

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Connarus  
perrottetii* var. *angustifolius* RADLK E AVALIAÇÃO  
DO COMPORTAMENTO ANTIOXIDANTE FRENTE A  
ESPÉCIES RADICALARES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Larissa Sabo Müller**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* RADLK E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ANTIOXIDANTE FRENTE A ESPÉCIES RADICALARES**

**por**

**Larissa Sabo Müller**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho**

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

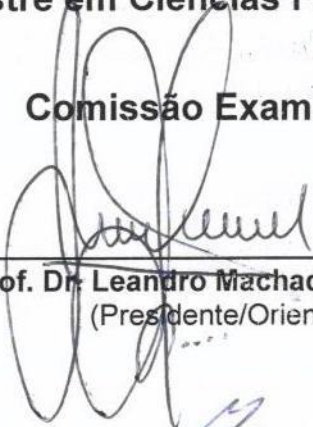
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Conarus perrottetii*  
var. *angustifolius* RADLK E AVALIAÇÃO DO  
COMPORTAMENTO ANTIOXIDANTE FRENTE A ESPÉCIES  
RADICALARES**

elaborada por  
**Larissa Sabo Müller**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho**  
(Presidente/Orientador)



---

**Prof.ª. Dra. Margareth Linde Athayde (UFSM)**



---

**Prof. Dr. Osmar Alves Lameira (EMBRAPA Amazônia Oriental)**

Santa Maria, 31 de julho de 2013.

Dedico este trabalho  
Aos meus pais **Lauri e Lisiane**,  
pelo dom da vida e pelo amor a mim dedicado,  
bem como por terem me incentivado  
a buscar o maior tesouro que um ser humano pode carregar:  
O conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro Machado de Carvalho, pela oportunidade de ingressar na pesquisa e pela confiança depositada em meu trabalho ao longo destes cinco anos de orientação. Agradeço ainda pela amizade e compreensão em momentos de dificuldade.

Aos meus pais Lauri e Lisiane, meus maiores incentivadores, que vibram com qualquer pequeno acontecimento da minha vida acadêmica. Talvez eu tenha o pai mais orgulhoso de que se tem notícia simplesmente por ter uma filha mestranda. A vocês, mil vezes obrigada por todas as oportunidades que têm me dado ao longo da vida. Amo-os de uma forma inexplicável.

As minhas irmãs Lauriane e Letícia, pelas longas horas de conversa, apoio e incentivo. Vocês acima de tudo são minhas melhores amigas. Meu amor por vocês é eterno e incondicional.

Ao meu irmão Lourenço, com o qual encarei o desafio de sair de casa aos 14 anos para “ser alguém na vida”. Fomos pai e mãe um do outro. Obrigada por, além de dividir apartamento, dividir comigo o teu coração. Te amo muito.

Ao meu cunhado Bruno, que por ser o único mestre e doutor da família, foi um exemplo a se inspirar.

As minhas amadas companheiras, que me mostram todo dia o verdadeiro significado da palavra amizade: Ana Paula Moreira, Daiane Dias, Gabriela Zemolin, Géssica Silveira, Luciana Gobo, Mariele Martini, e Monique Motta. Obrigada por me tornarem uma pessoa melhor em todos os sentidos. Obrigada por terem me emprestado o ombro pra chorar e os risos pra dividir as alegrias. Obrigada por estarem sempre “ali”, comigo e por mim. Não consigo encontrar palavras para expressar toda a minha gratidão por vocês.

Ao meu casal querido Lucas e Marcella, obrigada pela ajuda e amizade em todo e qualquer momento da minha vida.

Aos demais amigos e colegas do LACHEM, que fazem dos meus dias mais leves e dos meus sorrisos mais fartos. Obrigada pela amizade,

ensinamentos e momentos de descontração. Vocês todos são especiais de alguma forma.

A professora Carine Viana e à colega Fernanda Lima, pelas contribuições dadas ao longo da confecção deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria, que tem me permitido construir uma carreira profissional de qualidade.

A banca avaliadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

A Deus, por sempre guiar os meus passos em busca do melhor que posso ser.

*“Para as coisas importantes,  
Nunca é tarde demais para sermos quem queremos.  
Não há um limite de tempo, comece quando quiser.  
Você pode mudar ou não.  
Não há regras.  
Podemos fazer o melhor ou o pior.  
Espero que você faça o melhor.  
Espero que veja as coisas que o assustam.  
Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes.  
Espero que conheça pessoas com diferentes opiniões.  
Espero que viva uma vida da qual se orgulhe.  
Se você achar que não tem,  
Espero que tenha força para começar novamente.”*

*O Curioso Caso de Benjamin Button*

# RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

## **CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* RADLK E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ANTIOXIDANTE FRENTE A ESPÉCIES RADICALARES**

AUTORA: LARISSA SABO MÜLLER

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Local e data da Defesa: Santa Maria, 31 de Julho de 2013.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de metodologia em eletroforese capilar com detecção UV para a determinação de 14 antioxidantes polifenólicos em extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, planta nativa da Amazônia brasileira. O método empregando eletroforese capilar de zona (CZE) permite a determinação simultânea de 3-acetilcumarina, resveratrol, 6-hidroxicumarina, catequina, rutina, ácido ferúlico, quercitrina, canferol, fisetina, miricetina, quercetina, ácido cafeico, ácido gálico e ácido 4-hidroxicinâmico nas condições otimizadas: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade em 20 cm durante 60 s. O método foi validado nos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão e foi aplicado na análise da infusão aquosa e frações etanólica, butanólica e acetato de etila da planta. O método foi capaz de identificar os antioxidantes presentes nas amostras com alta seletividade e sensibilidade. Na infusão e nas frações etanólica e butanólica foi encontrada a presença de catequina e rutina como compostos majoritários, os quais compõem cerca de 0,5% da massa total de planta medicinal. Os extratos secos obtidos (etanólico e butanólico) possibilitaram a concentração de rutina e catequina em torno de 20 vezes em relação à planta seca. Além disso, foram realizados testes para mensurar a atividade antioxidante dos extratos frente aos radicais DPPH, ânion radical superóxido, hidroxila e peroxila. A amostra de infusão aquosa a 10% foi a que apresentou maior atividade frente à maioria dos radicais livres. Esse resultado corrobora os resultados de caracterização por eletroforese capilar, onde catequina e rutina foram determinadas em concentrações relativamente altas na infusão aquosa. Porém, todos os tratamentos das amostras apresentaram bom comportamento anti-radicalar com as metodologias aplicadas. Frente ao radical DPPH, por exemplo, a fração acetato de etila demonstrou um potencial de 94,43%. Frente aos radicais superóxido e hidroxila, a fração butanólica apresentou o melhor desempenho: 64,23% e 74,97%, respectivamente.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, eletroforese capilar, compostos polifenólicos, atividade antioxidante, detecção UV.



# ABSTRACT

Master Dissertation  
Program of Postgraduate in Pharmaceutical Science  
Federal University of Santa Maria

## **CHARACTERIZATION OF *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* RADLK EXTRACTS AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT BEHAVIOR AGAINST FREE RADICAL SPECIES**

AUTHOR: LARISSA SABO MÜLLER  
ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO  
Local and date of Defense: Santa Maria, July 31<sup>th</sup>, 2013.

This paper describes the development of methodology for capillary electrophoresis with UV detection for the determination of 14 polyphenolic antioxidants in extracts of *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, a native plant of the Amazon forest. The method using capillary zone electrophoresis (CZE) allows simultaneous determination of 3-acetylcoumarin, resveratrol, 6-hydroxycoumarin, catechin, rutin, ferulic acid, quercitrin, kaempferol, fisetin, myricetin, quercetin, caffeic acid, gallic acid and 4 hydroxycinnamic acid in the optimized conditions: borate buffer 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9.2) as work electrolyte containing 15% methanol (v/v), -20 kV potential separation, temperature 25 °C; hydrodynamic injection gravity 20 cm for 60 s. The method was validated on parameters of linearity, limit of detection, quantification limit, precision and accuracy, and was used in the analysis of aqueous infusion and ethanol, butanol and ethyl acetate plant fractions. The method was capable of identifying the antioxidants present in samples with high selectivity and sensitivity. In infusion and in ethanol and butanol fractions was found the presence of catechin and rutin as major compounds, which makes up about 0.5% of the total mass of medicinal plant. The obtained dry extracts (ethanol and butanol) allowed the concentration of rutin and catechin around 20 times compared to the dry plant. In addition, tests were performed to measure the antioxidant activity of the extracts against DPPH radical, superoxide anion radical, hydroxyl and peroxy. A sample of aqueous infusion of 10% showed the highest activity against most free radicals. It corroborates the results of characterization by capillary electrophoresis, where catechin and rutin were determined in relatively high concentrations in the aqueous infusion. But all treatments of the samples showed good antiradicalar behavior with the methodologies applied. Against DPPH, for example, the ethyl acetate fraction showed a potential of 94,43%. Against superoxide and hydroxyl radicals, the butanol fraction showed the best performance: 64,23% and 74,97%, respectively.

Keywords: Medicinal plants, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, capillary electrophoresis, polyphenolic compounds, antioxidant activity, UV/Vis detection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Representação estrutural de um flavonoide (composto polifenólico). ....  | 22 |
| <b>Figura 2</b> – Estruturas químicas das principais classes de compostos fenólicos. A: flavonoides; B: ácidos hidroxibenzóicos; C: ácidos hidroxicinâmicos; D: estilbenos; E: lignanas. (IGNAT <i>et al</i> , 2011). ....   | 24 |
| <b>Figura 3</b> – Estrutura química do resveratrol.....  | 25 |
| <b>Figura 4</b> – Estrutura química da rutina. ....  | 26 |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura química da quercitrina.....  | 27 |
| <b>Figura 6</b> – Estrutura química da miricetina. ....  | 28 |
| <b>Figura 7</b> – Estrutura química da quercetina.....   | 29 |
| <b>Figura 8</b> – Estrutura química do canferol.....   | 30 |
| <b>Figura 9</b> – Estruturas químicas da 3-acetilcumarina e 6-hidroxycumarina, respectivamente. ....   | 31 |
| <b>Figura 10</b> – Estrutura química do ácido cafeico.....   | 32 |
| <b>Figura 11</b> – Estrutura química do ácido ferúlico. ....   | 33 |
| <b>Figura 12</b> – Estrutura química da fisetina. ....   | 33 |
| <b>Figura 13</b> – Estrutura química da catequina.....   | 34 |
| <b>Figura 14</b> – Estrutura química do ácido 4 hidroxicinâmico. ....  | 35 |
| <b>Figura 15</b> – Estrutura química do ácido gálico.....  | 36 |
| <b>Figura 16</b> – Representação esquemática de equipamento de eletroforese capilar (BOONE <i>et al</i> , 1999). ....  | 37 |
| <b>Figura 17</b> – Reação química gerada no método do sequestro do radical DPPH.....   | 43 |
| <b>Figura 18</b> – Reação química envolvida no sistema hipoxantina-xantina oxidase. ....   | 43 |
| <b>Figura 19</b> – Foto do equipamento de CE construído em laboratório. ....   | 51 |
| <b>Figura 20</b> – Foto expandida do equipamento de CE com detectores UV (OceanOptics) e de detector de condutividade (C <sup>4</sup> D).....  | 52 |
| <b>Figura 21</b> – Eletroferograma dos 14 antioxidantes (50 mg L <sup>-1</sup> ) antes da otimização de parâmetros. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L <sup>-1</sup> (pH 9,2), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s..... | 57 |

**Figura 22** – Efeito da complexação do borato com os compostos polifenólicos no interior do capilar de sílica. O fluxo eletroosmótico arrasta as partículas complexadas para o cátodo, mesmo que sua tendência natural seja a atração pelo lado positivo. 58

**Figura 23** – Efeito do pH nos eletroferogramas dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante a otimização deste parâmetro; (a) pH 5, (b) pH 8, (c) pH 10. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s. ....59

**Figura 24** – Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para valores de 10-25 kV. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2), capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s. ....60

**Figura 25** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração 200mM. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) com adição de SDS 200mM, potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....61

**Figura 26** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após a adição de  $\beta$ -ciclodextrina na concentração 20mM. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo  $\beta$ -ciclodextrina na concentração 20mM, potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....62

**Figura 27** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após a adição de acetonitrila ao eletrólito. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo acetonitrila 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s. ....63

**Figura 28** – Efeito da concentração de metanol nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para valores de 5-30 (%). Condições:

eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2), capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s. ....64

**Figura 29** – Efeito da concentração de metanol nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup>, para valores de 5-30 (%) em menor escala. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2), capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....65

**Figura 30** – Eletroferograma resultante dos 14 antioxidantes (50 mg L<sup>-1</sup>) após a otimização dos parâmetros; (1) 3 acetilcumarina, (2) resveratrol, (3) 6 hidroxycumarina, (4) catequina, (5) rutina, (6) ácido ferúlico, (7) quercitrina, (8) canferol, (9) fisetina, (10) miricetina, (11) quercetina, (12) ácido cafeico, (13) ácido gálico, (14) ácido 4 hidroxicinâmico. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....65

**Figura 31** – Representação esquemática da construção da curva analítica pelo método de adição padrão. Adaptado de Ribani et al., 2004.....68

**Figura 32** – Eletroferograma dos antioxidantes (50 mg L<sup>-1</sup>) adicionados a uma amostra de infusão aquosa 5%; (1) 3 acetilcumarina, (2) resveratrol, (3) 6 hidroxycumarina, (4) catequina, (5) rutina, (6) ácido ferúlico, (7) quercitrina, (8) canferol, (9) fisetina, (10) miricetina, (11) quercetina, (12) ácido cafeico, (13) ácido gálico, (14) ácido 4 hidroxicinâmico. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....70

**Figura 33** – Eletroferogramas obtidos após injeção das amostras (a) Infusão 0,5%, (b) SPE em C18 da infusão 20%, (c) hidrólise alcalina da planta bruta, (d) extrato bruto etanólico ressuspendido em metanol na concentração 5%, (e) fração butanólica do extrato, ressuspendido em metanol na concentração 5%, (f) fração acetato de etila do extrato ressuspendido em metanol na concentração 5%.

Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s. ....71

**Figura 34** – Eletroferogramas obtidos para confirmação dos compostos catequina (1) e rutina (2) nas amostras; (a) Infusão 5%, (b) fração bruta etanólica ressuspensa em metanol na concentração 1,5% (c) fração butanólica ressuspensa em metanol na concentração 4%. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm; detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....72

**Figura 35** – Atividade antioxidante frente ao radical DPPH das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).....77

**Figura 36** – Atividade antioxidante frente ao ânion radical superóxido das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).....78

**Figura 37** – Atividade antioxidante frente ao radical hidroxila das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).....78

**Figura 38** – Atividade antioxidante da infusão aquosa na concentração 10% frente aos radicais DPPH, superóxido, hidroxila e peroxila. ....79

**Figura 39** – Atividade antioxidante da infusão aquosa e frações frente ao radical hidroxila.....80

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.....   | 23 |
| <b>Tabela 2</b> – Padrões de antioxidantes utilizados no desenvolvimento do trabalho. ...   | 48 |
| <b>Tabela 3</b> – Resultado dos parâmetros de validação do método. ....   | 69 |
| <b>Tabela 4</b> – Teor dos compostos catequina e rutina encontrados nos extratos de <i>Conarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> . .... | 73 |
| <b>Tabela 5</b> – Teor dos compostos catequina e rutina nos extratos secos e fator de concentração em relação à planta total.....               | 74 |
| <b>Tabela 6</b> – Distribuição dos compostos catequina e rutina em porcentagem nas frações etanólica e butanólica. ....                         | 75 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

|               |   |
|---------------|---|
| <b>DNA</b>    | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| <b>EROS</b>   | Espécies Reativas de Oxigênio                             |
| <b>DPPH</b>   | 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazila                            |
| <b>EDTA</b>   | Ácido Etilenodiamino Tetracético                          |
| <b>UV</b>     | Ultravioleta  |
| <b>HIV</b>    | Vírus da Imunodeficiência Humana                          |
| <b>CE</b>     | Eletroforese Capilar                                      |
| <b>EOF</b>    | Fluxo Eletroosmótico                                      |
| <b>CCD</b>    | Cromatografia de Camada Delgada                           |
| <b>CLAE</b>   | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                  |
| <b>LC-MS</b>  | Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas |
| <b>CE-UV</b>  | Eletroforese Capilar com Detecção Ultravioleta            |
| <b>UV-VIS</b> | Ultravioleta-Visível                                      |
| <b>RNA</b>    | Ácido Ribonucleico  |
| <b>HPX</b>    | Hipoxantina   |
| <b>XOD</b>    | Xantina Oxidase   |
| <b>MDA</b>    | Malondialdeído  |
| <b>DCFH</b>   | Diclorofluoresceína                                       |
| <b>NaOH</b>   | Hidróxido de Sódio  |
| <b>CZE</b>    | Eletroforese Capilar de Zona                              |
| <b>pH</b>     | Potencial Hidrogeniônico                                  |
| <b>TBA</b>    | Ácido Tiobarbitúrico                                      |
| <b>TCA</b>    | Ácido Tricloroacético                                     |
| <b>pKa</b>    | Constante de Dissociação Ácida                            |
| <b>SDS</b>    | Dodecil Sulfato de Sódio                                  |
| <b>MECC</b>   | Eletrocromatografia Micelar                               |
| <b>LQ</b>     | Limite de Quantificação                                   |
| <b>ICH</b>    | Conferência Internacional em Harmonização                 |
| <b>LD</b>     | Limite de Detecção  |
| <b>CV</b>     | Coeficiente de Variação                                   |

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| • 1 INTRODUÇÃO .....  | 17 |
| • 2 OBJETIVOS .....   | 19 |
| • 2.1 OBJETIVO GERAL .....  | 19 |
| • 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 19 |
| • 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 21 |
| • 3.1 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS.....  | 21 |
| • 3.1.1 Resveratrol.....  | 24 |
| • 3.1.2. Rutina.....  | 26 |
| • 3.1.3. Quercitrina.....   | 27 |
| • 3.1.4. Miricetina.....  | 28 |
| • 3.1.5. Quercetina.....  | 29 |
| • 3.1.6. Canferol.....  | 30 |
| • 3.1.7. Cumarinas.....   | 30 |
| • 3.1.8. Ácido cafeico.....   | 31 |
| • 3.1.9. Ácido ferúlico.....  | 32 |
| • 3.1.10. Fisetina.....   | 33 |
| • 3.1.11. Catequina.....  | 34 |
| • 3.1.12. Ácido 4hidroxicinâmico.....   | 34 |
| • 3.1.13. Ácido Gálico.....   | 35 |
| • 3.2 ELETROFORESE CAPILAR.....   | 36 |
| • 3.2.1 Eletroforese capilar para separação de substâncias fitoquímicas.....                                | 37 |
| • 3.2.2 Eletroforese Capilar com Detecção Ultravioleta (CE-UV) .....  | 38 |
| • 3.3 MÉTODOS <i>IN VITRO</i> UTILIZADOS PARA MEDIDA DA ATIVIDADE ANTIRADICALAR EM PLANTAS MEDICINAIS ..... | 40 |
| • 3.3.1 Radicais livres.....  | 40 |
| • 3.3.2 Antioxidantes.....  | 41 |
| • 3.3.3 Metodologias.....   | 42 |
| • 3.4 <i>CONNARUS PERROTTETII</i> VAR. <i>ANGUSTIFOLIUS</i> RADLK E SUA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA .....       | 45 |



|   |   |           |
|---|---|-----------|
| • | <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>47</b> |
| • | <b>4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....</b>  | <b>47</b> |
| • | <b>4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES .....</b>   | <b>48</b> |
| • | <b>4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....</b>  | <b>49</b> |
| • | 4.3.1 <i>Preparo das Amostras.....</i>  | <i>49</i> |
| • | 4.3.2 <i>Determinações por Eletroforese Capilar (CE) .....</i>  | <i>51</i> |
| • | 4.3.3 <i>Atividade Antioxidante Frente a Espécies Radicais .....</i>  | <i>53</i> |
| • | <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>56</b> |
| • | <b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE <i>CONNARUS PERROTTETII</i> VAR. <i>ANGUSTIFOLIUS</i> RADLK POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA COM DETECÇÃO UV .....</b> | <b>56</b> |
| • | 5.1.1 <i>Otimização da separação eletroforética .....</i>   | <i>56</i> |
|   | 5.1.1.1 <i>Efeito do tampão e pH do eletrólito .....</i>  | <i>57</i> |
|   | 5.1.1.2 <i>Efeito do potencial de separação .....</i>   | <i>59</i> |
|   | 5.1.1.3 <i>Efeito de aditivos no tampão borato .....</i>  | <i>60</i> |
| • | 5.1.2 <i>Validação da metodologia desenvolvida .....</i>  | <i>66</i> |
| • | 5.1.3 <i>Aplicação do método na determinação dos polifenóis em extratos de <i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> Radlk .....</i>            | <i>70</i> |
| • | <b>5.2 ATIVIDADE ANTI-RADICALAR DE EXTRATOS DE <i>CONNARUS PERROTTETII</i> VAR. <i>ANGUSTIFOLIUS</i> RADLK.....</b>   | <b>76</b> |
| • | 5.2.1 <i>Radical DPPH .....</i>   | <i>76</i> |
| • | 5.2.2 <i>Radical Superóxido .....</i>   | <i>77</i> |
| • | 5.2.3 <i>Radical Hidroxila .....</i>  | <i>78</i> |
| • | 5.2.4 <i>Atividade anti-radicalar da infusão .....</i>  | <i>79</i> |
| • | <b>6 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>81</b> |
| • | <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>83</b> |
| • | <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>85</b> |

## • 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pela descoberta de novos antioxidantes de fontes naturais, pelo fato de os mesmos apresentarem propriedades de prevenção sobre a deterioração fisiológica de organelas, minimizando o efeito oxidativo provocado pelos radicais livres nas células vivas, evitando assim, possíveis danos causados ao DNA.

