimentais.

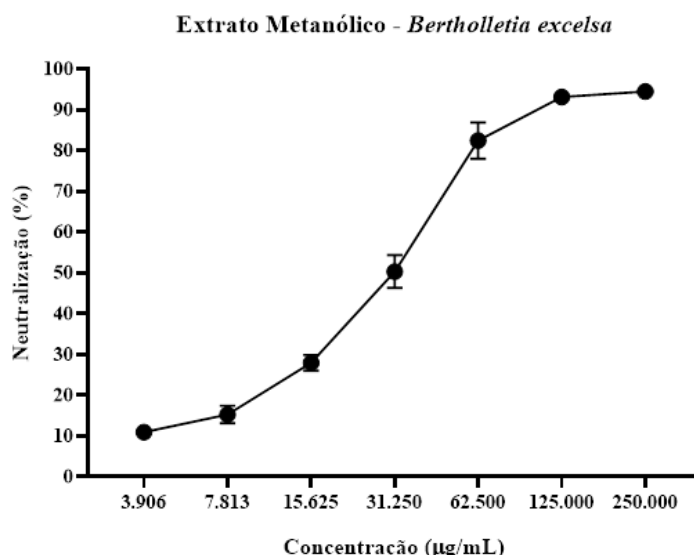


Figura 4: Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelo extrato metanólico de *Bertholletia excelsa*.

O óleo de copaíba também apresentou comportamento nitidamente concentração-dependente. Na concentração testada de 1,75 mg/mL observou-se uma capacidade de neutralização de aproximadamente 10% do radical livre DPPH. De modo geral, entretanto, a atividade antioxidante mostrou-se mais discreta, atingindo um valor máximo próximo de 80% na concentração mais elevada avaliada (Figura 5). Assim como observado para o extrato metanólico da castanheira, não ocorreram variações abruptas de atividade entre as diferentes concentrações testadas, o que contribui para a consistência estatística e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

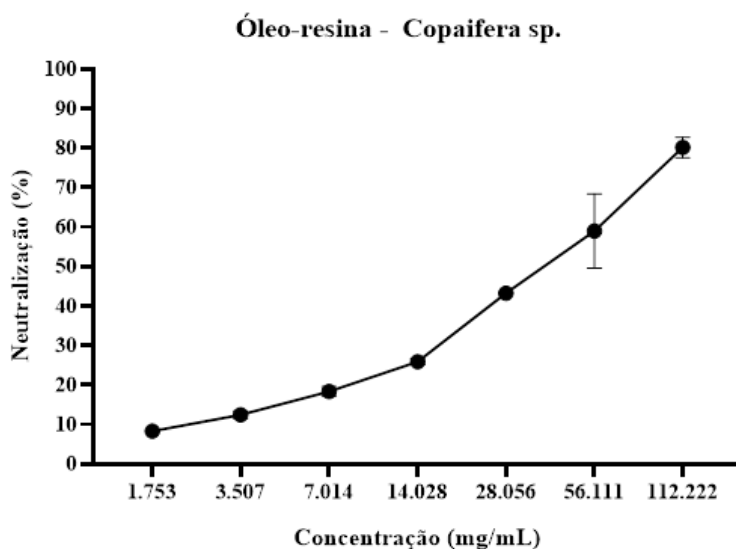


Figura 5: Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelo óleo de copaíba – *Copaifera* sp.