A formação de radicais livres, moléculas que possuem um elétron livre em sua órbita mais externa, pode ocorrer tanto durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular, bem como pela exposição a fatores externos. Neste contexto, matrizes vegetais são ricas em substâncias benéficas à saúde humana e animal, e dentre elas encontramos os polifenóis, substâncias antioxidantes produzidas como metabólitos secundários, que podem prevenir ou minimizar os danos oxidativos.

Diversos métodos vêm sendo utilizados para mensurar e caracterizar a atividade que esses compostos exercem dentro de uma matriz vegetal frente a diferentes espécies de radicais livres. Eles são utilizados em larga escala, afim de posterior comparação de resultados para melhor elucidação do potencial antioxidante. Os métodos geralmente envolvem a formação de um radical estável em que a detecção do ponto final da reação se realiza por medida da absorvância em espectrofotômetro ou fluorímetro.

Além disso, faz-se necessário o uso de uma metodologia analítica que possa elucidar qualitativamente e quantitativamente os compostos envolvidos nessa reação e que ativam o poder antioxidante de determinada planta. O desenvolvimento de metodologia analítica aplicando eletroforese capilar mostra boa aptidão para a análise em questão, por ser uma técnica de separação com alto poder de resolução e poder ser facilmente aplicada em amostras complexas como extratos de plantas.

O objeto de estudo desta pesquisa foi a espécie *Conarus perrottetti* var. *angustifolius* Radlk, também conhecida por “Barbatimão do Pará” sobre a qual praticamente inexistem relatos na literatura retratando a presença e investigação de sua atividade antioxidante. Isto posto, seu potencial terapêutico

foi estudado neste trabalho através do comportamento frente a espécies radicalares e caracterizado por método eletroforético que possibilitou a separação de 14 compostos polifenólicos.

## • 2 OBJETIVOS

### • 2.1 Objetivo Geral

Estudar a atividade antioxidante total de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk (Barbatimão do Pará) frente a diferentes radicais livres gerados por métodos *in vitro* para diferentes espécies reativas de oxigênio (EROS) e caracterizar os extratos empregando Eletroforese Capilar.

### • 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade antioxidante total de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk pelo método baseado na captura do radical DPPH•.

- Investigar a atividade antioxidante total de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk pelo método *in vitro* baseado na geração do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por sistema enzimático com detecção espectrofotométrica.

- Investigar a atividade antioxidante total de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk pelo método *in vitro* baseado na geração do radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ) pelo método ABAP com detecção fluorimétrica.

- Investigar a capacidade antioxidante total de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk pelo método *in vitro* baseado na formação do radical hidroxila gerado por ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe-EDTA.

- Caracterizar e quantificar os compostos responsáveis pela atividade antioxidante (marcadores) nos extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk empregando eletroforese capilar com detecção ultravioleta (UV).

## • 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

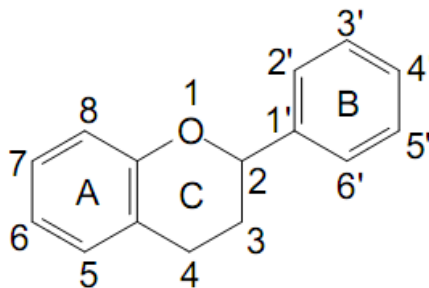
### • 3.1 Compostos polifenólicos

Compostos polifenólicos são definidos como um grupo de compostos de origem natural comumente encontrado em plantas superiores com valor sintético, medicinal e industrial. São conhecidos por possuírem inúmeras atividades biológicas (TÜCKMANTEL *et al.*, 1999). Sua estrutura é caracterizada pela presença de vários grupos hidroxila em anéis aromáticos e é de acordo número de anéis de fenol e as moléculas ligadas a eles que os compostos polifenólicos são subdivididos em classes distintas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007, BRAVO, 1998; MANSON, 1998).

São metabólitos secundários de plantas encontrados em frutas e vegetais como maçã, cana de açúcar, folhas de chá, café e cacau (FRIEDMAN & JÜRGENS, 2002). Sua principal importância fisiológica é a atividade antioxidante, que está baseada na sua capacidade de captar radicais livres através da complexação de metais pró-oxidantes. Também atua como agente redutor e supressor de formação de oxigênio, protegendo assim o corpo contra doenças degenerativas (GÖKMEN *et al.*, 2003).

Os radicais livres são átomos ou moléculas com um elétron desemparelhado, que faz com que sejam altamente reativos com espécies químicas e potencialmente perigosos aos tecidos vivos (ZHAO *et al.*, 1995). Plantas com alto teor de compostos polifenólicos apresentam excelente atividade antioxidante (CAI *et al.*, 2004).

Geralmente, a atividade antioxidante depende do número e das posições dos grupos hidroxila e outros substituintes, e da glicosilação das moléculas. A presença de determinados grupos no núcleo aumenta a atividade antioxidante. Substituições no anel B e no anel A, bem como a ligação dupla 2, 3 (insaturação) e o grupo oxo no anel C também podem afetar a capacidade antioxidante. A glicosilação geralmente a diminui (CAI *et al.*, 2006).



**Figura 1** – Representação estrutural de um flavonoide (composto polifenólico).

Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram sua capacidade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). De maneira geral, a ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada com a sua atividade antiinflamatória e com a atividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a ação de radicais livres no organismo. Uma vez que protegem moléculas como o DNA, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos (SILVA *et al.*, 2010).

Ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo (SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. 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).

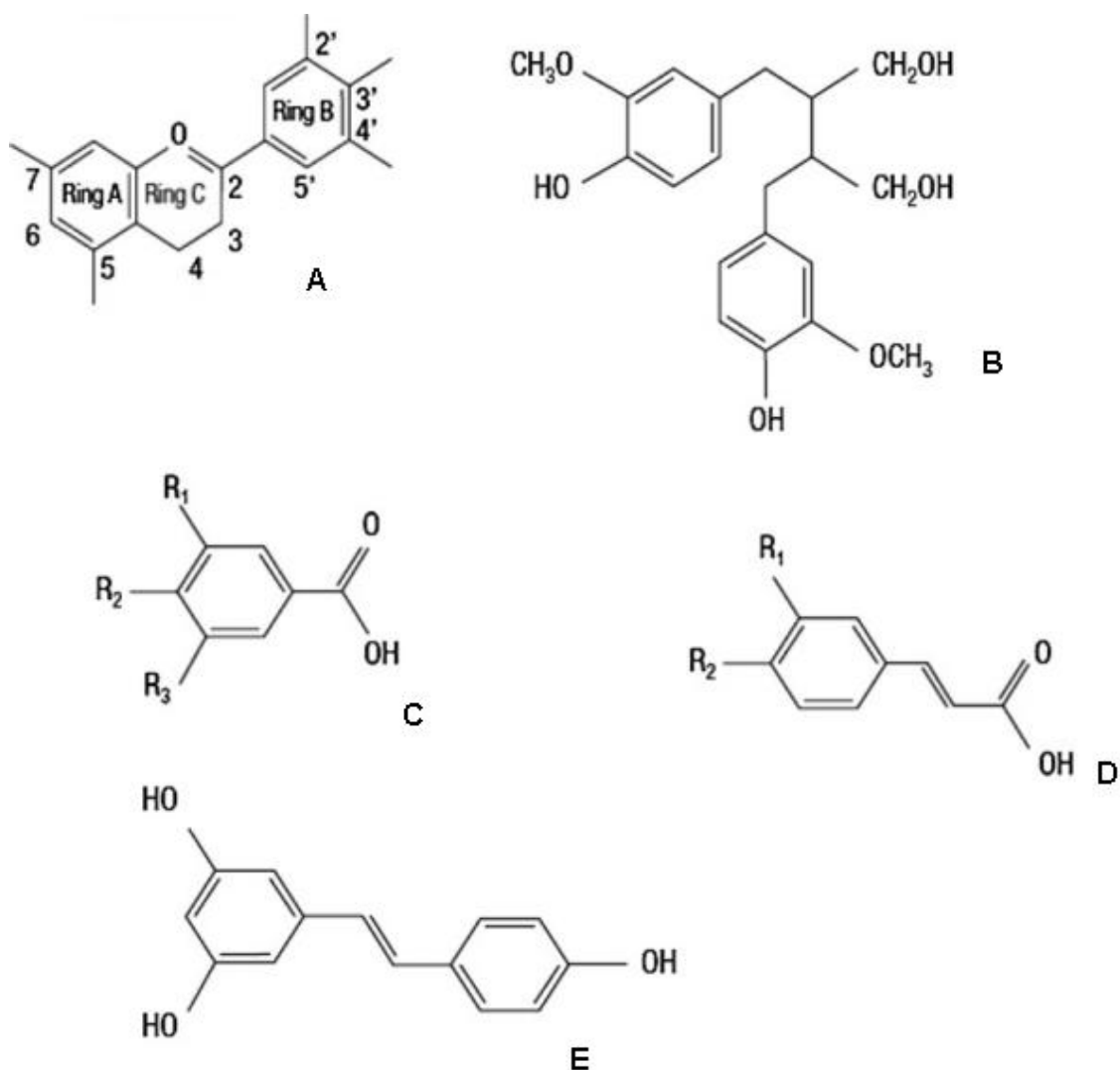
A tabela 1 mostra a classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico presente em sua estrutura, seguida de algumas de suas estruturas, representadas na figura 2.

**Tabela 1** – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

| <b>Esqueleto básico</b> | <b>Classe de compostos fenólicos</b>   |
|-------------------------|--|
| C6                      | Fenóis simples, benzoquinonas  |
| C6-C1                   | Ácidos fenólicos   |
| C6-C2                   | Acetofenonas e ácidos fenilacéticos  |
| C6-C3                   | Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas |
| C6-C4                   | Naftoquinonas  |
| C6-C1-C6                | Xantonas   |
| C6-C2-C6                | Estilbenos, antraquinonas  |
| C6-C3-C6                | Flavonóides e isoflavonóides   |
| (C6-C3) <sub>2</sub>    | Lignanas   |
| (C6-C3-C6) <sub>2</sub> | Diflavonóides  |
| (C6) <sub>n</sub>       | Melaninas vegetais   |
| (C6-C3) <sub>n</sub>    | Ligninas   |
| (C6-C1) <sub>n</sub>    | Taninos hidrolisáveis  |
| (C6-C3-C6) <sub>n</sub> | Taninos condensáveis   |

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010





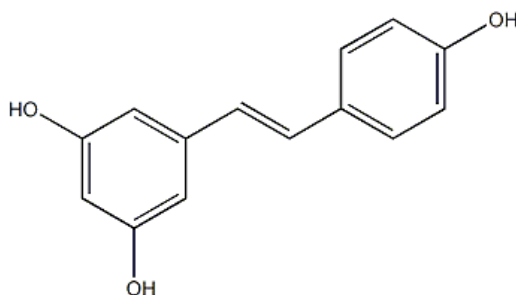
**Figura 2** – Estruturas químicas das principais classes de compostos fenólicos. A: flavonoides; B: ácidos hidroxibenzoicos; C: ácidos hidroxicinâmicos; D: estilbenos; E: lignanas. (IGNAT *et al*, 2011).

- 3.1.1 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) (figura 3) é produzido por diversas espécies de plantas, como uvas, amoras e amendoins. Foi primeiramente detectado nas raízes de *Veratrum grandiflorum* (LANGCAKE & PRYCE, 1977) em 1940, sendo que seu primeiro benefício farmacológico descoberto no corpo humano foi relacionado à diminuição da incidência de doenças coronarianas (NDIAYE *et al.*, 2011).

Um número crescente de estudos tem examinado propriedades farmacológicas do resveratrol relacionadas a muitas doenças humanas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças degenerativas e câncer. Ao passo que a inflamação pode conduzir a um estresse oxidativo, em um ciclo associado a muitas doenças, os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios do resveratrol desempenham um papel importante no processo terapêutico, ainda que se desconheça por completo seus mecanismos de ação (WU *et al.*, 2013).

O resveratrol é conhecido há muito tempo na terapêutica medicinal Oriental, sendo utilizado pelos chineses e japoneses para o tratamento de arteriosclerose, de doenças inflamatórias e alérgicas. Suas características polifenólicas permitem explicar suas atividades anti-agregação plaquetária, antioxidante e redutora de triglicerídeos. Sua ação sobre radicais livres lhe confere a propriedade de retardar o envelhecimento celular e orgânico. Do ponto de vista científico, o resveratrol diminui os níveis de lipídeos no soro sanguíneo e a agregação plaquetária, aumenta o colesterol HDL, que ajuda a remover o colesterol LDL do sangue e a prevenir a obstrução das artérias (DAVID *et al.*, 2007).



**Figura 3** – Estrutura química do resveratrol.

Sua estrutura molecular é similar à estrutura do estrogênio sintético, o dietilestilbestrol. Portanto, tem propriedades farmacológicas similares à do estradiol, principal estrogênio humano natural (DAVID *et al.*, 2007).

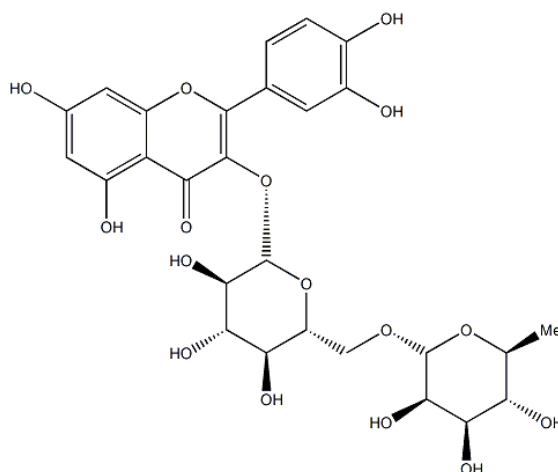
Além das atividades descritas acima, o resveratrol está sendo examinado na sua habilidade analgésica, de inibição do crescimento de

bactérias que causam úlceras de estômago e que podem provocar o câncer (*Helicobacter pylori*), de proteger o DNA, de proteger contra o câncer de pele, de retardar o envelhecimento orgânico e celular. Atualmente também está sendo testado para herpes oral. Dessa forma, o resveratrol pode representar uma solução moderna para muitos problemas comuns de envelhecimento, encontrados pelos humanos (PIVETA, 2005).

Nos ainda limitados estudos farmacocinéticos em animais e humanos, há relatos de que o resveratrol é absorvido no trato gastrointestinal após a sua ingestão. Entretanto, a eficiência de sua absorção, bem como sua distribuição, metabolismo e excreção não são bem conhecidas (DAVID *et al.*, 2007).

- 3.1.2. Rutina

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) (figura 4), flavonóide da classe dos flavonóis, é empregada como antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, causando grande interesse em utiliza-la em formulações cosméticas (BABY *et al.*, 2008; PEDRIALI, 2005).



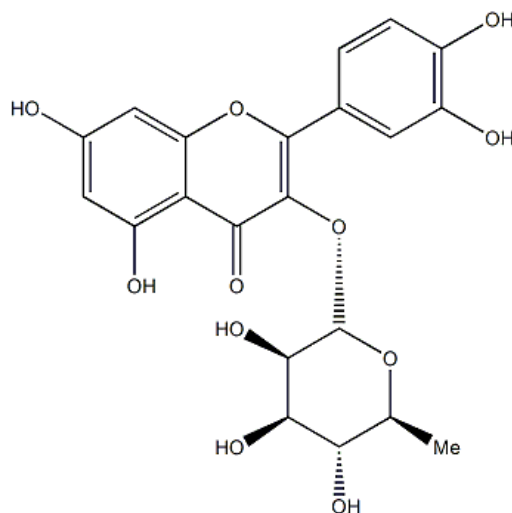
**Figura 4** – Estrutura química da rutina.

A rutina tem sido considerada um antilipoperoxidante, pois pode neutralizar radicais hidroxil e superóxido. O mesmo autor compara ainda o efeito do alfa tocoferol, do ácido ascórbico e da rutina no processo de peroxidação, onde a rutina foi o inibidor mais potente de radicais livres (RODRIGUES *et al.*, 2003).

É o composto responsável pelo efeito antiinflamatório e analgésico de *Baccharis trimera* (BORELLA & FONTOURA, 2002). Apresenta atividade antioxidante sobre o radical hidroxil superior ao antioxidante manitol, um conhecido seqüestrador de radicais hidroxila (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

- 3.1.3. Quercitrina

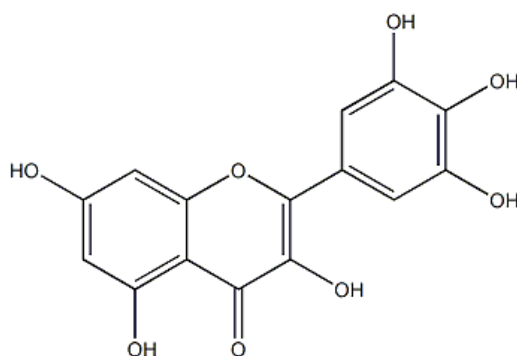
A quercitrina (figura 5) é uma forma glicosilada do flavonóide quercetina. Apresenta efeito antioxidante, mediado por diferentes mecanismos. Também é reconhecido seu efeito preventivo da peroxidação lipídica a partir de alguns agentes pró-oxidantes (WAGNER, 2007).



**Figura 5** – Estrutura química da quercitrina.

- 3.1.4. Miricetina

A miricetina (figura 6) apresenta uma ação antioxidante mais efetiva que a quercetina e esta apresenta capacidade antioxidante cinco vezes superior à do ácido ascórbico. A miricetina apresenta também benefícios quando conjugada com a vitamina E e C (CAZARIN & SARIDAKIS, 2007).



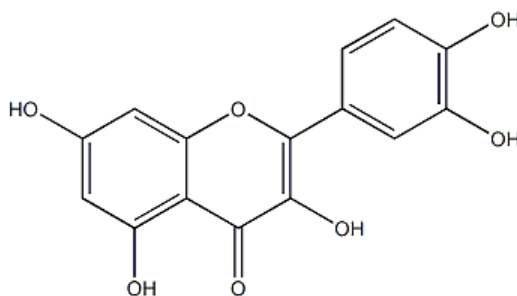
**Figura 6** – Estrutura química da miricetina.

O flavonóide miricetina foi mais efetivo do que o ácido ascórbico na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo  $H_2O_2$  no DNA de linfócitos humanos (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A miricetina também exerce ação hipoglicêmica mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influenciando no metabolismo e estoque de glicogênio hepático. O tratamento de ratos diabéticos por dois dias com miricetina (3 mg a cada 12h) além de reduzir a hiperglicemia em 50%, aumentou o conteúdo de glicogênio e glicose-6-fosfato hepático, no entanto, não alterou o conteúdo de glicogênio muscular. Esse tratamento restaurou o conteúdo de glicogênio dos animais diabéticos em aproximadamente 37% e de glicose-6-fosfato em 36% sem apresentar efeitos em animais normais (ZANATTA, 2007).

- 3.1.5. Quercetina

A quercetina (figura 7) está presente nas frutas e vegetais, e é o flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (BIANCHI & ANTUNES, 1999).



**Figura 7** – Estrutura química da quercetina.

É um dos flavonóides mais estudados e numerosos experimentos tem reportados suas propriedades farmacológicas, biológicas e medicinais (BRAGANHOL, 2006).

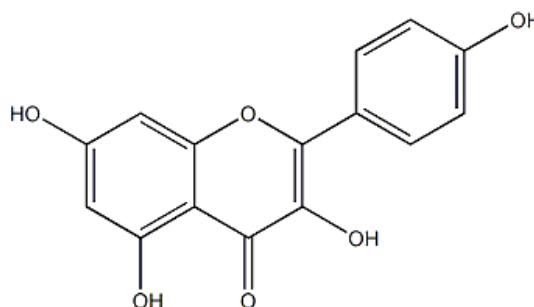
A quercetina é um dos flavonóis mais importantes da dieta alimentar. Estudos realizados mostram que ela exerce efeito protetor de células de leveduras de danos oxidativo induzidos por  $H_2O_2$  e aumenta a sua longevidade.

Além disso, a quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático e induzindo as enzimas glicocinase e hexocinase hepáticas (ZANATTA, 2007).

A quercetina também atua no impedimento da inativação de receptores de acetilcolina muscarínicos e na inibição moderada da agregação de  $A\beta$  e de CDK5, que são importantes mediadores da doença de Alzheimer, podendo ser utilizada como coadjuvante em seu tratamento (MELO & COSTA, 2005).

- 3.1.6. Canferol

O canferol (figura 8) é um flavonol considerado carcinogênico. Apresenta grande capacidade antioxidante, maior que de flavonóides conjugados, como a quercetina-3-glicosídica, quercetina e rutina (DORNAS *et al.*, 2007).



**Figura 8** – Estrutura química do canferol.

Derivados do canferol presentes nas plantas sugerem uma possível ação benéfica nos casos de conjuntivite e infecções nos olhos. No entanto, a literatura não apresenta dados que forneçam uma possível explicação para a utilização de espécies que o contenham em casos de doenças do estômago, azia e dor de ouvido (BARROS *et al.*, 2008).

Melo e Costa (2005) descrevem o efeito do canferol na inibição moderada da agregação de A $\beta$  e de CDK5, que são importantes mediadores da doença de Alzheimer, auxiliando, portanto, no seu tratamento.

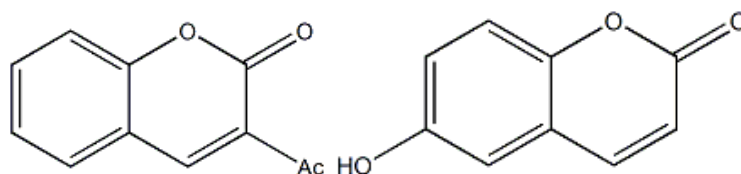
- 3.1.7. Cumarinas

Cumarinas (figura 9) são compostos fitoquímicos heterocíclicos oxigenados amplamente distribuídos no reino vegetal natural e encontrados em altas concentrações em grama de baunilha, aspérula, verbasco, lavanda, alcaçuz, morangos, damascos, cerejas, cinamomos e trevo doce, tendo como

característica principal o sabor de baunilha. As cumarinas apresentam um aroma doce, razão pela qual são comumente usadas na confecção de perfumes. Têm estrutura polifenólica e seu uso na medicina tradicional já é relatada há muitos séculos (ARJUNAN *et al.*, 2013).

São dotadas de uma grande variedade de atividades biológicas e apresentam vasta gama de propriedades terapêuticas. Derivados de cumarinas possuem diferentes atividades farmacológicas como: antiinflamatória, bactericida, vasorelaxante, agente contra o vírus da hepatite C, atividade antiproliferativa, inibidor da xantina oxidase, antidiabética, anticancerígena, anti HIV, anticoagulante e espasmolítica.

São amplamente utilizados como aditivos em alimentos, perfumes, cosméticos, inseticidas e em branqueadores ópticos. A cumarina é utilizada na indústria farmacêutica como uma molécula precursora na síntese de um número de anticoagulantes sintéticos (ARJUNAN *et al.*, 2013).

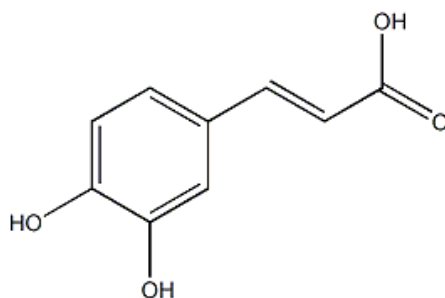


**Figura 9** – Estruturas químicas da 3-acetilcumarina e 6-hidroxycumarina, respectivamente.

- 3.1.8. Ácido cafeico

O ácido caféico (figura 10) é o composto mais comumente encontrado dentre os ácidos hidroxicinâmicos, e de maior representatividade na dieta humana.





**Figura 10** – Estrutura química do ácido cafeico.

Numerosas atividades biológicas são atribuídas ao ácido cafeico: antiviral, antibacteriana, antiinflamatória e antioxidante (SAFRA *et al.*, 2007).

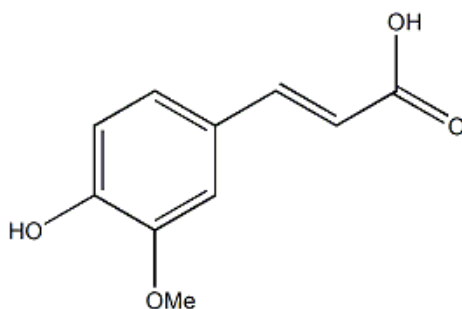
Os estudos acerca dos efeitos fisiológicos do ácido cafeico incluem relatos sobre a sua capacidade de atuar como antiinflamatório, inibidor da xantina-oxidase, ligante metálico e como agente protetor contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio.

Estudos com este composto em sistemas lipídicos indicaram um potencial deste polifenol em atenuar na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e mesmo inibir a oxidação de LDL catalisada por íons metálicos.

- 3.1.9. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (figura 11) é um polifenol natural pertencente a classe dos ácidos hidrocixinâmicos, exerce efeito antioxidante, hipotensivo e antiinflamatório de acordo com alguns estudos publicados na literatura. Também pode exercer um efeito benéfico na prevenção da neuropatia diabética em ratos, efeito esse muito mais exacerbado quando comparado ao do alfa-tocoferol em função do efeito exercido pelo mesmo na redução do stress oxidativo gerado por este processo.

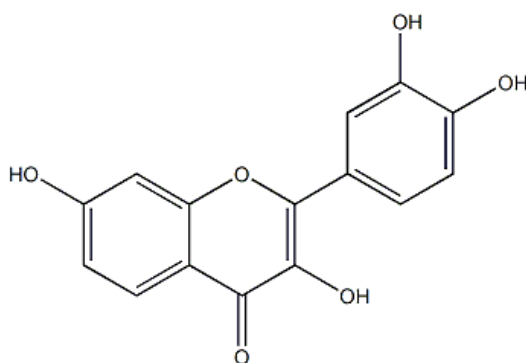
Os ésteres ferúlicos possuem potencial atividade antitumoral, atuando em linhagens de células cancerosas de pulmão, cólon, mama e melanoma.



**Figura 11** – Estrutura química do ácido ferúlico.

- 3.1.10. Fisetina

A fisetina (3,30,40,7-tetraidroxiflavona) (figura 12) é um flavonoide encontrado em morangos, cebola e caqui. Este composto possui propriedades farmacológicas importantes como efeitos antiinflamatórios e anticarcinogênicos, além de limitar as complicações da diabetes (PRASATH & SUBRAMANIAN, 2013)



**Figura 12** – Estrutura química da fisetina.

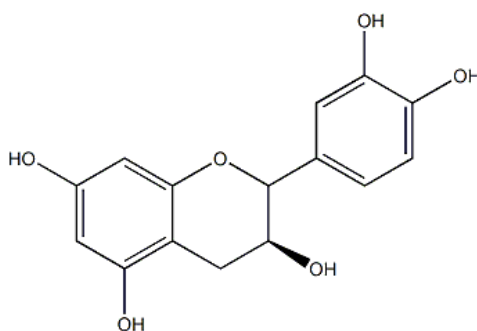
A fisetina promove a diferenciação das células nervosas e estudos têm mostrado que este composto pode ativar a sinalização de vias em fatias de hipocampo que levam ao desenvolvimento da memória a longo prazo (MAHER *et al.*, 2006).

A fisetina é encontrada principalmente em frutas, vegetais, nozes e vinho e dispõe de uma variedade de efeitos biológicos incluindo atividade antioxidante e antiinflamatória. A atividade antiangiogênica da fisetina também já foi documentada através de experimentos *in vitro* e *in vivo* em ratos.

O mecanismo de ação deste composto é complexo e parece estar relacionado com a inibição de moléculas alvo e rotas, incluindo as quinases ciclina-dependentes (SEGUIN *et al.*, 2013).

- 3.1.11. Catequina

É um composto químico polifenólico abundante no chá verde, cacau, uva e maçã (SAUL *et al.*, 2009) (figura 13). Dentre seus efeitos fisiológicos estão atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral. Estudos recentes têm sugerido que a catequina também promove uma boa saúde oral e contribui para a redução do risco de algumas doenças sistêmicas (TAMURA & OCHIAI, 2012).



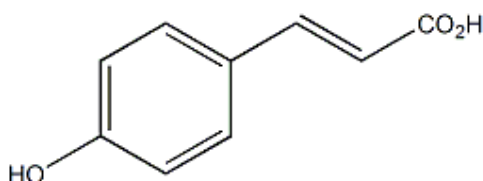
**Figura 13** – Estrutura química da catequina.

- 3.1.12. Ácido 4hidroxicinâmico

Ácidos hidroxicinâmicos são muito comuns em frutas e vegetais na forma de ésteres ou glicosídeos. Certos ácidos cinâmicos se comportam como

precursores de sabor, visto que eles têm capacidade de quebrar sua estrutura e formar novas moléculas com sabor mais ameno (RIZZI & BOEKLEY, 1992). O ácido 4 hidroxicinâmico (figura 14) em especial, é um ácido fenólico de grande interesse, devido a suas propriedades quimio-protetora e antioxidante (TORRES y TORRES & ROSAZZA, 2001).

Ele exerce sua capacidade antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, e mostra um efeito protetor contra danos oxidativos induzidos por radiações ultravioleta (OU *et al.*, 2009).

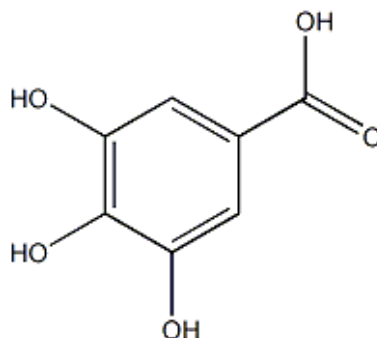


**Figura 14** – Estrutura química do ácido 4 hidroxicinâmico.

- 3.1.13. Ácido Gálico

O ácido gálico (ácido 3,4,5 triidroxibenzóico) (figura 15) é um fenol de ocorrência natural presente em muitas frutas, vegetais e produtos derivados (chás, vinhos, etc.). É muito bem absorvido em humanos, sendo que concentrações micromolares das formas livres de ácido gálico e seus principais metabólitos têm sido encontrados em plasma sanguíneo humano após a ingestão de alimentos ricos em ácido gálico.

O ácido gálico tem sido descrito como um antioxidante natural forte, e que é capaz de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROS), como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (GIL-LONGO & GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2010).



**Figura 15** – Estrutura química do ácido gálico.

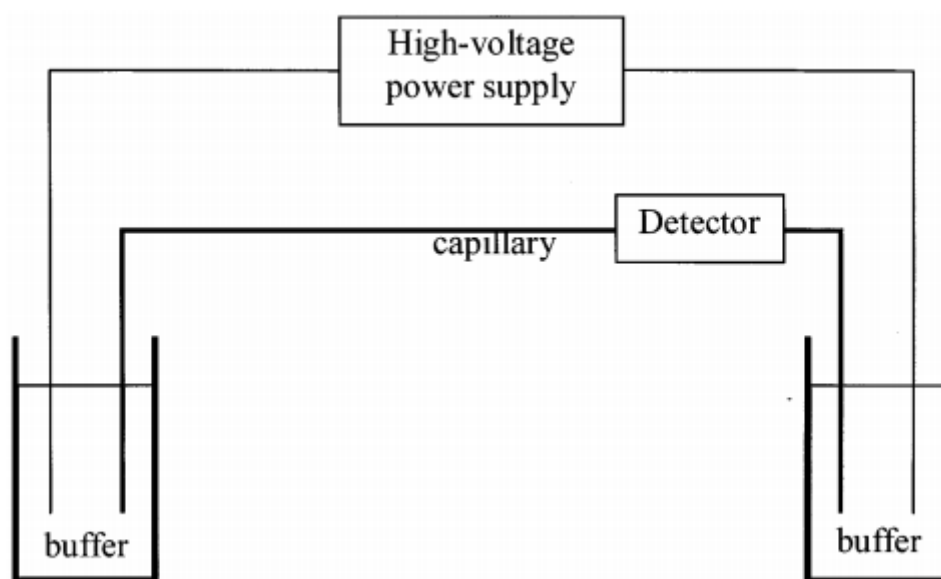
### • 3.2 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) é uma evolução instrumental das tradicionais técnicas de eletroforese em gel. Desde sua introdução, a CE tem demonstrado um grande potencial não somente na análise de biopolímeros, na qual a eletroforese vem sendo aplicada há muito tempo, mas também em áreas onde a técnica eletroforética nunca havia sido utilizada (TAGLIARO *et al.*, 1998).

A CE apresenta inúmeras vantagens sobre os demais métodos analíticos e por esse motivo tem sido muito empregada na determinação de uma variedade de amostras complexas. Suas características mais relevantes são a alta eficiência de separação, baixo consumo de reagentes e amostras, tempos de análise reduzidos, simplicidade do equipamento utilizado e alto grau de automação (CARVALHO *et al.*, 2009).

É uma técnica de separação que se baseia na migração de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico (TAVARES, 1996). A separação é conduzida em tubos (capilares) preenchidos com um eletrólito condutor (TAVARES, 1997). O fluxo eletroosmótico, o EOF (fluxo de solução induzido pelo campo elétrico), também afeta a migração dos compostos e confere à técnica parte de suas características de alta eficiência. A presença do EOF é muito importante uma vez que diminui consideravelmente o tempo de análise de compostos que possuam mobilidade no mesmo sentido da mobilidade do fluxo e permite que moléculas neutras se movam no interior do capilar (SILVA, 2001).

Uma representação esquemática de um sistema CE é dada na figura 16. Os analitos são separados em capilar de pequeno diâmetro (20 a 100cm de comprimento e 25 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) sob a influência de um campo elétrico de alta voltagem (10-30kV). As amostras são introduzidas tanto por técnica eletrocinética como por via hidrodinâmica. Um sistema de detecção é empregado no final do capilar para quantificação ou identificação dos compostos separados (BOONE *et al.*, 1999).



**Figura 16** – Representação esquemática de equipamento de eletroforese capilar (BOONE *et al.*, 1999).

- 3.2.1 Eletroforese capilar para separação de substâncias fitoquímicas

Atualmente, a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais é assunto de interesse mundial, uma vez que possuem bioatividades úteis para vários sintomas. A análise e avaliação da qualidade dessas substâncias são essenciais, a fim de proporcionar a maior eficácia, eficiência e segurança aos consumidores (SUNTORNUSUK, 2002). A eletroforese capilar é um método micro-analítico aplicável para a análise de uma vasta gama de compostos,

incluindo os produtos naturais (ROBARDS & ANTOLOVICH, 1997) e metabólitos de plantas (TOMÁS-BARBERÁN, 1995). Portanto, o método pode ser utilizado como uma alternativa para análise de substâncias fitoquímicas (SUNTORNSUK, 2002).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para análise de polifenóis em matrizes vegetais: cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) são os métodos analíticos mais eficientes de separação (WATANABE & TERABE, 2000).

A técnica cromatográfica mais comumente aplicada para a determinação de antioxidantes em alimentos, sedimentos de plantas e extratos vegetais (ARLORIO *et al.*, 2000; BUIARELLI *et al.*, 1995; CHEM & ADAMS, 1999; DELAGE *et al.*, 1991; KLEDJUS & KUBA'N, 2000; LOBO *et al.*, 2000; PERRY *et al.*, 2001) é a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. No entanto, a eletroforese capilar surge como uma técnica complementar à CLAE para a determinação destes compostos, devido a características especiais, como eficiência de separação, curto tempo de análise e simplicidade (HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*; 2005).

Algumas modificações da CE tradicional permitem a separação de um grande número de fenóis em um curto período de tempo (CANALS *et al.*, 2002). Muitos são os estudos aplicando eletroforese capilar para a detecção de polifenóis (VAHER & KOEL, 2003; PAZOUREK *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2008; HURTADO-FERNANDÉZ *et al.*, 2010; BALLUS *et al.*, 2012;), porém ainda há muito pouco na literatura a respeito de separação destes compostos com detecção por eletroforese capilar com detecção ultravioleta.

- 3.2.2 Eletroforese Capilar com Detecção Ultravioleta (CE-UV)

Devido à sua sensibilidade a uma vasta gama de compostos e grupos funcionais e a facilidade de uso, o detector com absorvância UV-VIS tem se tornado um princípio de detecção muito popular, ainda que apresente baixa sensibilidade quando comparado a outros métodos de detecção desenvolvidos

para sistemas separação por eletroforese capilar, como as detecções eletroquímica, por espectrometria de massas e fluorimétrica (KUHN & HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Por absorvância UV-VIS, as substâncias podem ser registradas se apresentarem ao menos um dos seguintes grupos funcionais:

- bromo, iodo ou enxofre
- duas ligações duplas conjugadas
- um grupo carbonila
- um anel aromático

Esses grupos funcionais não absorvem todos na mesma intensidade ou no mesmo comprimento de onda. A intensidade da absorvância e a posição de absorvância máxima também são influenciadas por outros átomos da molécula (KUHN & HOFFSTETTER-KUHN, 1993).

As razões para a popularidade deste tipo de detector são inúmeras:

- a detecção pode ser realizada diretamente na coluna, isto é, diretamente no capilar, e sem a necessidade de contato físico entre o canal de separação e o sistema de medição. Trabalhando na coluna, a zona de alargamento do detector pode ser facilmente desprezível. Devido à ausência de contato físico com o meio de separação, não há problemas de interferência da alta voltagem usada, com a sensibilidade da detecção.

- a sílica fundida, material do qual os capilares utilizados em CE são comumente fabricados, é um material parecido com o quartzo, transparente para luz com comprimento de onda menor que 190nm. Portanto, a parede do capilar por si só reproduz uma célula óptica perfeita.

- na década anterior à emergência da CE, importante progresso foi feito no desenvolvimento instrumental da sensibilidade e diminuição do ruído em detectores UV para HPLC, dessa forma, para seu uso em CE, somente foram necessárias algumas pequenas modificações no sistema óptico (KOK, 2000).