Assim como os demais, o extrato aquoso do mulateiro (*C. macrophylla*) apresentou comportamento concentração-dependente. Na menor concentração testada com atividade mensurável de 3,906 µg/mL observou-se uma capacidade de neutralização de aproximadamente 20% do radical DPPH, atingindo um platô em torno de 90% de neutralização na concentração de 31,25 µg/mL (Figura 6). Não foram observados aumentos abruptos na atividade antioxidante

entre as diferentes concentrações avaliadas, o que reforça a consistência estatística e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

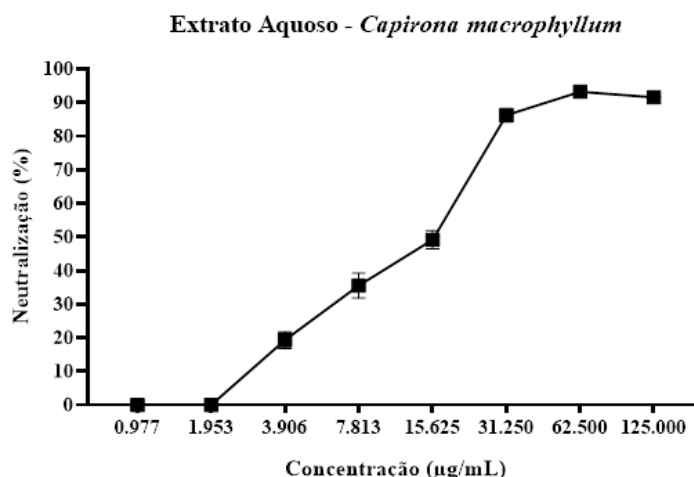


Figura 6: Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelo extrato de mulateiro – *Capirona macrophylla*.

Foram obtidas 60 frações por cromatografia a partir do extrato de mulateiro (*C. macrophylla*). Dentre essas, foi possível acumular biomassa suficiente para análise de 12 frações (16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 33 e 34). Essas frações apresentaram perfis de resposta distintos, embora todas tenham demonstrado comportamento dependente da concentração.

A fração 16 atingiu um platô de aproximadamente 90% de neutralização na concentração de 31,25 µg/mL, enquanto a fração 17 alcançou o mesmo patamar a 61,25 µg/mL. As frações 25, 26, 33 e 34 atingiram cerca de 90% de neutralização apenas na concentração de 125 µg/mL, ao passo que as demais não alcançaram esse nível máximo de atividade antioxidante (Figura 7). Não foram observadas variações abruptas na atividade entre as diferentes concentrações testadas, o que reforça a consistência dos dados e a confiabilidade dos resultados.

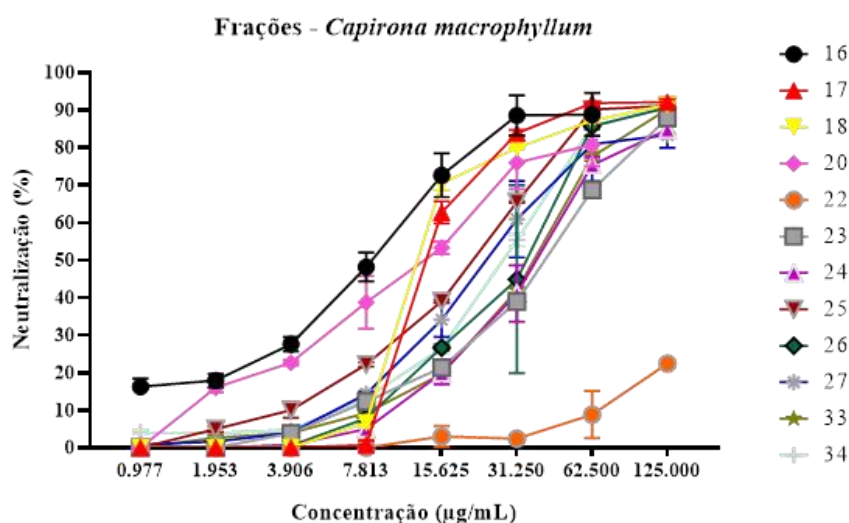


Figura 7: Perfil de capacidade de neutralização do radical livre DPPH pelas frações do extrato de mulateiro – *Capirona macrophylla*.