- **3.3 Métodos *in vitro* utilizados para medida da atividade antiradicalar em plantas medicinais**

- 3.3.1 Radicais livres

Os radicais livres fazem parte de um processo fisiológico normal e contínuo no organismo, exercendo funções biológicas relevantes como transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Em proporções adequadas pode ser útil na fertilização do óvulo e geração de ATP, podendo atuar também como mecanismo de defesa em determinados processos infecciosos.

Porém, quando moléculas oxidantes e antioxidantes estão em desequilíbrio, o resultado é uma indução de danos celulares pelos radicais livres, gerando o que chamamos de estresse oxidativo (SIES, 1993). Tal desequilíbrio resulta na oxidação de importantes biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) (FERREIRA *et al.*, 2011). Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana.

Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS *et al.*, 2006).

- 3.3.2 Antioxidantes

O dano oxidativo pode ser prevenido por moléculas antioxidantes, as quais são capazes de doar elétrons para estabilizar os radicais livres e neutralizar seus efeitos nocivos. Estas podem ser de origem endógena (sintetizadas pelo organismo) e exógena (provenientes de fontes externas) (UTTARA *et al.*, 2009).

Assim, um antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação estando presentes em pequenas concentrações, quando comparado ao agente oxidante. As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos. (OLIVARES *et al.*, 2010).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos encontrados em plantas (principalmente compostos polifenólicos) têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUSA *et al.*, 2007).

Os polifenóis e outros derivados são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, podendo atuar em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E. Essa atividade antioxidante é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante do ferro, atividade seqüestrante de radicais livres, inibição de enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase (SIMÕES *et al.*, 2003). O mesmo autor cita ainda que foram observados potentes efeitos inibitórios da peroxidação microssomal de lipídeos por parte de alguns flavonóides. Estudos demonstram também que compostos fenólicos possuem atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência em humanos, herpes simples e poliomielite.

Plantas medicinais e condimentares que contêm substâncias antioxidantes são usadas há milhares de anos na medicina oriental. No entanto, a despeito da literatura avaliada, ainda são pouco usados terapeuticamente na medicina popular do ocidente, embora possuam atividade

antioxidante na função protetora e no tratamento de doenças degenerativas mediadas por estresse oxidativo (DORNAS *et al.*, 2007).

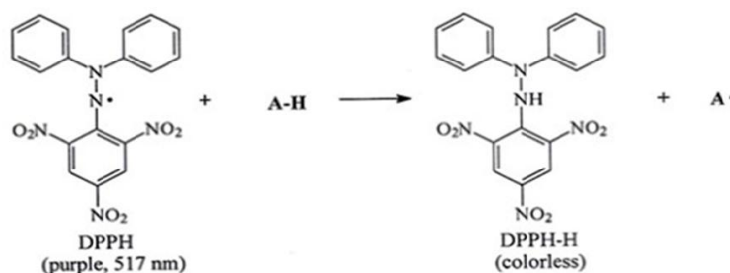
- 3.3.3 Metodologias

Diversos métodos têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se aqueles que empregam o sequestro de radicais livres ou inibem sua formação, tais como os aplicados neste trabalho.

*Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)*

O método DPPH está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, reduzindo-o a difenil-picril-hidrazina, como mostra a figura 17 (HUANG *et al.*, 2005; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

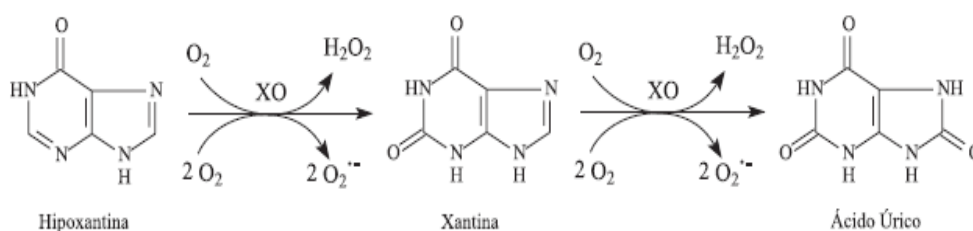
O método do DPPH avalia a capacidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre formado. Portanto, não está associado à degradação lipídica oxidativa nem à hidro/lipossolubilidade do composto antioxidante, pois o sistema não contém substrato oxidável, dependendo principalmente da sua estrutura química. Neste caso, avalia-se a habilidade do antioxidante em doar hidrogênio (MELO *et al.*, 2006).



**Figura 17** – Reação química gerada no método do sequestro do radical DPPH.

### Ânion Radical Superóxido – Sistema HPX/XOD

A metodologia consiste em um sistema enzimático contendo a hipoxantina como substrato e uma enzima, a xantina oxidase. Esta enzima catalisa a oxidação de hipoxantina a xantina, a qual é, então, oxidada a ácido úrico (figura 18). Em ambas as etapas da oxidação da hipoxantina a ácido úrico, há produção de ânion radical superóxido, que reduz FeIII a FeII. Se ocorrer diminuição da concentração de ácido úrico, significará que houve a inibição da enzima xantina oxidase, fonte indireta de radical superóxido (OLIVEIRA *et al.*, 2009).



**Figura 18** – Reação química envolvida no sistema hipoxantina-xantina oxidase.

### *Radical Hidroxila – Método deoxirribose*

O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. A exposição do DNA (ou RNA) à radicais hidroxila pode vir a gerar uma série de produtos devido a alta reatividade desse radical. Quando exposto a esse composto, o açúcar presente na estrutura do DNA (deoxirribose) é fragmentado até ocorrer a formação de malondialdeído (MDA). Através da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) ocorre a formação de um cromógeno (MDA-(TBA)<sub>2</sub>) rosa que pode ser detectado por espectrofotometria.

O ensaio deoxirribose permite a determinação da razão constante de reações com o radical hidroxil. É um teste em tubo, relativamente simples, no qual o radical é gerado pela mistura de ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe<sup>3+</sup>- EDTA (HALLIWELL *et al.*, 1995). Na presença de um composto antioxidante ocorre a competição do açúcar pelo radical inibindo a formação de MDA e conseqüentemente a formação do cromógeno.

### *Radical Peroxil - Método ANCOMROS (Antioxidant Competence Measured by ROS determination)*

Este método se baseia na detecção indireta de espécies reativas de oxigênio, quando há a presença ou não de um gerador de radical no meio. Como a detecção é fluorimétrica, a metodologia desenvolvida por Amado *et al.*, 2009 utiliza o composto 2',7' – diclorofluoresceína (DCFH-DA) desacetilado para geração do composto fluorescente (DCF). Para geração do radical utiliza-se o reagente cloreto de 2,2' – azobis (2 – metilamodinopropano) (ABAP) cuja termodecomposição em 37° C origina o radical peroxil. O DCFH é oxidado pelo radical que é detectado no equipamento de fluorescência.

A avaliação da atividade antioxidante através da formação do radical DPPH e a avaliação da atividade antioxidante através da formação de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) têm sido amplamente utilizadas comparativamente para várias amostras (YU *et al*, 2002; ZHOU & YU, 2004; PELLEGRINI *et al.*, 1999). A determinação da atividade antioxidante de espécies naturais frente ao radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) já foi descrita na literatura (HILGEMANN *et al* 2010; LIMA, 2010; SCHOLZ *et al* 2007).

Sendo assim, é importante escolher uma combinação de métodos, que possa refletir de maneira clara os resultados das investigações da atividade anti-radicalar de espécies naturais. Correlações entre atividade antioxidante de plantas medicinais e avaliação de conteúdos fenólicos totais ainda não foram completamente elucidados (ZHAO *et al.*, 2006).

#### • **3.4 *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk e sua atividade farmacológica**

O Barbatimão-do-Pará, de nome científico *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, está inserido dentro da família Connaraceae, característica de regiões tropicais, que compreende aproximadamente 16 gêneros. O gênero *Connarus*, no qual se inclui esta espécie, está distribuído desde o México até o estado de Santa Catarina, no sul do Brasil.

Seu nome informal está relacionado a um termo indígena que significa “árvore que aperta”, fazendo alusão a um de seus usos na medicina popular, que reflete sua alta capacidade de adstringência.

É conhecido por crescer em florestas de terra firme, e apresentar características morfológicas bem definidas, bem como receber diversos nomes informais, devido à sua intensa popularidade na medicina cultural da região amazônica. Segundo estudo realizado em Algodual, no estado do Pará, mais de 50% dos entrevistados fez alusão a esta espécie de barbatimão quando questionados sobre a planta da região mais utilizada no tratamento das mais diversas enfermidades.

Efeitos curativos da planta, ainda segundo a população regional, podem ser obtidos através das mais diversas formas de extração: maceração, chá,

“garrafada” (no qual se tem algum teor alcoólico), banho ou xarope, sempre realizados com a casca da espécie, onde se espera encontrar a maior concentração de princípios ativos.

Dessa forma, foi relatado seu uso para infecções genitourinárias em mulheres, hemorragia uterina, ovários císticos, corrimento vaginal, "mãe-do-corpo" (acontecimento pós-parto no qual os órgãos envolvidos na gravidez estão voltando ao lugar certo, causando certo desconforto), doenças gástricas, cefaléias, gripe, tosse e congestão.

Testes ainda estão sendo realizados para o melhor entendimento de sua popularidade. Um ensaio de citotoxicidade com linhagens de células de tumores de pulmão (NCI-H460), cólon (KM-12) e SNC (SF-268) e leucemia (RPMI-8226), mostrou que o extrato aquoso das folhas de *C. perrottetii* numa concentração de 100 µg/mL foi 15,43% letal às células KM-12, alertando sobre um possível efeito contra o câncer de cólon.

Estudos relatados com outras espécies do gênero *Connarus* demonstram a existência de vários compostos ativos, que podem possivelmente estar relacionados também à *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk.

Pesquisas sobre *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk ainda são escassas, principalmente na área química e farmacêutica, embora a importância do seu uso tradicional como barbatimão no Pará tenha sido confirmada. Mostra-se assim a relevância e importância de dar sequência a atividades de pesquisa envolvendo espécies populares, porém com poucos esclarecimentos científicos (PARACAMPO, 2011).

#### *Hierarquia taxonômica*

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Rosanae Takht.

Ordem: Oxalidales Bercht. & J. Presl.

Família: Connaraceae R. Br.

Gênero: *Connarus* L.

## • 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### • 4.1 Instrumentação

- Equipamento de eletroforese capilar com detector UV-VIS (lâmpada de deutério MINI) construído em laboratório (CARVALHO *et al*, 2009) para o desenvolvimento do método e caracterização dos extratos.

- Detector UV-Vis (OceanOptics Spectrometer USB2000+) com lâmpada de Deutério e Tungstênio (DT-Mini-2).

- Software Spectrasuite (Ocean Optics).

- Balança analítica Sartorius® (Alemanha) com quatro casas de precisão para a pesagem de todos os reagentes e amostras.

- pHmetro digital Metrohm® 827 pHlab (Suíça) usando eletrodo de vidro combinado.

- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Synergy® UV (resistividade de 18,2 MΩ.cm@25°C).

- Sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 µm Sartorius® (Alemanha) utilizado nas amostras e no eletrólito de trabalho.

- Banho de ultrassom Bandelin Sonorex® RK 510 H (Alemanha) utilizado nas amostras e no eletrólito de trabalho.

- Bomba de vácuo Primatec® 131/132 (Brasil) para a realização de filtração à vácuo.

Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro da marca Hewlett Packard® (HP 8453) com arranjo de diodos utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. As medidas fluorimétricas foram realizadas em Fluorímetro Victor 2 (Perkin Elmer®).



## • 4.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza grau-analítico. Como substâncias químicas de referência foram empregados padrões adquiridos comercialmente, listados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Padrões de antioxidantes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

| Composto              | Fornecedor        | Pureza (%) |
|-----------------------|-------------------|------------|
| 3 Acetilcumarina      | Sigma-Aldrich     | 96,0       |
| Resveratrol           | Sigma-Aldrich     | 98,5       |
| 6 Hidroxicumarina     | Sigma-Aldrich     | 96,0       |
| Catequina             | Sigma-Aldrich     | 96,0       |
| Rutina                | Sigma-Aldrich     | 95,0       |
| Ácido Ferúlico        | Fluka             | 98,0       |
| Quercitrina           | HWI Analytik GMBH | 92,02      |
| Canferol              | Sigma-Aldrich     | 99,0       |
| Quercetina            | Sigma-Aldrich     | 98         |
| Miricetina            | Sigma Aldrich     | 96,0       |
| Fisetina              | Sigma-Aldrich     | 99,26      |
| Ácido Cafeico         | Sigma-Aldrich     | 95,0       |
| Ácido Gálico          | Sigma-Aldrich     | 97,5-102,5 |
| Ác. 4 Hidroxicinâmico | Fluka             | 99,0       |

Metanol grau HPLC Tedia<sup>®</sup>, tetraborato de sódio Merck<sup>®</sup> e hidróxido de sódio (NaOH) Vetec<sup>®</sup> também foram utilizados.

As soluções-padrão dos analitos estudados foram preparadas nas concentrações 1 g L<sup>-1</sup>. As soluções foram mantidas refrigeradas. A partir das soluções em estoque foram preparadas as soluções de trabalho, por meio de diluição em metanol.

As soluções e reagentes utilizados nas metodologias in vitro para determinação da atividade antioxidante e testes realizados ao longo da

otimização do método eletroforético estão especificados separadamente em cada descrição de metodologia.

- **4.3 Procedimentos Analíticos**

- 4.3.1 Preparo das Amostras

A espécie *Conarus perrottetii* var *angustifolius* Radlk foi obtida através de projeto de cooperação científica com a Embrapa Amazônia Oriental (Belém do Pará). A casca da amostra foi fornecida como matéria seca sendo necessária apenas a elaboração dos extratos.

A amostra foi cultivada na sede da Embrapa Amazônia Oriental situada no município de Belém-PA, localizado a 1° 27' 21'' S de latitude e 48° 30' 14'' W de longitude, com altitude de 10 m e temperatura média anual de 30°C.

- *Preparo da Infusão*

O preparo do extrato aquoso (30%) constituiu-se na pesagem de 10 gramas da matéria seca da planta com posterior infusão em água à temperatura de 90°C durante 30 minutos. Após o período de infusão o extrato foi filtrado primeiramente em algodão e depois em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm.

- *Preparo das Frações*

Uma porção de 450 gramas das cascas de “barbatimão do Pará” foi macerada à temperatura ambiente com etanol a 70% durante sete dias, com

agitação diária. O solvente foi renovado a cada semana durante quatro semanas.

Depois de filtrado, o extrato hidroalcólico foi evaporado sob pressão reduzida abaixo de 40°C a fim de obter o extrato etanólico. Parte do extrato etanólico foi evaporado até à secura, para fornecer um extrato bruto. O extrato remanescente foi particionado sucessivamente com n-butanol, acetato de etila e clorofórmio, sendo que as frações resultantes foram submetidas à secagem em evaporador rotativo.

Para injeção no equipamento de eletroforese capilar, as frações foram ressuspensas em metanol a uma concentração de 5% (m/v), onde pesou-se 0,5 gramas de cada fração para cada 10 mL de metanol.

#### *- Preparo da amostra por hidrólise alcalina*

Para o preparo das amostras em hidrólise alcalina, adicionou-se 10 mL de hidróxido de sódio 1 M a uma massa de 2,5 gramas de amostra (planta e suas frações). Em seguida, a solução foi agitada em Vortex e sonicada por 30 minutos.

#### *- Preparo da amostra por SPE (Solid Phase Extraction)*

É um processo de separação através do qual os compostos, que são dissolvidos ou suspensos numa mistura de líquido são separados de outros compostos na mistura de acordo com as suas propriedades físicas e químicas. É geralmente utilizado para se concentrar e purificar amostras para análise.

A porção que passa através da fase estacionária é recolhida ou descartada, dependendo se ele contém os analitos desejados ou impurezas indesejadas. Se a porção retida na fase estacionária compreende os analitos desejados, então eles podem ser removidos a partir da fase estacionária.

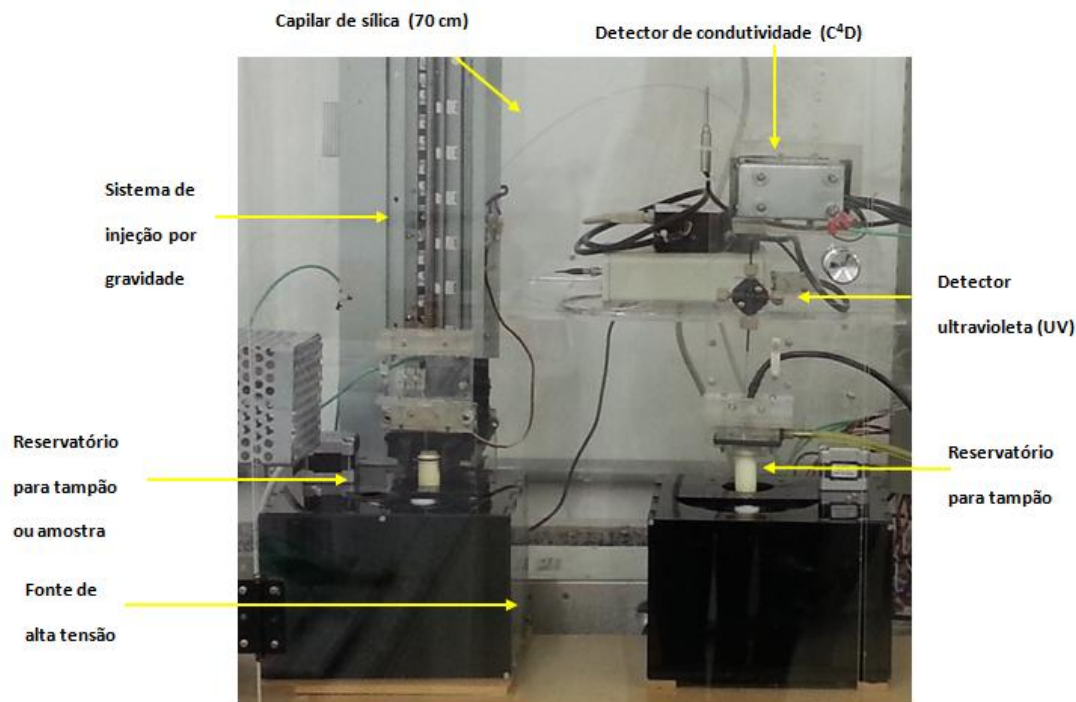
O processo utilizado neste trabalho consistiu em várias etapas: condicionamento, equilíbrio, amostragem, lavagem, secagem e eluição em coluna C18, com metanol e água, em vazão aproximada de 2mL/min.

- 4.3.2 Determinações por Eletroforese Capilar (CE)

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas no aparelho de eletroforese capilar construído em laboratório (Figuras 19 e 20). Os antioxidantes estudados foram determinados pelo método de eletroforese capilar de zona com (CZE) detecção UV. A fonte de alta tensão utilizada foi configurada para detecção direta dos fármacos na forma aniônica, com injeção anódica e detecção catódica.



**Figura 19** – Foto do equipamento de CE construído em laboratório.



**Figura 20** – Foto expandida do equipamento de CE com detectores UV (OceanOptics) e de detector de condutividade (C<sup>4</sup>D).

O capilar utilizado no método foi de sílica fundida (Polymicro, Phoenix /AZ, USA) com 70 cm de comprimento (56 cm até o detector), 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 360  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. O capilar novo foi condicionado lavando-se com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, durante 40 minutos, NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 30 minutos, água ultrapura, durante 30 minutos, e por fim eletrólito de trabalho durante 30 minutos empregando vácuo, em pressão constante de -600 mmHg. No início de cada dia o capilar foi lavado com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 15 minutos e com água ultrapura e com o eletrólito durante 30 minutos cada. Entre as injeções das amostras, fez-se a lavagem do capilar com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e água ultrapura durante 10 minutos cada e com eletrólito de trabalho, por mais 10 minutos. No final do dia, o capilar foi lavado com eletrólito de trabalho e água ultrapura por 15 minutos cada.

Para injeção das amostras utilizou-se sistema de injeção hidrodinâmica, que consistiu na elevação de uma das extremidades do capilar até uma altura de 20cm, provocando, assim, a entrada de determinado volume. As análises foram realizadas em temperatura de 25°C.