3.4. Valores de IC₅₀

O valor calculado de IC₅₀ para o extrato da castanheira foi de 27,022 µg/mL e 32,13 µg/mL, utilizando como base de cálculo os modelos de regressão linear e não linear, respectivamente (Tabela 2). Azevedo et al. (2017) [21] relataram um valor de IC₅₀ de 6,77 µg/mL para o extrato etanólico das cascas de castanheira, calculado por regressão linear. A discrepância entre os valores obtidos entre os trabalhos pode ser atribuída às diferenças nos métodos de extração, que influenciam diretamente a composição e concentração dos metabólitos secundários presentes nos extratos [22].

O óleo-resina de copaíba apresentou valor de IC₅₀ entre 33,61 e 82,71 x 10³ µg/mL utilizando como base de cálculo os modelos de regressão linear e não linear, respectivamente. Quando comparado com as outras amostras, cujos valores de IC₅₀ estão na casa de microgramas por mililitro, o óleo de copaíba se mostra inferior com IC₅₀ na ordem de miligramas por mililitro. O trabalho de Amilia et al. (2014) [23] não conseguiram determinar um valor de IC₅₀ para o óleo de copaíba, ressaltando a baixa eficiência na habilidade de neutralização direta de radicais livres.

Contudo, alguns trabalhos indicam que a habilidade de ação antioxidante pode ocorrer por outras vias para este produto. Furtado et al. (2021) [24] sugerem que o óleo de copaíba tem um efeito antioxidante sistêmico interessante, que se reflete na melhoria da função cardíaca em modelo animal. Castro et al. (2017) [25] apresentaram resultados que revelam que o óleo de copaíba apresentou ações anti-inflamatórias e antioxidantes sistêmicas em ratos com artrite induzindo um aumento no conteúdo de GSH e a atividade da catalase no fígado.

O valor calculado de IC₅₀ para o extrato do mulateiro foi de 12,996 µg/mL e 11,79 µg/mL, utilizando como base de cálculo os modelos de regressão linear e não linear, respectivamente (Tabela 2). Não foram encontrados registros de nenhum outro trabalho que avaliou a atividade antioxidante de *C. macrophylla*. Para *Capirona decorticans*, planta no mesmo gênero, o IC₅₀ do extrato etanólico das folhas foi de 44 µg/mL, sendo considerado pelos autores do trabalho uma promissora fonte de compostos antioxidantes com efeito comparável ao de compostos padrão de comparação como ácido ascórbico e rutina [22].

Tabela 1: Valores de concentração inibitória média – IC₅₀ calculados por regressão linear e não linear para as amostras de extratos e frações de plantas amazônicas.

Amostra	Regressão Linear		Regressão não linear	
	IC ₅₀ (µg/mL)	R ²	IC ₅₀ (µg/mL)	R ²
Castanha	27,022 ± 1,64	0,9453	32,13 ± 2,775	0,994
Copaíba*	33,614 ± 3,16	0,9562	82,71 ± ???	0,9831
Mulateiro	12,996 ± 1,26	0,9105	11,79 ± 2,656	0,9792
Fração 16	7,906 ± 0,96	0,9447	8,92 ± 1,25	0,9857
Fração 17	18,69 ± 0,73	0,7644	13,76 ± 1,30	0,9965
Fração 18	16,627 ± 0,47	0,723	12,02 ± 0,705	0,9951
Fração 20	11,645 ± 0,75	0,9765	10,32 ± 1,47	0,9723
Fração 22	14.515,38 ± 6161,69	0,7981	~5955	0,9197
Fração 23	34,766 ± 0,82	0,8084	49,55 ± 12,02	0,9967
Fração 24	17,028 ± 1,38	0,9516	32,47 ± 4,295	0,9903
Fração 25	18,863 ± 0,73	0,9582	19,98 ± 2,29	0,9941
Fração 26	28,287 ± 2,83	0,9585	30,49 ± 13,34	0,9497
Fração 27	24,289 ± 5,24	0,9141	19,72 ± 3,38	0,9813
Fração 33	29,983 ± 0,25	0,8975	35,70 ± 3,02	0,9965
Fração 34	22,41 ± 0,59	0,8731	26,94 ± 1,73	0,9968

* os valores para esta amostra estão expressos em mg/mL.

Analisando os resultados para as frações do mulateiro, a amostra que apresentou o melhor potencial antioxidante foi a Fração 16 com valores de IC_{50} de 7,906 e 8,92 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como base de cálculo os modelos de regressão linear e não linear, respectivamente. Esse valor, que é mais baixo do que o encontrado para o próprio extrato bruto original, é provavelmente decorrente de uma maior concentração de compostos antioxidantes nessa fração. Já a fração que obteve o desempenho inferior para esta atividade foi a Fração 22, seus valores de IC_{50} não foram compreendidos dentro das concentrações testadas, sendo possível realizar apenas uma estimativa matemática de 14.515,38 e 5.955 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como base de cálculo os modelos de regressão linear e não linear, respectivamente.

O valor de IC_{50} que pode ser considerado como bom, ou excelente depende da referência utilizada. Segundo trabalho descrito por Hendri (2023) [26], produtos naturais com valores de IC_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ podem ser considerados como antioxidantes muito potentes. Já o trabalho de Cos et al. (2006) [27] indica que, se o experimento seguiu critérios rigorosos, são considerados ótimos os valores de IC_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ para extratos e abaixo de 25 μM para compostos puros sendo esta interpretação corriqueira em muitos trabalhos. Considerando estes parâmetros, pode-se dizer que, com exceção do óleo de copaíba e da fração 22 de mulateiro, todas as amostras aqui testadas apresentaram um excelente desempenho na capacidade de neutralização direta do radical livre DPPH.

3.5. Comparação dos modelos de análise estatística

O resultado do ensaio de DPPH é frequentemente expresso como % de inibição do radical DPPH em função da concentração da amostra, ou como o valor de concentração que causa 50 % de inibição do mesmo (IC_{50} ou EC_{50}) [29, 30]. Na abordagem de regressão linear, parte-se do pressuposto de que há uma relação aproximadamente direta e proporcional entre a concentração da amostra (ou extrato) e a % de inibição até certo nível. Neste caso constrói-se uma curva de calibração em que se ajusta uma reta ($y = Ax + B$) e calcula-se o IC_{50} substituindo $y = 50$ na equação da reta. Esse modelo de análise é simples, mas apresenta algumas limitações como a presença de linearidade apenas em uma faixa de concentrações, a formação de curvatura em concentrações próximas do limiar de saturação da reação e resultados não confiáveis caso sejam utilizados intervalos que abrangem regiões não lineares [28, 29].

Para melhorar o ajuste, podem-se fazer transformações logarítmicas na variável de concentração, como realizado neste trabalho, de modo a aproximar os dados a uma reta. O uso de logaritmos ou escala semilog, permite que curvas “menos lineares” sejam linearizadas até certo ponto, favorecendo a aplicação de regressão linear. Esse procedimento é comum em muitos ensaios bioquímicos para IC_{50} , embora nem sempre mencionado explicitamente [29-31].

Por outro lado, a regressão não linear considera o ajuste de modelos que não pressupõem uma simples relação reta e pode captar melhor o comportamento real dos dados em muitos ensaios. A relação concentração $\times$ % inibição frequentemente apresenta uma forma de sigmoide ou curvatura, à medida que as concentrações aumentam e se aproxima de um platô causado pela saturação da inibição ou devido a efeitos de reações secundárias. Em um estudo com extratos de uva via DPPH, o artigo concluiu que análises estatísticas utilizando regressão não linear são mais apropriados para este ensaio do que a regressão linear ou a interpolação direta [32]. Analisando a atividade antioxidante de vinho e subprodutos do vinho. Carmona-Jiménez et al (2014) [30] abordaram a questão do comportamento de amostras complexas no ensaio de DPPH e apontaram que esse tipo de amostra sempre tende a um comportamento não linear, sendo necessário a avaliação e confirmação dos resultados e garantir uma análise estatística eficiente.