O eletrólito de trabalho foi preparado diariamente, filtrado em membrana 0,45 µm e sonicado por 30 minutos. Seu pH foi conferido diariamente, ainda que não tenha precisado de ajuste pelo fato de que o pH requerido para análise é o pH nativo da solução.

- 4.3.3 Atividade Antioxidante Frente a Espécies Radicalares

O radical DPPH foi obtido comercialmente da Aldrich Chemistry<sup>®</sup>. Foi preparada uma solução estoque de DPPH em etanol a fim de se obter uma solução de trabalho 10<sup>-4</sup> M.

Após o espectrofotômetro ter sido zerado com água milli-Q, iniciou-se a leitura das cubetas, que consistiram em 1500 µL do extrato, 1480 µL da solução de trabalho de DPPH e 20 µL de água milli-Q. Paralelamente conduziu-se um branco para cada amostra contendo 1500 µL do extrato e 1500 µL de água. Foi necessário conduzir um branco para o DPPH para o cálculo da atividade antioxidante, dessa forma 1480 µL de DPPH foram adicionados a 1520 µL de solução hidroetanólica. Após 30 minutos de reação sob abrigo da luz as absorvâncias foram medidas em 522 nm. A porcentagem da atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi calculada conforme equação.

$$\%AA = (A_{DPPH} - (A_{amostra} - A_{branco})) \times 100 / A_{DPPH}$$

Onde:

$A_{DPPH}$  = Absorvância do DPPH

$A_{amostra}$  = Absorvância da amostra

$A_{branco}$  = Absorvância do branco da amostra

AA = Atividade antioxidante

A atividade de sequestro do radical superóxido foi realizada utilizando o sistema enzimático HPX/XOD, conforme Zhao *et al.*, 2006.

Os reagentes utilizados no método enzimático HPX/XOD foram adquiridos da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil) sendo eles, xantina oxidase (XOD) 25UN, hipoxantina e nitrotetrazolium blue chloride (NBT). O EDTA da marca Nuclear® foi obtido no comércio local.

Inicialmente adicionou-se 100 µL de EDTA 30 mM, 100 µL de HPX 3 mM e 200 µL de NBT 1,42 mM a 100 µL do extrato. Esperou-se 3 minutos e adicionou-se 100 µL da enzima XOD 0,75 unit/mL. O volume foi completado a 3 mL com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). O branco das amostras continha todos os reagentes exceto o NBT, o qual foi adicionado 200 µL de solução hidroetanólica, para os extratos hidroetanólicos e 200 µL de água ultra pura para o branco dos extratos aquosos, no lugar do NBT. Paralelamente conduziu-se um controle contendo todos os reagentes exceto o extrato, e um branco do controle sem extrato e NBT. Após o tempo reacional de 40 minutos a leitura espectrofotométrica foi feita em 560 nm. A atividade antioxidante frente ao radical superóxido foi calculada conforme equação abaixo.

$$\%AA = [1 - (S - S_b)/(C - C_b)] \times 100$$

Onde:

S = absorvância da amostra

S<sub>b</sub> = absorvância do branco da amostra

C = absorvância do controle

C<sub>b</sub> = absorvância do branco do controle

Para o método ANCOMROS utilizou-se o reagente cloreto de 2,2' – azobis (2-metilamodinoopropano) (ABAP, Aldrich®). O tampão de reação continha HEPES (Acros®, pH 7,2), KCl e MgCl<sub>2</sub> (Isofar®) também adquiridos no comércio local. O reagente 2',7'-diclorofluoresceína (DFCH-DA) foi previamente desacetilado sendo que para a desacetilação química utilizou-se uma solução etanólica de DCFH-DA com NaOH, ambos adquiridos comercialmente.

Em uma placa branca contendo 96 poças, analisaram-se os extratos em triplicata. A placa foi dividida em duas regiões onde na região 1 adicionou-se 7,5µL de água Milli-Q no lugar do gerador do radical (branco), e na região 2

adicionou-se 7,5  $\mu\text{L}$  do reagente gerador de radical (ABAP). Nas poças A1, A2 e A3 adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução hidroetanólica (branco da amostra), e a partir das poças A4, A5 e A6 foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do extrato, e assim sucessivamente, de forma que as mesmas amostras foram pipetadas na região 2 na mesma ordem. Em todas as poças adicionou-se 127,5  $\mu\text{L}$  do tampão de reação e 10  $\mu\text{L}$  de DCFH desacetilado, o qual foi adicionado imediatamente antes da leitura da fluorescência.

A placa foi então colocada no fluorímetro o qual foi programado para manter a temperatura em 37°C. O DCFH desacetilado é oxidado por ERO ao composto fluorescente DCF, que é detectado nos comprimentos de onda de 485 e 520 nm ex/em. Foi feito o monitoramento da termodegradação do ABAP e consequente formação de ERO durante 30 minutos.

O ensaio para medir a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil pelo método da deoxirribose foi conduzido conforme Zhao *et al.*, 2006<sup>24</sup> com breves modificações.

Os reagentes ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético(TCA), hidróxido de sódio e cloreto férrico hexahidratado foram adquiridos do comércio local. Ácido ascórbico e 2 deoxi-D-ribose foram adquiridos da Sigma<sup>®</sup>, Porto Alegre, RS.

Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 25 mM, pH 7,4. Em um tubo reacional foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do extrato, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 1 mM, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM, 100  $\mu\text{L}$  de 2 deoxi-D-ribose 36 mM, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 100  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 1 mM, sendo o volume final ajustado para 1 mL com tampão fosfato. Após incubação durante 1 hora à 37 °C, a reação foi parada através da adição de 1 mL de TCA 10% e 1 mL de TBA 1%. A mistura foi então aquecida em banho de água durante 15 minutos. Assim que as amostras resfriaram, o volume foi aferido para 5 mL e a absorvância medida em 532 nm. Através da mesma fórmula utilizada para o radical superóxido foi possível calcular a atividade antioxidante da infusão frente ao radical hidroxil.



## • 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

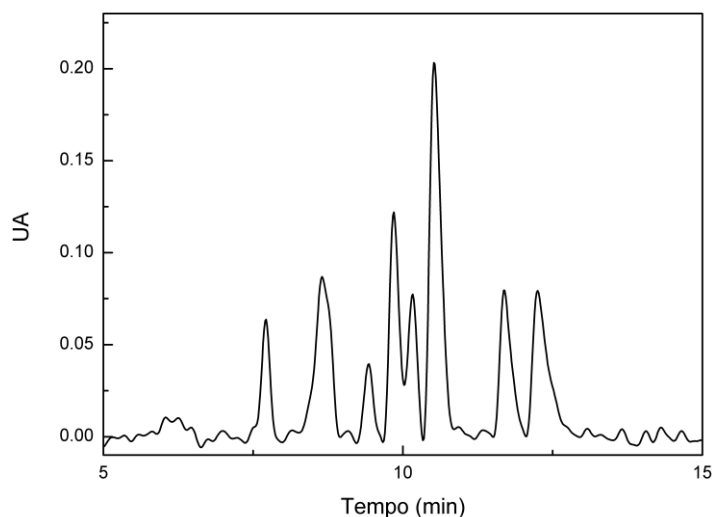
Neste trabalho, um método eletroforético para a detecção simultânea de 14 compostos polifenólicos foi desenvolvido inicialmente para a caracterização de diferentes extratos a partir de marcadores específicos de sua atividade antiradicalar. O método foi aplicado em extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk e o mesmo permitiu também a quantificação do teor destes compostos nos extratos, quando presentes. Os compostos escolhidos são geralmente os majoritários presentes em amostras de plantas medicinais, segundo análise minuciosa da literatura. Foi investigada também a atividade antioxidante total da planta através de diferentes métodos *in vitro* a partir da geração diferentes radicais livres.

### • 5.1 Caracterização de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk por eletroforese capilar de zona com detecção UV

#### • 5.1.1 Otimização da separação eletroforética

A condição inicial de trabalho para a separação dos compostos em estudo foi com tampão tetraborato de sódio como eletrólito, na concentração 20 mM em pH 9,2 sob aplicação de um potencial de 20 kV. Para a escolha do comprimento de onda de detecção no UV foi realizada uma varredura do espectro, onde o comprimento de onda de 230 nm demonstrou uma melhor intensidade e forma dos picos na corrida eletroforética.

Dessa forma, podemos verificar na figura 21 o eletroferograma inicial, com as condições acima citadas, o qual consistiu no ponto de partida para a otimização do novo método de análise.

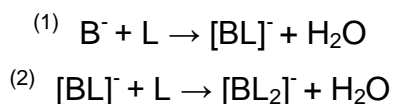


**Figura 21** – Eletroferograma dos 14 antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) antes da otimização de parâmetros. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2), potencial de separação  $-20 \text{ Kv}$ , capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em  $230\text{nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de  $20 \text{ cm}$  durante  $60 \text{ s}$ .

#### 5.1.1.1 Efeito do tampão e pH do eletrólito

A escolha primária do tetraborato de sódio como eletrólito de trabalho se deve ao fato de que este, com pH entre 8 e 12, forma complexos aniônicos com o núcleo das estruturas dos polifenóis.

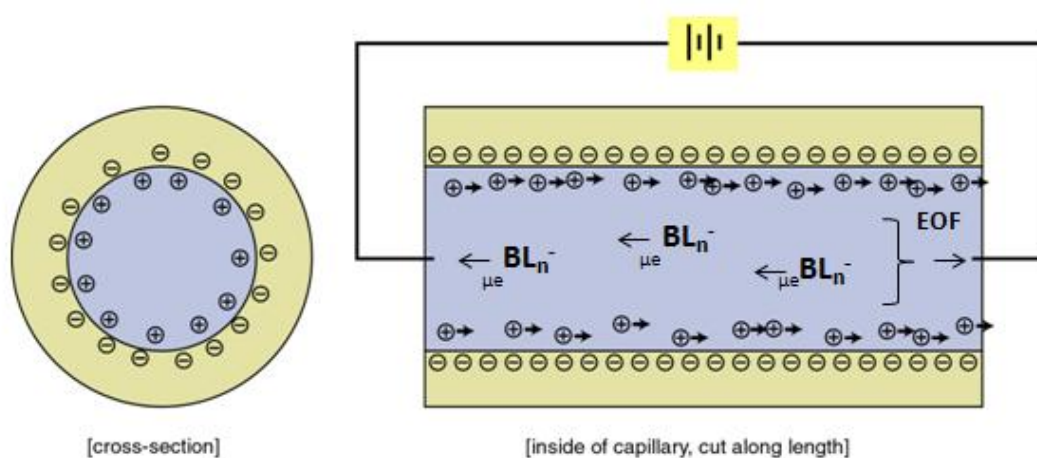
A formação do complexo de borato com polifenóis em solução alcalina representa um exemplo bem conhecido usado extensivamente na separação de açúcares e catecóis (figura 22). A formação do complexo pode ser descrita de acordo com as equações abaixo:



onde L é o analito ligante e  $\text{B}^-$  representa o tetrahidroxiborato. Na faixa de pH que vai de 8 a 12, soluções aquosas de borato contém não somente

tetrahidroxiborato, mas também poliânions mais condensados, como triborato e tetraborato.

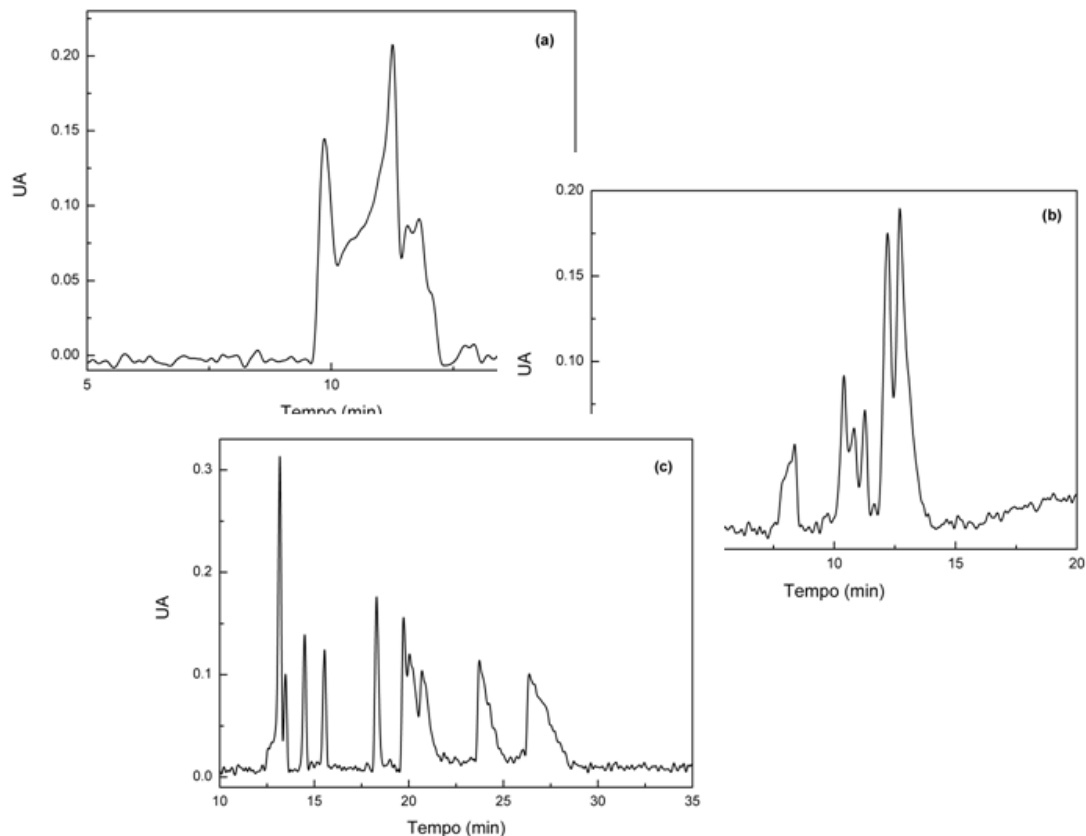
A estrutura do complexo polifenol-borato é intimamente relacionada à sua estabilidade em meio aquoso. Considerando que o equilíbrio entre as equações (1) e (2) é dinâmico, todos os analitos serão associados com uma carga negativa. A magnitude desta carga é determinada pela posição de equilíbrio e, assim, pela estabilidade do complexo (KUHN & HOFFSTETTER-KUHN, 1993).



**Figura 22** – Efeito da complexação do borato com os compostos polifenólicos no interior do capilar de sílica. O fluxo eletroosmótico arrasta as partículas complexadas para o cátodo, mesmo que sua tendência natural seja a atração pelo lado positivo.

De modo geral, os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao  $pK_a$ , mais ou menos uma unidade. O  $pK_a$  do tampão borato é 9,24 (TAVARES, 1997).

Somente para fim de confirmação, foram testados os valores de pH 5, 8 e 10, que resultaram nos eletroferogramas da figura 23, confirmando a hipótese de manutenção de pH ótimo em 9,2.



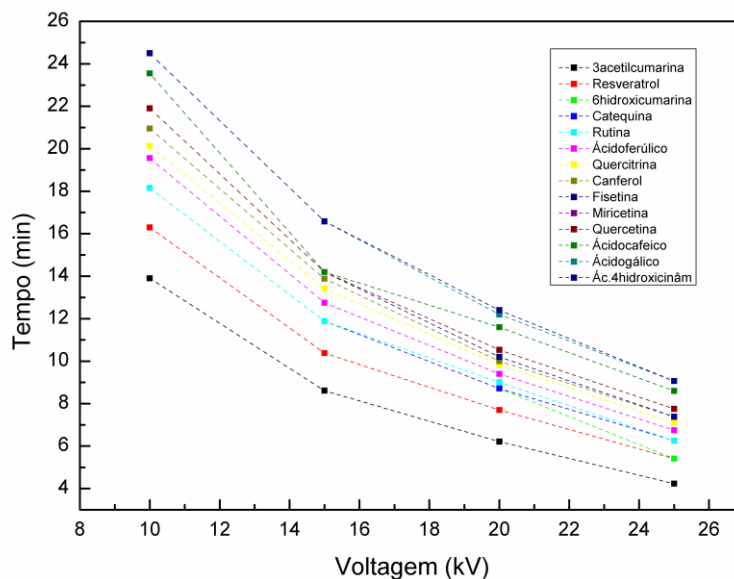
**Figura 23** – Efeito do pH nos eletroferogramas dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante a otimização deste parâmetro; (a) pH 5, (b) pH 8, (c) pH 10. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , potencial de separação  $-20 \text{ Kv}$ , capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  ( $56 \text{ cm}$  até o detector); detecção direta por UV em  $230 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de  $20 \text{ cm}$  durante  $60 \text{ s}$ .

#### 5.1.1.2 Efeito do potencial de separação

O próximo parâmetro otimizado foi o potencial de separação, que foi variado numa faixa de 10 a 25 kV, alternando em cinco unidades por vez. Aplicações de altas voltagens requerem certo cuidado no sistema de eletroforese capilar, pois provocam aumento acentuado na corrente observada, o que leva ao aquecimento interno do capilar, levando à baixa reprodutibilidade dos resultados e, em certos casos, à degradação da amostra.

De acordo com a figura 24, nota-se que em baixos potenciais as corridas apresentaram tempos muito longos, com resultados irreprodutíveis e perfis desconhecidos.

Por esse motivo, e por acreditar-se que através da mudança de outros parâmetros se conseguiria melhorar a resolução, manteve-se a voltagem inicial de 20kV, que, além do menor tempo, permitiu uma separação razoável dos compostos. Nessa voltagem também a linha base apresentou baixo ruído, facilitando a identificação dos compostos.



**Figura 24** – Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para valores de 10-25 kV. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2), capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

### 5.1.1.3 Efeito de aditivos no tampão borato

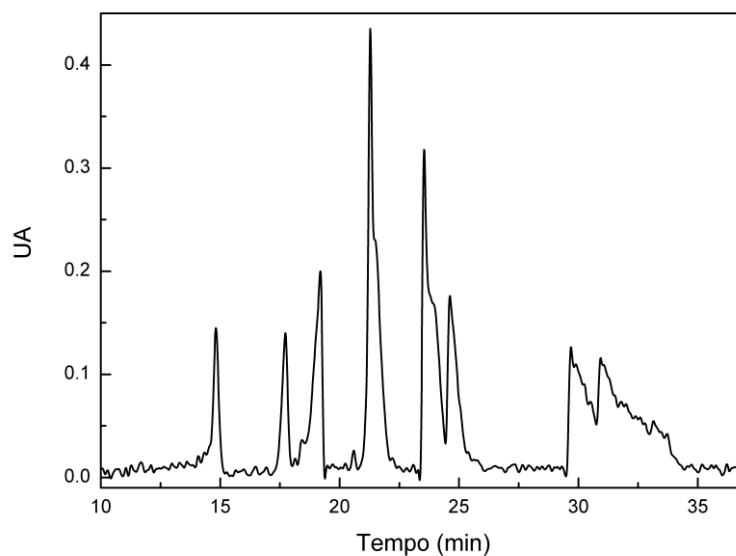
Na tentativa de efetivar a separação dos analitos em questão, a tentativa posterior à mudança de voltagem aplicada foi a adição de aditivos ao tampão. O primeiro aditivo testado foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), um tensoativo aniônico.

Tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema

cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, transportada sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose. Os solutos neutros adquirem partição diferenciada, o que propicia a seletividade da separação.

Entre os eletrólitos estudados para electrocromatografia micelar, os sistemas que formam micelas que se opõem ao fluxo eletrosmótico são os que têm produzido melhores desempenhos. Com o SDS, tanto a solução como as micelas migram no mesmo sentido, embora com velocidades diferentes.

Na figura 25 podemos observar o eletroferograma resultante da adição de 200mM de SDS ao eletrólito de trabalho.