Os valores dispostos na Tabela 2 mostram que, para a maioria das amostras, os valores de IC_{50} , para regressão linear e não linear, são relativamente próximos, sendo a menor diferença para a Fração 16 com 1,014 $\mu\text{g/mL}$ de diferença e a maior discrepância para o óleo de copaíba com 49,096 mg/mL de diferença na estimativa da IC_{50} . Especificamente para regressão não linear da copaíba, o programa Graphpad Prisma não conseguiu fornecer dados que possibilitassem o cálculo do desvio padrão da IC_{50} . Segundo o programa, o limite superior do intervalo de confiança (95%) não pôde ser estimado com precisão. O modelo encontrou um

valor mínimo provável (91.92 mg/mL) para o parâmetro “Top” (o platô máximo da curva sigmoide), mas os dados não fornecem evidência estatística suficiente para definir onde o valor máximo termina, ou seja, o intervalo continuaria aumentando indefinidamente sem estabilizar.

Para além da diferença entre os valores brutos obtidos pelos dois modelos de cálculo, é necessário considerar outros parâmetros como, por exemplo, o valor do coeficiente de determinação (R^2). Esse parâmetro estatístico mede o quanto da variação observada nos dados experimentais é explicada pelo modelo de regressão, indicando, portanto, o grau de ajuste entre o modelo e os dados observados [33]. Os valores de R^2 variam de 0 a 1, sendo que 0 representa ausência total de explicação da variabilidade dos dados pelo modelo, enquanto 1 indica que toda a variação da variável dependente é explicada pelas variáveis independentes consideradas. Em outras palavras, o R^2 expressa a proporção da variabilidade dos dados que o modelo é capaz de descrever [34].

A interpretação do que constitui um bom valor de R^2 depende do contexto experimental, da área de estudo, da variabilidade intrínseca dos dados, do tipo de modelo (linear ou não linear) e do objetivo da análise [34-36]. Alguns autores consideram ainda que o uso isolado do coeficiente de determinação (R^2) como indicador de qualidade do ajuste não é totalmente apropriado em regressões não lineares, pois a decomposição da variância utilizada no modelo linear não se aplica da mesma forma a modelos não lineares, sendo interessante considerar também parâmetros como erro padrão e o intervalo de confiança para confirmar correta adequação dos dados [37].

Em ensaios analíticos bioquímicos, como a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, um $R^2 > 0,90$ é geralmente considerado muito bom e, valores acima de 0,95 são considerados excelentes [32]. Alguns trabalhos consideram ainda que valores intermediários de R^2 , como 0,70 e 0,80, podem ser viáveis para direcionar a busca por uma correlação positiva entre o ensaio de DPPH e a atividade antioxidante [38-40]. Assim, para fins de padronização e comparação, será considerado um R^2 entre 0,7 e 0,9 como aceitável ou bom, R^2 entre 0,9 e 0,95 muito bom e valores de R^2 superiores a 0,95 como excelente.

Considerando esses parâmetros, observa-se que, na regressão linear, as frações 17, 18, 22, 23, 33 e 34 apresentaram valores de R^2 entre 0,7 e 0,9, sendo classificados como aceitáveis; o extrato da castanha, o extrato do mulateiro e as frações 16 e 27 apresentaram valores muito bons (entre 0,9 e 0,95); e as demais amostras exibiram resultados excelentes, com $R^2 > 0,95$. Por outro lado, na análise por regressão não linear, a fração 22 apresentou R^2 muito bom (0,91), enquanto todas as demais amostras mostraram valores excelentes ($R^2 > 0,95$), com destaque para a fração 34, que passou de um R^2 de 0,8731 na regressão linear para um R^2 de 0,9968 na regressão não linear.