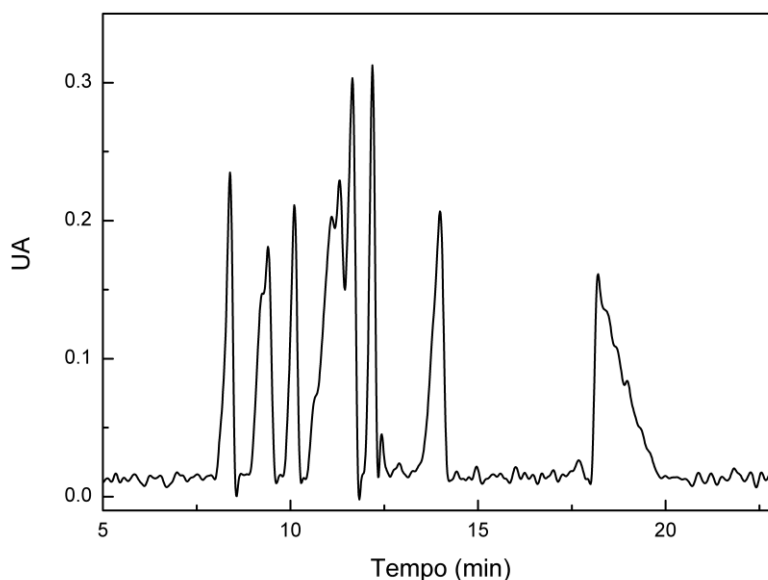


**Figura 25** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração 200mM. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) com adição de SDS 200mM, potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

O efeito resultante não foi uma melhora nas condições de separação. Provavelmente porque, comparativamente a outras técnicas, a MECC possui uma baixa capacidade de picos, o que limita seu uso a misturas não muito complexas. As micelas formadas estão em movimento e, conseqüentemente,

todos os solutos, mesmo os totalmente retidos pela micela, são eluídos. Isto acaba por limitar o tempo que a separação ocorre a um intervalo de tempo determinado, relacionado principalmente ao tempo de residência da fase micelar dentro do capilar.

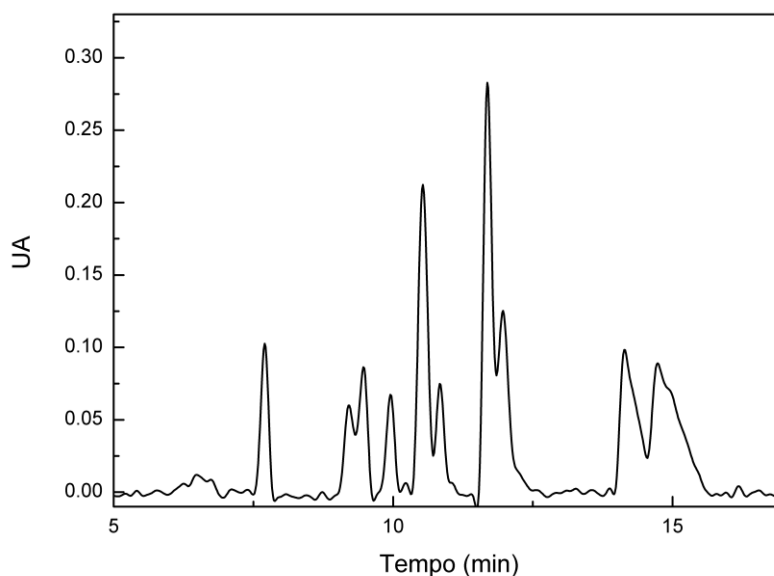
O segundo aditivo testado foi a ciclodextrina. Ela geralmente é utilizada nas separações quirais e como complexante auxiliar na separação de compostos neutros. Sendo neutras, as ciclodextrinas migram com a velocidade eletroosmótica. A partição diferenciada de solutos entre a micela e a cavidade da ciclodextrina produz a seletividade requerida. Seu mecanismo funciona como o do SDS, resultando em uma eletrocromatografia micelar.



**Figura 26** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após a adição de  $\beta$ -ciclodextrina na concentração  $20 \text{ mM}$ . Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo  $\beta$ -ciclodextrina na concentração  $20 \text{ mM}$ , potencial de separação  $-20 \text{ Kv}$ , capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  ( $56 \text{ cm}$  até o detector); detecção direta por UV em  $230 \text{ nm}$ ; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de  $20 \text{ cm}$  durante  $60 \text{ s}$ .

O que podemos notar na figura 26 é uma diminuição do tempo de corrida, o que seria um fator positivo. Porém, em relação à separação dos analitos, não houve uma melhora significativa, observando-se co-migrações em pontos que já se havia conseguido a separação requerida.

Houve também a tentativa de separação com acetonitrila, mostrado na figura 27. Além de não haver mudança significativa na separação, tornou-se inviável seu uso pela alteração causada no capilar, fazendo com que a corrente e o campo elétrico resultante não permanecesse estável ao longo do dia.

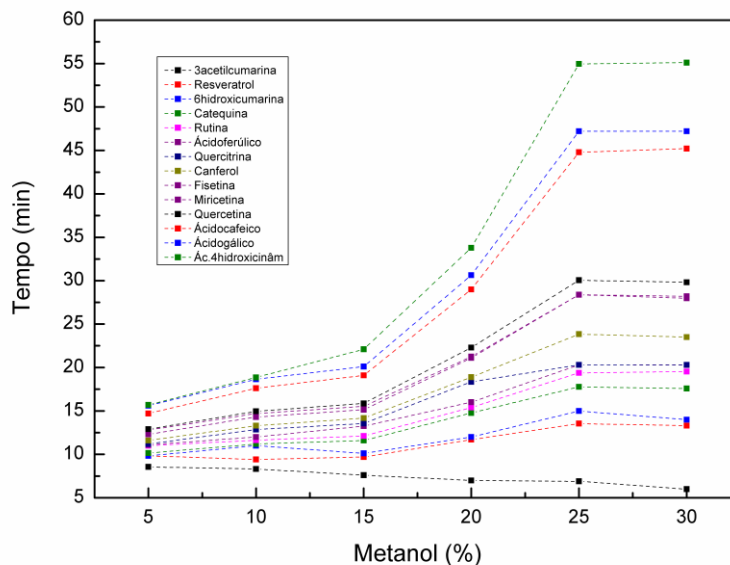


**Figura 27** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após a adição de acetonitrila ao eletrólito. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo acetonitrila 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

O último e mais eficiente aditivo testado foi a inclusão de metanol ao eletrólito de trabalho. Solventes orgânicos aumentam a solubilidade de solutos orgânicos e reduzem a interação soluto-capilar. Sua adição altera a viscosidade e a constante dielétrica da fase móvel e, conseqüentemente, o potencial zeta do capilar, resultando na variação da velocidade eletrosmótica.

Como consequência, tanto o fluxo eletrosmótico como a mobilidade eletroforética dos analitos são afetados. A figura 28 (e figura 29, em menor escala) retrata o grau de separação dos analitos e tempo de corrida em função da concentração de metanol. Nota-se que quando mais solvente é adicionado, maior o tempo total de saída dos compostos.



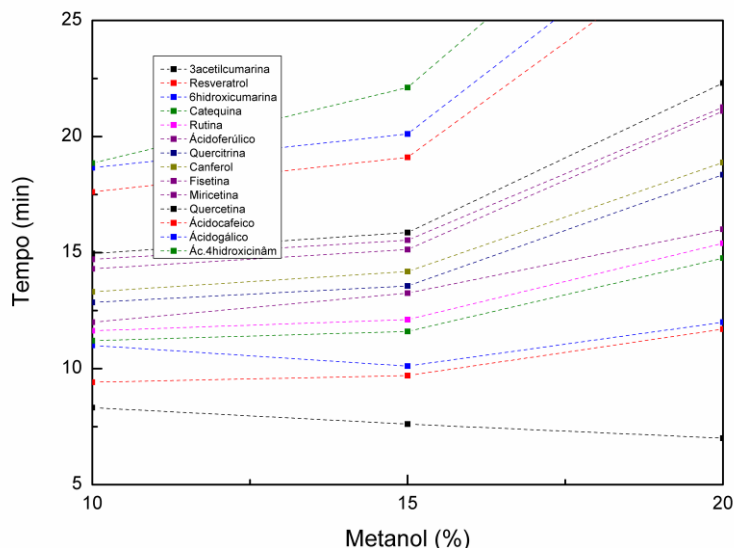


**Figura 28** – Efeito da concentração de metanol nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para valores de 5-30 (%). Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2), capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

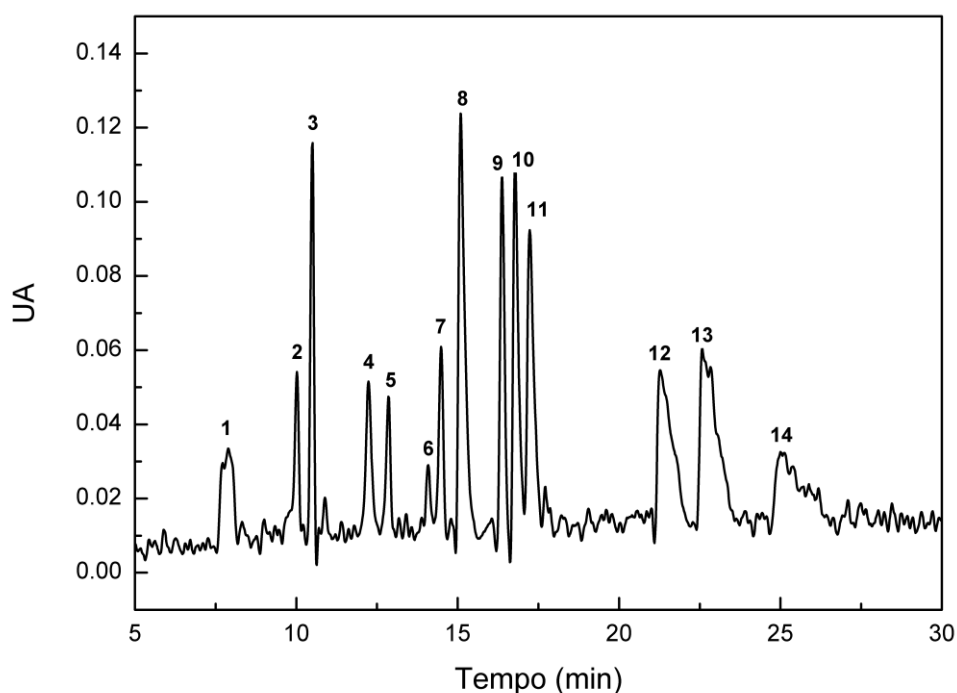
Diminuindo a escala para uma melhor visualização dos dados obtidos, percebe-se que a partir da concentração de 15% já é possível observar uma boa separação em um tempo de corrida razoavelmente curto quando comparado a maiores concentrações. Por essa razão, esta foi a condição final escolhida em relação a esse parâmetro.

Considerando-se a otimização do processo, as condições finais de trabalho escolhidas foram: tampão borato 20mM com pH 9,2 como eletrólito, acrescido de uma concentração final de metanol de 15% (v/v); potencial de separação 20kV e comprimento de onda 230nm. Parâmetros como altura da injeção e frequência de operação do detector não foram otimizadas por já haver relatos na literatura de que mudanças nessas condições não trazem mudanças significativas para este tipo de análise quando as condições iniciais são as utilizadas neste trabalho.

As condições acima citadas resultaram no eletroferograma da figura 30.



**Figura 29** – Efeito da concentração de metanol nos tempos de migração dos antioxidantes em concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para valores de 5-30 (%) em menor escala. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2), capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.



**Figura 30** – Eletroferograma resultante dos 14 antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) após a otimização dos parâmetros; (1) 3 acetilcumarina, (2) resveratrol, (3) 6 hidroxycumarina, (4) catequina, (5) rutina, (6) ácido ferúlico, (7) quercitrina, (8) canferol, (9) fisetina, (10) miricetina, (11) quercetina, (12) ácido cafeico, (13) ácido gálico, (14) ácido 4 hidroxicinâmico. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

- 5.1.2 Validação da metodologia desenvolvida

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2001). A validação do método analítico permite demonstrar que o método é "adequado ao uso" pretendido.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas com níveis de concentração individuais para cada analito, adequado de acordo com a intensidade de seu sinal na detecção UV, calculados em triplicatas. As concentrações de cada padrão nos seis pontos da construção das curvas foram: 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 75 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 125 mg L<sup>-1</sup> e 150 mg L<sup>-1</sup> para os antioxidantes 6 hidroxycumarina, canferol, fisetina, miricetina e quercetina; 50 mg L<sup>-1</sup>, 75 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 125 mg L<sup>-1</sup>, 150 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> para os antioxidantes resveratrol, catequina, rutina e quercitrina e 75 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 150 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup> e 300 mg L<sup>-1</sup> para os antioxidantes 3 acetilcumarina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido gálico e ácido 4 hidroxicinâmico.

A precisão foi avaliada através da injeção do ponto médio da faixa linear de cada composto e sua respectiva área em triplicata por três dias (inter-dia) e em seis replicatas no mesmo dia (intra-dia). O resultado foi expresso através do coeficiente de variação percentual (CV%).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

Nos métodos que foram validados neste trabalho, os limites de quantificação foram calculados a partir da fórmula descrita no ICH (1996), que utiliza o desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão:

$$LQ = 10\sigma / IC$$

Onde:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

Para os métodos em que foi calculado o limite de detecção utilizou-se a fórmula descrita no ICH (1996), baseado no desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão:

$$LD = 3,3\sigma / IC$$

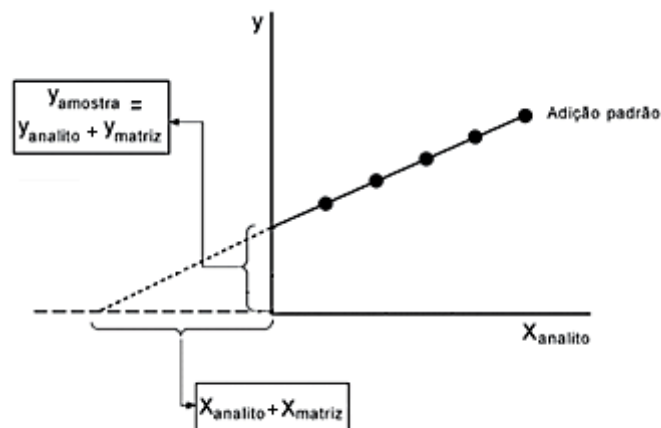
Onde:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

A exatidão foi avaliada através da técnica da adição do padrão que, segundo Ribani *et al.* (2004), consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades de substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. A figura 31

indica de forma esquemática a construção da curva e a extrapolação da reta no eixo das abcissas.



**Figura 31** – Representação esquemática da construção da curva analítica pelo método de adição padrão. Adaptado de Ribani et al., 2004

O extrato escolhido para avaliação deste parâmetro foi a infusão aquosa na concentração 0,1%. Este foi contaminado com quatro concentrações diferentes de cada analito, nas mesmas quantidades de padrão utilizadas para a confecção dos primeiros pontos da faixa linear de trabalho, obtendo-se uma curva analítica na amostra. O primeiro ponto de adição foi considerado o zero da amostra. O cálculo da concentração de cada componente foi realizado pelo cálculo da extrapolação da reta para o eixo das abcissas.

O método mostrou-se robusto uma vez que não sofreu variações na reprodutibilidade quando submetido a pequenas variações de pH e à mudança nos lotes de reagentes.

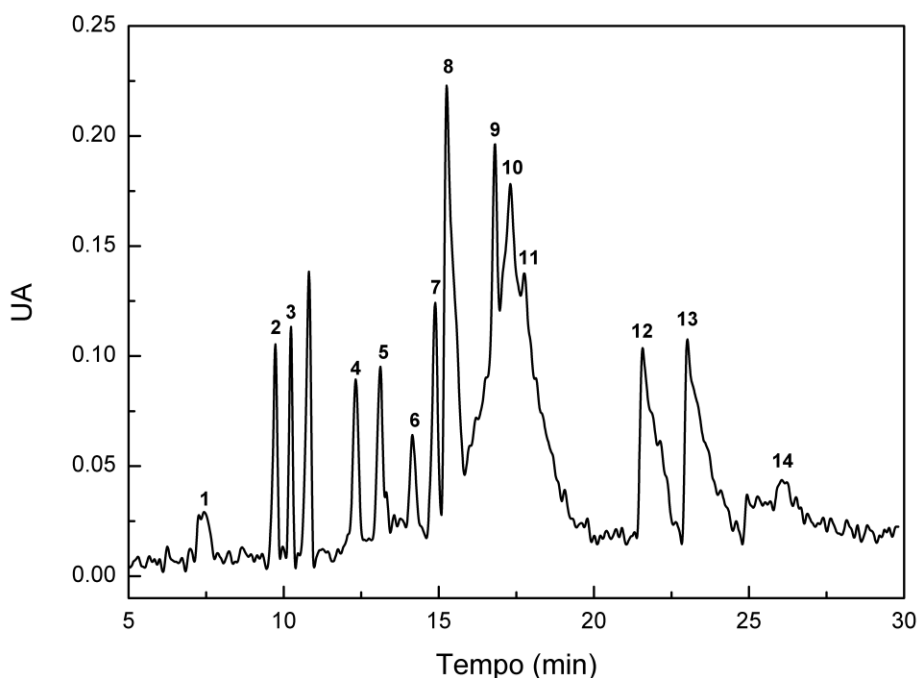
Os resultados da validação do método são mostrados na tabela 3.

**Tabela 3** – Resultado dos parâmetros de validação do método.

| Pico | Antioxidante          | Faixa Linear de Trabalho (mg L <sup>-1</sup> ) | Equação da Reta         | r    | LD (mg L <sup>-1</sup> ) | LQ (mg L <sup>-1</sup> ) | Precisão Intra-dia (CV%) | Precisão Inter-dia (CV%) | Exatidão (%) |
|------|-----------------------|--|-------------------------|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| 1    | 3 acetilcumarina      | 75-300   | $y = 0,00005x + 0,0023$ | 0,99 | 0,72                     | 2,41                     | 1,8                      | 4,47                     | 104,4        |
| 2    | Resveratrol           | 50-200   | $y = 0,0001x + 0,0029$  | 0,99 | 0,42                     | 1,41                     | 0,65                     | 5,77                     | 90,0         |
| 3    | 6 hidroxycumarina     | 25-150   | $y = 0,0001x + 0,0003$  | 0,99 | 1,31                     | 4,35                     | 1,31                     | 3,62                     | 108,0        |
| 4    | Catequina             | 50-200   | $y = 0,00003x + 0,003$  | 0,98 | 0,32                     | 0,97                     | 1                        | 0,97                     | 85,0         |
| 5    | Rutina                | 50-200   | $y = 0,00008x - 0,0004$ | 0,99 | 0,74                     | 2,46                     | 4,67                     | 4,33                     | 96,0         |
| 6    | Ácido Ferúlico        | 75-300   | $y = 0,0002x + 0,0002$  | 0,99 | 0,48                     | 1,61                     | 6,71                     | 1,61                     | 106,0        |
| 7    | Quercitrina           | 50-200   | $y = 0,0001x - 0,0006$  | 0,99 | 0,95                     | 3,18                     | 1,92                     | 3,76                     | 84,0         |
| 8    | Canferol              | 25-150   | $y = 0,0001x + 0,0029$  | 0,99 | 0,20                     | 0,67                     | 4,72                     | 3,4                      | 94,0         |
| 9    | Fisetina              | 25-150   | $y = 0,00004x - 0,0006$ | 0,98 | 0,09                     | 0,32                     | 3,59                     | 4,6                      | 99,0         |
| 10   | Miricetina            | 25-150   | $y = 0,0001x + 0,0008$  | 0,99 | 0,88                     | 2,69                     | 0,2                      | 3,4                      | 118,0        |
| 11   | Quercetina            | 25-150   | $y = 0,00009x + 0,0028$ | 0,99 | 1,49                     | 4,51                     | 3,7                      | 4,5                      | 87,0         |
| 12   | Ácido Cafeico         | 75-300   | $y = 0,0003x - 0,0049$  | 0,99 | 2,96                     | 8,98                     | 4,2                      | 3,8                      | 98,7         |
| 13   | Ácido Gálico          | 75-300   | $y = 0,0003x + 0,0208$  | 0,99 | 0,44                     | 1,49                     | 2,96                     | 1,02                     | 109,5        |
| 14   | Ác. 4 hidroxycinâmico | 75-300   | $y = 0,0001x + 0,0119$  | 0,99 | 1,60                     | 4,86                     | 3,6                      | 3,7                      | 105,3        |

• 5.1.3 Aplicação do método na determinação dos polifenóis em extratos de *Conarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk

Primeiramente foi realizado um *screening* nas amostras a partir da infusão, do extrato bruto etanólico, fração butanólica, fração acetato de etila e suas hidrólises alcalinas, para a identificação dos possíveis antioxidantes presentes nessas amostras a partir do método otimizado e validado. A figura 32 retrata um eletroferograma dos padrões adicionados à amostra extraída sob infusão aquosa na concentração 5%.

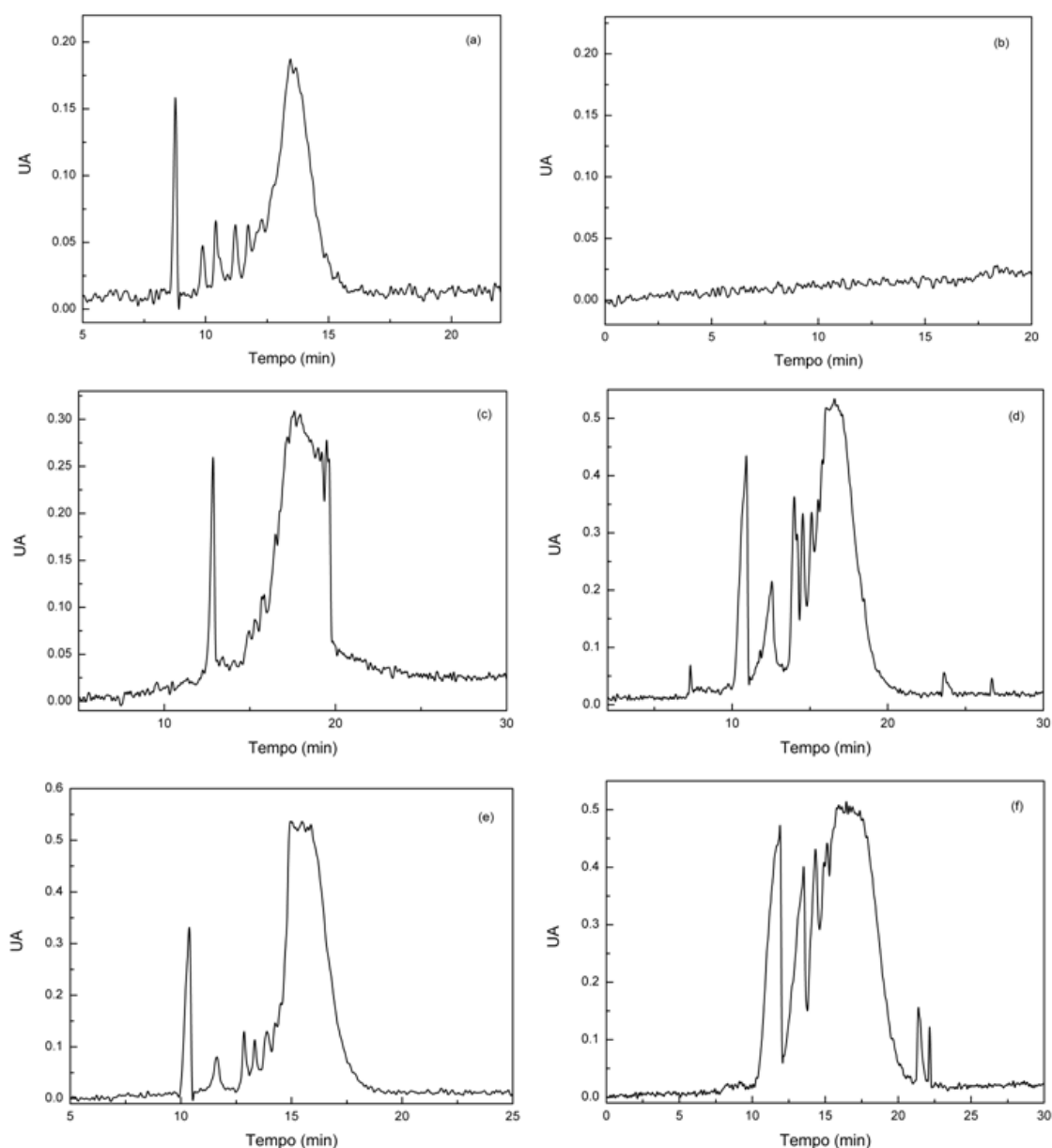


**Figura 32** – Eletroferograma dos antioxidantes ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) adicionados a uma amostra de infusão aquosa 5%; (1) 3 acetilcumarina, (2) resveratrol, (3) 6 hidroxycumarina, (4) catequina, (5) rutina, (6) ácido ferúlico, (7) quercitrina, (8) canferol, (9) fisetina, (10) miricetina, (11) quercetina, (12) ácido cafeico, (13) ácido gálico, (14) ácido 4 hidroxicinâmico. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

Após a confirmação de que todos os padrões podem ser detectados com o método validado mesmo com a complexidade da amostra, foram adicionadas

concentrações maiores de cada analito individualmente nas amostras, para confirmar a presença ou ausência do mesmo.

A figura 33 representa um esquema com os eletroferogramas obtidos de todas as amostras trabalhadas na tentativa de identificar os analitos detectáveis pelo método.

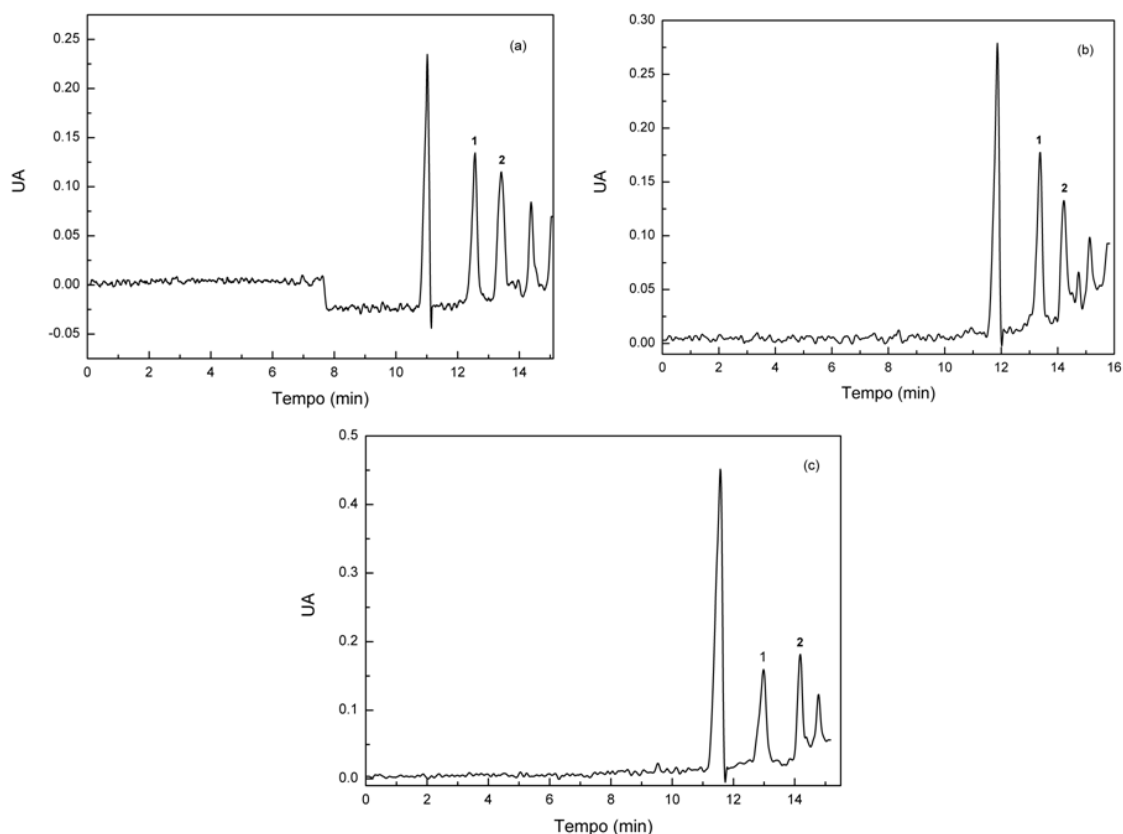


**Figura 33** – Eletroferogramas obtidos após injeção das amostras (a) Infusão 0,5%, (b) SPE em C18 da infusão 20%, (c) hidrólise alcalina da planta bruta, (d) extrato bruto etanólico ressuspensionado em metanol na concentração 5%, (e) fração butanólica do extrato, ressuspensionado em metanol na concentração 5%, (f) fração acetato de etila do extrato ressuspensionado em metanol na concentração 5%. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$  (56 cm até o detector); detecção direta por UV em 230nm; temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.



Nota-se que apenas na amostra tratada com SPE não houve detecção de nenhum pico. Isso provavelmente se deve ao fato de que o SPE faz com que pequenas quantidades de analito permaneçam na amostra limpa após o processo de eluição.

Dentre as demais amostras, foi detectada a presença de catequina e rutina nas amostras de infusão aquosa, fração bruta etanólica e fração butanol, cujos eletroferogramas são retratados a figura 34. Não se descarta a presença destes compostos nas hidrólises alcalinas e na fração acetato de etila. Porém, pelo método proposto, não foi possível fazer sua identificação, tanto pela complexidade da amostra como pela sensibilidade do método.



**Figura 34** – Eletroferogramas obtidos para confirmação dos compostos catequina (1) e rutina (2) nas amostras; (a) Infusão 5%, (b) fração bruta etanólica ressuspensa em metanol na concentração 1,5% (c) fração butanólica ressuspensa em metanol na concentração 4%. Condições: eletrólito de trabalho tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 15% (v/v), potencial de separação -20 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm; detecção direta por UV em 230nm; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

A concentração dos antioxidantes nas amostras foi também determinada e calculada pelo método da adição do padrão, obtendo-se a quantificação do composto em cada uma das amostras da mesma forma que foi feito o ensaio da exatidão. Os resultados dos valores obtidos estão listados na tabela 4.

**Tabela 4** – Teor dos compostos catequina e rutina encontrados nos extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*.

| Antioxidante | Infusão (mg/g de planta) | Extrato bruto etanólico (mg/g de planta) | Fração butanol (mg/g de planta) |
|--------------|--------------------------|--|---------------------------------|
| Catequina    | 1,05                     | 0,23                                     | 0,15                            |
| Rutina       | 3,43                     | 0,27                                     | 0,31                            |

Embora o extrato bruto e a fração butanol tenham apresentado menor teor de compostos em relação à planta total utilizada na confecção dos extratos, seu fator de concentração é muito maior nas referidas frações. Ou seja, os extratos confeccionados com solventes orgânicos possuem maior quantidade de antioxidantes em menor massa, de acordo com a tabela 5. Além disso, pode-se concluir também que a infusão extraiu uma quantidade considerável de rutina e catequina na planta a partir do simples aquecimento da planta em água numa concentração de 30%. Se somarmos as concentrações de rutina e catequina encontradas a partir da infusão, observa-se que esses 2 antioxidantes constituem cerca de 0,5% (m/m) da massa bruta de planta medicinal. Considerando a ingestão do extrato para fins medicinais, a solução obtida na forma de chá fornece uma ingestão de 102,9 mg de rutina e 31,5 mg catequina a partir de 100 mL da infusão da planta medicinal. Considerando o uso da planta na medicina tradicional na forma de chá, essa informação é relevante e deve ser levada em consideração nesse trabalho. Do ponto de vista farmacológico, um extrato aquoso de barbatimão do Pará obtido por infusão a 30% (80°C) proporciona uma ingestão diária de cerca de 300 mg

de Rutina e cerca de 100 mg de Catequina, se considerarmos uma dose total a partir de 3 infusões ao dia.

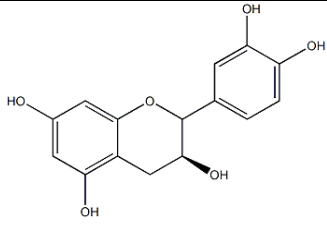
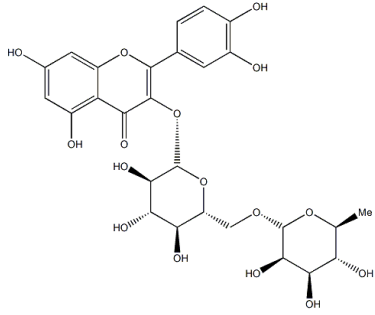
**Tabela 5** – Teor dos compostos catequina e rutina nos extratos secos e fator de concentração em relação à planta total.

| Antioxidante | Teor no extrato seco (mg/g) |            | Fator de concentração no extrato |            |
|--------------|-----------------------------|------------|----------------------------------|------------|
|              | Etanólico                   | Butanólico | Etanólico                        | Butanólico |
| Catequina    | 4,92                        | 2,61       | 21,7x                            | 17,2x      |
| Rutina       | 5,96                        | 5,35       | 21,7x                            | 17,2x      |

Do ponto de vista tecnológico, a concentração desses antioxidantes em frações polares em extratos secos obtidos a partir de macerados em etanol a 70% e sua sub-fração butanólica leva à obtenção de um produto concentrado dessas espécies. Além de concentrar os antioxidantes em cerca de 20 vezes (comparado à planta seca e moída), os extratos secos proporcionam a obtenção de concentrados mais puros e que podem originar produtos bioativos com alta atividade farmacológica.

Dentre as quantidades encontradas nas frações, podemos fazer um comparativo entre qual antioxidante se concentra mais em cada fração. O resultado está exposto na tabela 6.

**Tabela 6** – Distribuição dos compostos catequina e rutina em porcentagem nas frações etanólica e butanólica.

| Antioxidante   | Distribuição na planta (partição %) |                         |
|--|-------------------------------------|-------------------------|
|  | Extrato seco etanólico              | Extrato seco Butanólico |
|  <p>Catequina</p> | 60,23                               | 39,77                   |
|  <p>Rutina</p>   | 46,83                               | 53,17                   |

Como pode-se observar, a partição da catequina se dá em maior grau na fração mais polar (etanol), ao passo que a rutina se particiona de forma equivalente na fração etanólica e butanólica. Esse aspecto pode ser explicado pelas diferenças estruturais desses 2 antioxidantes. A catequina é um composto de menor peso molecular e estrutura mais simples se comparada à rutina. Sendo a rutina um composto maior e de menor polaridade, sua distribuição nos extratos secos obtidos a partir de álcoois polares e de cadeia curta (C1-C4) se dá de forma equivalente. Entretanto, como cada extrato seco concentra outros compostos antioxidantes e outras classes de compostos com outros mecanismos de ação, cada fração pode apresentar uma atividade farmacológica devido a efeitos sinérgicos ou antagônicos de outros compostos bioativos. Portanto, um estudo mais aprofundado desses extratos como possíveis produtos bioativos deve envolver estudos empregando modelos em nível celular (*ex vivo*) e modelos animais (*in vivo*). Da mesma

forma, o estudo de outras classes de compostos bioativos nesses extratos (p.ex. triterpenóides) é de grande importância do ponto de vista farmacológico.

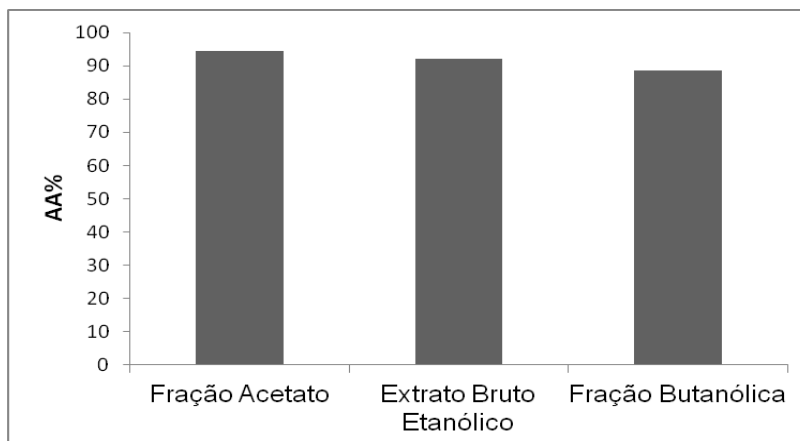
- **5.2 Atividade anti-radicalar de extratos de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk**

A atividade anti-radicalar foi testada por diferentes métodos para as frações aquosa, etanólica, butanólica e acetato de etila. Para a infusão foram testadas as atividades contra o radical DPPH, ânion radical superóxido, radical hidroxila e radical peroxila. Para as demais amostras, somente a atividade contra o radical peroxila não foi realizada.

- **5.2.1 Radical DPPH**

Frente ao radical DPPH, a fração que mais apresentou atividade antioxidante foi a fração acetato de etila (94,43%) (figura 35). Como não foi possível detectar nenhum dos compostos antioxidantes trabalhados nesta fração, não se pode dizer a que se deve essa atividade, mas supõe-se que esteja envolvida com outra classe de compostos, que sejam mais facilmente extraídos em um solvente mais polar.

Apesar de a metodologia de DPPH ser amplamente utilizada na literatura para mensurar a atividade antioxidante de plantas medicinais (KRISHNAIAH *et al.*, 2011), se trata de um radical sintético e relativamente estável, diferentemente das espécies reativas de oxigênio que são espécies produzidas no organismo e que podem causar efeitos danosos.

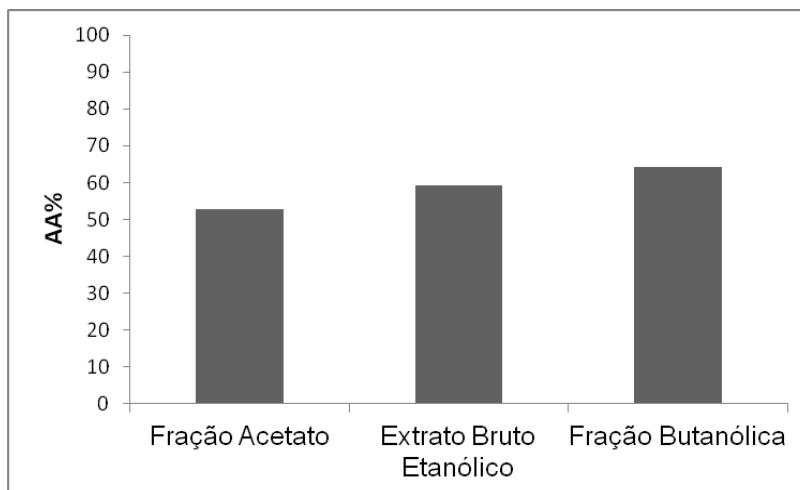


**Figura 35** – Atividade antioxidante frente ao radical DPPH das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).

- 5.2.2 Radical Superóxido

As três frações apresentaram atividade antioxidante frente ao radical superóxido, de acordo com a figura 36, sendo que o extrato butanólico foi o que obteve melhor desempenho (64,23%). O teste realizado para mensurar a capacidade antioxidante frente a esse radical ocorre em pH fisiológico, resultando nas mesmas condições de formação do mesmo *in vivo*. Além disso, o superóxido é uma das principais fontes de formação de outros radicais, como o radical hidroxila, mostrando a importância da aplicação desta metodologia.