Esses resultados indicam que ensaios bioquímicos, como a determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH, tendem a se ajustar melhor a modelos de regressão não linear, uma vez que as respostas experimentais frequentemente apresentam comportamento sigmoide ou semissigmoide, características que são mais bem descritas por esse tipo de ajuste [17, 41, 42]. A regressão linear pode, contudo, ser utilizada de forma eficiente, como relatado em diversos estudos, desde que se observe cuidadosamente o comportamento das curvas, selecionem-se faixas de concentração com menor curvatura e sejam considerados os valores de R^2 para ajustes no ensaio ou no modelo analítico [43].

4. CONCLUSÃO

Os extratos das espécies amazônicas avaliadas, *Capirona macrophylla* (mulateiro), *Bertholletia excelsa* (castanha-da-Amazônia) e *Copaifera* sp. (copaíba), apresentaram atividade antioxidante significativa pela capacidade de neutralização direta do radical livre DPPH. O mulateiro exibiu a maior potência, seguido, em ordem decrescente, pela castanha-da-Amazônia e pela copaíba. Este estudo representa o primeiro relato da atividade antioxidante do mulateiro, e o fracionamento do extrato foi eficaz em identificar frações com potencial antioxidante igual ou superior ao do extrato bruto, que já havia se destacado como a amostra de maior atividade. A análise estatística dos resultados demonstrou que, tanto a regressão linear, quanto a não linear

podem ser aplicadas à determinação do IC₅₀. Contudo, o comportamento das curvas obtidas neste ensaio ajustou-se de forma mais adequada aos modelos de regressão não linear, indicando que essa abordagem descreve com maior precisão o perfil sigmoide característico das respostas de inibição radicalar.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPERO pelo suporte financeiro concedido na forma de bolsas de iniciação científica de Larissa Victoria de Oliveira (PBIC nº 0012.000471/2023-83), e de pós-doutorado do Dr. Thiago Silva de Almeida (DCRB nº 36237.579.23035.12112023-172), assim como o financiamento de projetos via Editais Universal (PAP/UNIVERSAL ÁREAS PRIORITÁRIAS 005/2023) e Cadeias Produtivas (PAP CADEIAS PRODUTIVAS - FAPERO/DITT) para a execução de parte desta pesquisa. À Fiocruz Rondônia pelo suporte financeiro concedido na forma de bolsas de nível técnico para Esdras Abimael Maia Mendonça e Joseph Albert Medeiros Evaristo. À Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz (RPT-10B) pela infraestrutura tecnológica. À CAPES e PPGREN/UNIR pela bolsa da mestranda Nayara Nágila Neves Alves (nº 88887.975324/2024-00). E à Universidade Federal de Rondônia por acolher e contribuir com a manutenção predial do CEBio/FiocruzRO.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hans TS, Pitman NCA, Sabatier D, Baraloto C, Salomão RP, Guevara JE, Phillips OL, et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. *Science*. 2013 Oct;342(6156):1-6. doi: 10.1126/science.1243092
2. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006 Feb;27(1):1-93. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.008
3. Gurib-Fakim A, editor. *Novel plant bioresources: applications in food, medicine and cosmetics*. Chichester (UK): John Wiley & Sons; 2014.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
5. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011 Aug;48(4):412-22. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
6. Menezes BB, Frescura LM, Duarte R, Villetti MA, da Rosa MB. A critical examination of the DPPH method: mistakes and inconsistencies in stoichiometry and IC₅₀ determination by UV-Vis spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2021 May;1157:338398. doi: 10.1016/j.aca.2021.338398
7. John JA, Shahidi F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J Funct Foods*. 2010;2(3):196-209. doi: 10.1016/j.jff.2010.04.008
8. Veiga Junior VF, Pinto AC. The *Copaifera* L. genus: phytochemistry and biological activities. *Quim Nova*. 2002;25(2):273-86. doi: 10.1590/S0100-40422002000200016
9. Evaristo J, Laia ED, Tavares B, Mendonça E, Grisostenes L, Rodrigues C, et al. Identification of bioactive metabolites of *Capirona macrophylla* by metabolomic analysis, molecular docking, and in vitro antiparasitic assays. *Metabolites*. 2025;15(3):157. doi: 10.3390/metabo15030157
10. Vargas FS, Almeida PDO, de Boleti APA, Pereira MM, de Souza TP, de Vasconcellos MC, et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16:83. doi:10.1186/s12906-016-1061-9
11. Kadir G, Ayele AG, Shibeshi W. In-vivo evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of the 80% methanol extract of *Acacia seyal* stem bark in rodent models. *J Pharm Health Care Sci*. 2024 Nov;10(1):75. doi: 10.1186/s40780-024-00387-1
12. Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 2001;15:127-30.
13. Polez VLP, De Sá Dantas KC, Duarte AO, Magarelli G, da Silva LP. Método de avaliação antioxidante de material vegetal por DPPH em microplaca e controle de qualidade. Brasília (BR): Embrapa; 2023. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1159918>.

14. Souza LDZS, Fonseca SRAVD, Ferrari A, Felipe DF. β -ecdysone content and antioxidant capacity in different organs of Brazilian ginseng. *Cienc Rural*. 2021;51(5):e20200618. doi: 10.1590/0103-8478cr20200618
15. Hendriyani I, Maulida MK, Wahid AR, Khairi W, Sugara TH. Antioxidant activity of tegining ganang (*Senna hirsuta* L.) leaf extract using DPPH method. *Med Sains J Ilm Kefarmasian*. 2025;10(3):263-72. doi: 10.37874/ms.v10i3.1724
16. Belounis Y, Moualek I, Sebbane H, Ait Issad H, Saci S, Saoudi B, et al. Potential natural antioxidant and anti-inflammatory properties of *Carthamus caeruleus* L. root aqueous extract: an in vitro evaluation. *Processes*. 2025;13(3):878. doi: 10.3390/pr13030878
17. Chen Z, Bertin R, Frolidi G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chem*. 2013 May;138(1):414-20. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001
18. Seber GAF, Wild CJ. Nonlinear regression. 1st ed. New York (US): Wiley; 1989. doi: 10.1002/0471725315
19. Silva F, Hanna AC, de Souza A, da Silva Filho F, Canhoto O, Magalhães A, et al. Integrative analysis based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* bark biomass residues: determination of ellagic acid derivatives. *J Braz Chem Soc*. 2018;29(1):1-12. doi: 10.21577/0103-5053.20180215
20. Azevedo MS, Martao VM, Sousa CICC, Aizzo JRES, Andrade-Neto VF, Pereira VSS, et al. Antioxidant activity in vitro from bark and wood capsule extracts of Castanha-do-Brazil. *Int J Curr Res*. 2017;9:50289-94.
21. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. *Rev Bras Pl Med*. 2016;18(1 Suppl 1):230-9. doi: 10.1590/1983-084X/15_106
22. Barbosa FG, Sugui MM, Senhorin VDG, Bicudo RC, Moura FR, Senhorin AP. First phytochemical and biological study of the ethanolic extract from leaves of *Capirona decorticans* (Rubiaceae). *Acta Amazon*. 2018 Dec;48(4):338-46. doi: 10.1590/1809-4392201703483
23. Destryana RA, Young DG, Woolley CL, Huang TC, Wu HY, Shih WL. Antioxidant and anti-inflammation activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress essential oils in vitro and in vivo. *J Am Oil Chem Soc*. 2014 Sep;91(9):1531-42. doi: 10.1007/s11746-014-2504-4
24. Furtado RG, Rassi DC, Melato LH, Oliveira ACR, Nunes PM, Baccelli PE, et al. Segurança do agente de contraste SF6 (SonoVue®) no ecocardiograma sob estresse farmacológico. *Arq Bras Cardiol*. 2021 Sep;117(3):1-7. doi: 10.36660/abc.20200929
25. Ghizoni CV, Ames APA, Lameira OA, Amado CAB, Nakanishi ABS, Bracht L, et al. Anti-inflammatory and antioxidant actions of Copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *J Cell Biochem*. 2017 Oct;118(10):3409-23. doi: 10.1002/jcb.25998
26. Hendri M. Antioxidant activity and toxicity test on mangrove (*Rhizophora apiculata*) from Banyuasin waters, South Sumatra. *Oceanogr Fish Open Access J*. 2023;16(3):1-6. doi: 10.19080/OFOAJ.2023.16.555936
27. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol*. 2006 Jul;106(3):290-302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003
28. Baliyan S, Mukherjee R, Priyadarshini A, Vibhuti A, Gupta A, Pandey RP, et al. Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*. 2022 Feb;27(4):1326. doi: 10.3390/molecules27041326
29. Attaallah R, Amine A. The kinetic and analytical aspects of enzyme competitive inhibition: sensing of tyrosinase inhibitors. *Biosensors*. 2021 Sep;11(9):322. doi: 10.3390/bios11090322
30. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, Igartuburu JM, García Barroso C. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem*. 2014 Dec;165:198-204. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.106
31. Ittam A, Wati MS, Agustin V, Sabri N, Jumanah RA, Efdi M. Comparative study of phytochemical, antioxidant, and cytotoxic activities and phenolic content of *Syzygium aqueum* extracts growing in West Sumatera, Indonesia. *Sci World J*. 2021 Jun;2021:5537597. doi: 10.1155/2021/5537597
32. Sridhar K, Charles AL. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: estimation methods for EC₅₀ using advanced statistical programs. *Food Chem*. 2019 Mar;275:41-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.040
33. Hagquist C, Stenbeck M. Goodness of fit in regression analysis – R² and G² reconsidered. *Qual Quant*. 1998 Aug;32(3):229-45. doi: 10.1023/A:1004328601205
34. Saunders LJ, Russell RA, Crabb DP. The coefficient of determination: what determines a useful R² statistic? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Oct;53(11):6830. doi: 10.1167/iops.12-10598