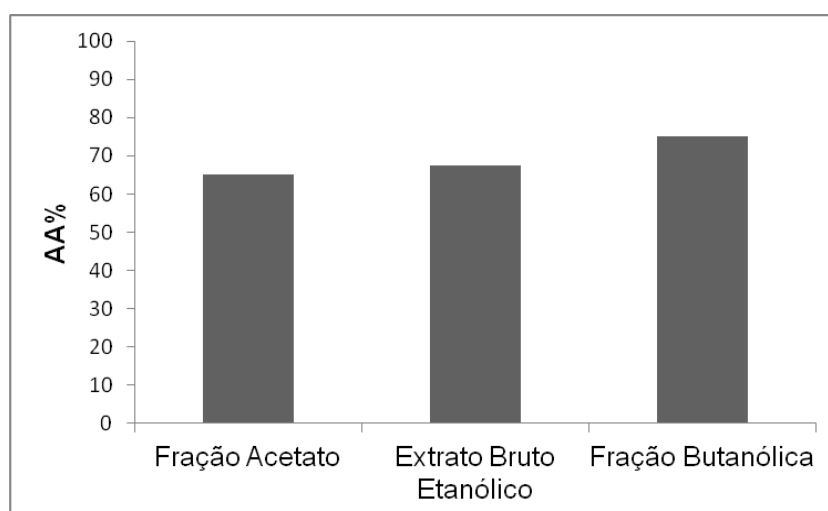
A fração com menor atividade antioxidante nessas condições foi a fração acetato (52,77%), contrário ao que ocorre no teste do DPPH. Este fato retoma a questão de que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante na fração acetato são diferentes dos compostos encontrados nas outras frações, fazendo com que essa porção reaja diferentemente para cada radical.



**Figura 36** – Atividade antioxidante frente ao ânion radical superóxido das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).

- 5.2.3 Radical Hidroxila

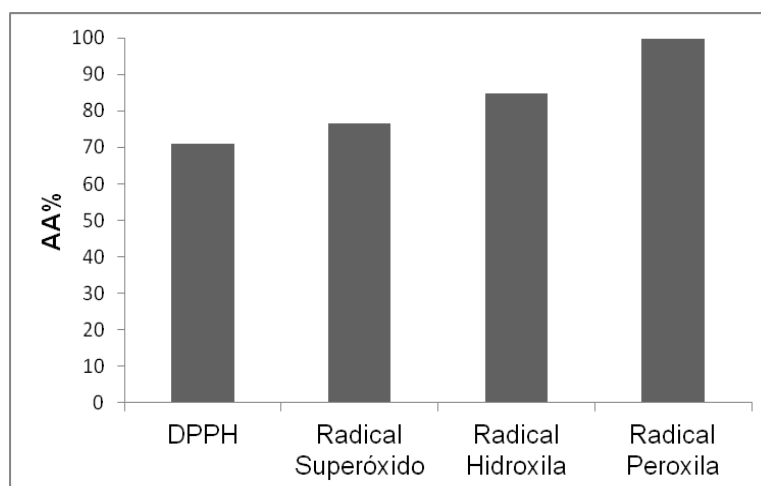
Na avaliação da atividade antioxidante frente ao radical hidroxila, observou-se um aumento no desempenho das três frações, conforme a figura 37. Porém, a relação crescente em relação à fração butanólica (74,97%) manteve-se. O radical hidroxila é o mais danoso ao organismo, mostrando que a planta em geral apresenta bons resultados para a metodologia.



**Figura 37** – Atividade antioxidante frente ao radical hidroxila das frações acetato de etila, bruta etanólica e butanólica. Todos os extratos foram ressuspensos em metanol na concentração 5% (m/v).

- 5.2.4 Atividade anti-radicalar da infusão

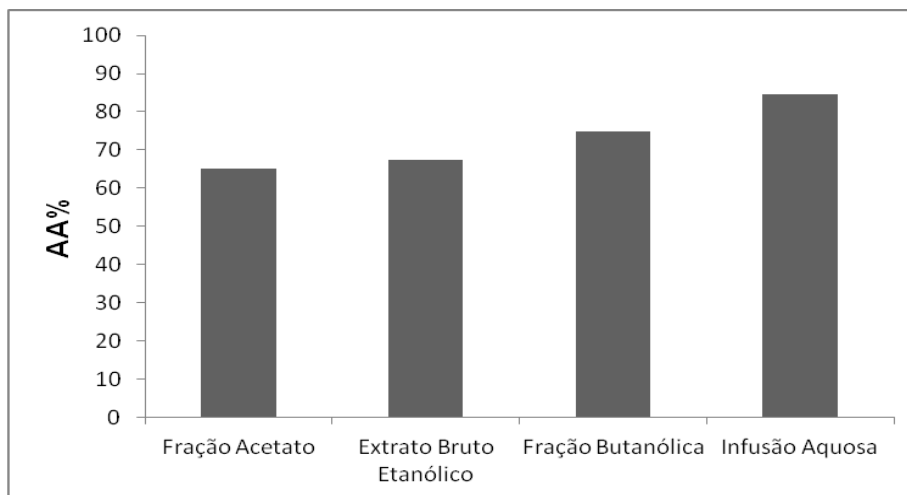
O estudo da atividade antioxidante *in vitro* na amostra de infusão aquosa foi discutido separadamente pela existência de mais um método realizado para esse extrato. Os resultados são mostrados na figura 38.



**Figura 38** – Atividade antioxidante da infusão aquosa na concentração 10% frente aos radicais DPPH, superóxido, hidroxila e peroxila.

Dentre os radicais avaliados, a infusão aquosa exerce maior atividade anti-radicalar contra radicais peroxila. Se fizermos uma comparação de todos os métodos, a infusão aquosa apresentou os níveis mais altos de atividade antioxidante frente a maioria dos radicais se comparada aos extratos secos alcoólicos e acetato (menos polares), como pode ser observado na figura 39.





**Figura 39** – Atividade antioxidante da infusão aquosa e frações frente ao radical hidroxila.

Esse resultado corrobora, em parte, os resultados de caracterização por eletroforese capilar onde catequina e rutina foram determinadas em concentrações relativamente altas (~0,5 g% da planta seca) nas infusões aquosas a 30%. Isso pode estar relacionado à sua capacidade antioxidante em si ou também ao fator concentração, já que os extratos fracionados foram ressuspensos a 5% e a infusão aquosa diluiu-se a apenas 10% para uso nas metodologias para medida da atividade antiradicalar.

O mais importante a ser percebido é que, dentre as frações, o fato de os extratos butanólico e etanólico bruto terem apresentado mais atividade frente aos radicais do que a fração acetato de etila, pode ser associado com a polaridade dos solventes extratores. Butanol e etanol são mais polares que acetato de etila; logo, é normal que extraiam mais compostos polares (no caso, a maioria dos antioxidantes estudados). Neste caso, os antioxidantes rutina e catequina devem estar diretamente envolvidos nesta atividade, seja por ação direta (anti-radicalar) ou indireta. No caso da ação indireta, tanto rutina como catequina podem estar envolvidas em atividade protetora a outros antioxidantes enquanto agentes redutores (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007), como também na ativação de enzimas envolvidas no ataque a espécies reativas de oxigênio (p. ex. superóxido dismutase e catalase) (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007).

## • 6 CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu uma metodologia analítica empregando eletroforese capilar, permitindo a determinação simultânea de 14 compostos fenólicos em amostras de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk, planta pouco estudada da região Amazônica. O método eletroforético com detecção UV mostrou-se apto para ser aplicado na investigação dos antioxidantes escolhidos.

A metodologia permitiu a detecção de 3-acetilcumarina, resveratrol, 6-hidroxycumarina, catequina, rutina, ácido ferúlico, quercitrina, canferol, fisetina, miricetina, quercetina ácido cafeico, ácido gálico e ácido 4-hidroxicinâmico em uma mesma corrida em tempo de análise relativamente curto (24 minutos). Na espécie de planta em estudo, foi possível fazer a identificação e quantificação dos compostos catequina e rutina em diferentes extratos (infusão aquosa, extrato seco etanólico e butanólico).

Considerando os teores dos compostos em mg/g de planta, foram encontrados os valores de 1,05 de catequina e 3,43 de rutina na infusão aquosa, 0,23 de catequina e 0,27 de rutina no extrato bruto etanólico e 0,15 de catequina e 0,31 de rutina na fração butanólica. Esses valores são bastante significativos se considerarmos a porcentagem de antioxidantes em relação à massa total.

Realizando-se, ainda, uma comparação entre os valores obtidos na planta total e nos extratos concentrados, percebeu-se que os mesmos foram capazes de concentrar os compostos polifenólicos 21,7 vezes na extração com etanol e 17,2 vezes na extração com butanol.

Além disso, a capacidade antioxidante de *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk foi avaliada através de diferentes métodos *in vitro*, tanto contra radicais sintéticos (DPPH) quanto contra radicais fisiologicamente importantes. A planta mostrou boa ação contra todos os radicais livres testados nos diferentes extratos obtidos, mostrando um bom potencial antioxidante em geral.

Frente ao radical DPPH, a fração acetato de etila apresentou maior atividade (94,43%), ainda que não se tenha conhecimento sobre quais

compostos seriam responsáveis por esse alto desempenho. Frente aos radicais superóxido e hidroxila, a fração com maior atividade foi a butanólica (64,23% e 74,97%, respectivamente).

A atividade anti-radicalar da infusão foi realizada separadamente e o maior desempenho deste tipo de extração foi contra o radical peroxila, ainda que a extração em água tenha apresentado boa atividade contra todos os radicais em estudo. Fazendo-se um comparativo entre todas as frações e a infusão, notou-se que a última apresenta maior atividade antioxidante contra a maioria dos radicais.

Esse resultado corrobora com os resultados de caracterização por eletroforese capilar, onde catequina e rutina foram determinadas em concentrações relativamente altas neste tipo de extrato.

## • 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Além disso, indústrias farmacêuticas e de alimentos têm explorado bastante esse mercado, para que se possa buscar novas moléculas e caminhos alternativos de tratamento para as mais diversas doenças.

Dessa forma, tem se explorado recursos naturais pouco conhecidos, buscando identificar compostos bioativos presentes em fontes naturais. Um dos grupos de grande importância, conhecido por sua excelente atividade antioxidante, é o dos compostos fenólicos. Para sua procura em matrizes vegetais, se faz necessária a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, que permitam uma investigação minuciosa mesmo em amostras complexas.

Pesquisas envolvendo esta espécie de barbatimão ainda são escassas na literatura científica. Além disso, uma pesquisa completa com determinada planta medicinal deve envolver desde investigações da medicina tradicional e popular até estudos fitoquímicos envolvendo isolamento/purificação/caracterização de princípios ativos, investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados e a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos. Nesse contexto, podemos assegurar que a espécie de barbatimão estudada neste trabalho tem grande potencial antioxidante, podendo essa característica ser um ponto de partida para estudos subsequentes.

Retoma-se por fim, um ponto importante, que justifica o foco deste trabalho: o Brasil não possui ainda dados oficiais sobre a dimensão do mercado nacional de plantas medicinais, apesar de ser apontado muitas vezes como a nação com a maior biodiversidade do planeta. Aliado a isso, a maior parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos científicos para

permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país com uma grande biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas medicinais e as pesquisas existentes.

## • 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F, ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M.; A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radical in aquatic organism: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 402, p. 2115-2123, 2009.

ARJUNAN, V.; SAKILADEVI, S.; MARCHEWKA, M. K.; MOHAN, S. FTIR, FT-Raman, FT-NMR and quantum chemical investigations of 3-acetylcoumarin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 109, p. 79-89, 2013.

ARLORIO, M., COÏSON, J. D., & MARTELLI, A. Validation of an isocratic HPLC method based on the use of ABZ+ plus phase for the simultaneous determination of methylxantines, chlorogenic acid, some hydroxy-benzoic and hydroxy-cinnamic acids. Application to cocoa, coffee, tea and cola-drinks. **Chromatographia**, v.52, p. 579–583, 2000.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research Internacional**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2012.

BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M. Plantas de Uso Medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-662, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

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

BOONE, C. M.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W. J. M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs – a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 831-863, 1999.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides de *Baccharis trimera* (Less.) DC Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 63-67, 2002.

BRAGANHOL, E. **Quercetina: efeitos sobre parâmetros proliferativos e sobre a ecto-5'-nucleotidase em linhagem de glioma humano U138MG**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

BUIARELLI, F., CARTONI, G., COCCIOLI, F., & LEVETSOVITOU, Z. Determination of phenolic acids in wine by high-performance liquid chromatography with a microbore column. **Journal of Chromatography**, v. 695, p. 229-235, 1995.

CAI, Y. Z.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

CANALS, I.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Prediction of the separation of phenols by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 2, p. 355-366, 2002.

CARVALHO, L. M. de; SPENGLER, C.; LIMA, A. P. S. de; RAABE, A.; MARTINI, M.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER D. Determinação simultânea de

cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, v.32, n. 8, p. 2203-2208, 2009.

CAZARIN, M.; SARIDAKIS, H. O. Ação dos antioxidantes na lesão por isquemia e reperfusão. **Interbio**, v. 1, n. 1, 2007.

CHEN, Z.; ADAMS, M. A. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic acids in plant tissue extracts by ionexclusion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 386, p. 249–256, 1999.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DAVID, J. M. P.; DAVID, J. P.; SANTOS, V. L. C. S.; SANTOS, M. L. S.; MOTA, M. D. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos & Ciência**, n. 10, 2007.

DELAGE, E.; BOHUON, G.; BARON, A.; DRILLEAU, J. F. Highperformance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 555, p. 125–136, 1991.

DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; CORREA, C. R.; FREIRE, C. M. M.; MOREIRA, P. L.; BERCHIERI-RONCHI, C. B.; REIS, R. A. S.; NOGUEIRA, C. L. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto de estresse oxidativo na patogênese. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plants phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2101-2110, 2002.



GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 304-309, 2010.

GÖKMEN, V.; ACAR, J.; KAHRAMAN, N. Influence of conventional clarification and ultrafiltration on the phenolic composition of golden delicious apple juice. **Journal of Food Quality**, v. 26, p. 257-266, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th Ed.; Oxford University Press: New York, 2007.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 481- 504, 2000.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, G.; BORGES-MIQUEL, T.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Determination of antioxidants in edible grain derivatives from the Canary Islands by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 91, p. 105-111, 2005.

HILGEMANN, M., **Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de plantas medicinais**. Tese de Doutorado, UFSM, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HURTADO-FERNANDÉZ, E.; GÓMEZ-ROMERO, M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNANDÉZ-GUTIÉRREZ, A. Application and potencial of capillary electroseparation methods to determine antioxidant compounds from plant food material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1130-1160, 2010.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2B: Methodology, 1996.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

KLEDJUS, B.; KUBAĆA, V. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in seed exudates of *Festuca arundinacea* and *F. pratense*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 375, 2000.

KOK, W. Capillary electrophoresis: instrumentation and operation. **Chromatographia Supplement**, v. 51, 2000.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R.; A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, p. 217-233, 2011.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary electrophoresis: principles and practice**. Springer-Verlag, Alemanha, 1993.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. A new class of phytoalexins from grapevines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 33, n.2, p. 151-152, 1977.

LIMA, F. **Estudo fotoquímico da ação anti-radicalar de compostos polifenólicos empregando espectrofotometria e HPLC-UV**. Dissertação de mestrado, UFSM, 2010.

LOBO, I.; MOZETO, A. A.; CASS, Q. B. Determination of phenolic compounds from oxidation of lignin lake sediments by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 52, p.727–731, 2000.

MAHER, P.; AKAISHI, T.; ABE, K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16568-16573, 2006.

MANSON, M. M. Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 11-18, 2003.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, 2006.

MELO, G. O.; COSTA, S. S. Produtos Naturais para o tratamento da doença de Alzheimer: promessa e desafio. **Revista Fitos**, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2005.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 508, n. 2, p. 164-170, 2011.

OLIVARES, L. D.; CABRERA, G. B.; MARTÍNEZ, M. T. S. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. **Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes**, n. 50, p. 10-15, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, *print version*, 2009.

OU, S. Y.; LUO, Y. L.; HUANG, C. H.; JACKSON, M. Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 253-259, 2009.

PARACAMPO, N. E. N. P. *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae): tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará. **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, PA, 2011.

PAZOUREK, J.; GAJDOSOVÁ, M.; SPANILÁ, M.; FARKOVÁ, M.; NOVOTNÁ, K.; HAVEL, J. Analysis of polyphenols in wines: Correlation between total polyphenolic content and antioxidant potential from photometric measurements: Prediction of cultivars and vintage from capillary zone electrophoresis fingerprints using artificial neural network. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, n. 1, p. 48-54, 2005.

PEDRIALI, C. A. **Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for anti-oxidant activities applying 2,20-azinobis(3-ethylenebenzothia-zoline)-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; GLENNIE, V. A. Echinacea standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1702–1706, 2001.

PIVETA, M. Estudos sugerem que compostos do vinho tinto aumentam a longevidade. **Boletim da FAPESB**, v. 112, p. 44-47, 2005.

PRASATH, G. S.; SUBRAMANIAN, S. P. Fisetin, a tetra hydroxy flavone recuperates antioxidant status and protects hepatocellular ultrastructure from hyperglycemia mediated oxidative stress in streptozotocin induced experimental diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Article in Press, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIZZI, G. P.; BOEKLEY, L. J. Observation of ether-linked phenolic products during thermal degradation of ferulic acid in the presence of alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1666-1670, 1992.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**, v. 122, p. 11-34, 1997.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

SAFRA, J.; POSPÍSILOVÁ, M.; HONEGR, J.; SPILKOVÁ, J. Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis an capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 124-132, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SAUL, N.; PIETSCH, K.; MENZEL, R.; STÜRZENBAUM, S. R.; STEINBERG, C. E. W. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to

disposable soma. **Mechanisms of Ageing and Development**, n. 130, p. 477-486, 2009.

SCHOLZ, F.; GONZALEZ, G. L. L.; DE CARVALHO, L. M.; HILGEMANN, M.; BRAININA, K. Z.; KAHLERT, H.; JACK, R. S.; MINH, D. T. Indirect electrochemical sensing of radicals and radical scavengers in biological matrices. **Angewandte Chemie (International Edition)**, v.46, p.8079 - 8081, 2007

SEGUIN, J.; BRULLÉ, L.; BOYER, R.; LU, Y. M.; ROMANO, M. R.; TOUIL, Y. S.; SCHERMAN, D.; BESSODES, M.; MIGNET, N.; CHABOT, G. G. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, p. 146-154, 2013.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, J.A.F da. **Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética**, Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, J.A.F. da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed, editora da UFRGS, Porto Alegre, 2010.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SUNTORN SUNK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 679-698, 2002.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TAMURA, M.; OCHIAI, K. Exploring the possible applications of catechin (gel) for oral care of the elderly and disabled individuals. **Japanese Dental Science Review**, n. 48, p. 126-134, 2012.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Capillary electrophoresis: A new technique in the analysis of plant secondary metabolites. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 177-192, 1995.

TORRES Y TORRES, J. L.; ROSAZZA, J. P. N. Reactions of p-coumaric acid with nitrite: product isolation and mechanism studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1486-1492, 2001.

TÜCKMANTEL, W.; KOZIKOWSKI, A. P.; ROMANCZYK JR, L. J. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 12073-12081, 1999.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 65-74, 2009.

WAGNER, C. **Avaliação do potencial antioxidante da quercitrina sobre a peroxidação lipídica**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

WATABANE, T.; TERABE, S. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 311-322, 2000.

WU, C.; YANG, J.; WANG, F.; WANG, X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2013.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 1619-1624, 2002.

ZANATTA, L. **Efeito insulino-mimético do Canferol-3-Neohesperidosídeo na captação da 2-[14c (u)]-deoxi-dglicose no músculo sóleo de ratos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ZHANG, L.; DONG, S.; YANG, Z.; WANG, Q.; HE, P.; FANG, Y. Determination of four polyphenolic active ingredients from a pharmaceutical preparation by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 1, p. 198-200, 2008.

ZHAO, H.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.; LIN, Y.; FAN, W.; GU, G. Effects of extraction solvent mixtures and antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 7277-7286, 2006.

ZHAO, W.; RICHARDSON, S.; MOMBOURQUETTE, M. J.; WEIL, J. A. An *in vitro* EPR study of the free-radical scavenging actions of the lazaroid antioxidants U-74500A e U-7851F. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 1, p. 21-30, 1995.

ZHOU, K.; YU, L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 37, p. 717-721, 2004.