35. Draper NR, Smith H. Applied regression analysis. 1st ed. New York (US): Wiley; 1998. doi: 10.1002/9781118625590
36. Camirand Lemyre F, Chalifoux K, Desharnais B, Mireault P. Squaring things up with R^2 : what it is and what it can (and cannot) tell you. *J Anal Toxicol*. 2022 Apr;46(4):443-8. doi: 10.1093/jat/bkab036
37. Spiess AN, Neumeyer N. An evaluation of R^2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol*. 2010 Dec;10(1):6. doi: 10.1186/1471-2210-10-6
38. Meziane Y, Yakoubi R, Megateli S, Chaouia C. In vitro assessment of total bioactive contents and antioxidant capacity of grape juices extracts of table and wine varieties from Algeria and their correlations. *Nat Life Sci Commun*. 2023;22(3):e2023050.
39. Goya Jorge E, Rayar A, Barigye S, Rodríguez MJ, Sylla-Iyarreta Veitía M. Development of an in silico model of DPPH free radical scavenging capacity: prediction of antioxidant activity of coumarin type compounds. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun;17(6):881. doi: 10.3390/ijms17060881
40. Maliński MP, Kikowska MA, Soluch A, Kowalczyk M, Stochmal A, Thiem B. Phytochemical screening, phenolic compounds and antioxidant activity of biomass from *Lychnis flos-cuculi* L. in vitro cultures and intact plants. *Plants*. 2021 Jan;10(2):206. doi: 10.3390/plants10020206
41. Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, Hideg É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules*. 2016 Feb;21(2):208. doi: 10.3390/molecules21020208
42. Eklund PC, Långvik OK, Wärnå JP, Salmi TO, Willför SM, Sjöholm RE. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org Biomol Chem*. 2005 Aug;3(18):3336-47. doi: 10.1039/B506739A
43. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson JD, Rinaldi M, Arlorio M. Study of the DPPH-scavenging activity: development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem*. 2009 Jun;114(3):889-97. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.035