



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Géssica Domingos da Silveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM EXTRATOS
DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA**

por

Géssica Domingos da Silveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS)

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

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

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM EXTRATOS
DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA**

elaborada por
Géssica Domingos da Silveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Diogo de Oliveira Silva
(UNIFESP)

Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa
(UFSM)

Santa Maria, 12 de Março de 2014.

*Dedico este trabalho
A todos os alunos de
pós-graduação que passam
horas a fio dentro de um
laboratório em prol do
progresso da pesquisa
científica e às pessoas que os
apóiam nessa caminhada,
sejam elas mãe, pai,
namorado, amigo, tio, avô ou
cachorro!*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, a Luz Divina, Ao Arquiteto ou quem quer que seja essa força suprema que esteve ao meu lado durante esses dois intensos anos. Por todas as vezes que me ajoelhei e pedi paciência para continuar, pois se tivesse me concedido forças talvez eu tivesse atirado o cromatógrafo pela janela (risos). Por todas as vezes que acalentou meu coração nas dificuldades pessoais e familiares que enfrentei ao longo desse trabalho e que não foram poucas. Mas principalmente por ter me permitido chegar ao fim desse tempo com a consciência tranquila de dever cumprido.

Gostaria de agradecer ao Professor Leandro Machado de Carvalho por todos esses anos de convivência, por todo conhecimento científico que me foi agregado. Pela oportunidade de realizar esse trabalho e principalmente pela amizade, rodas de violão e cafés na cozinha do laboratório que com certeza tornaram todo o processo científico muito mais prazeroso.

Aos meus pais, João Goulart e Tereza Domingos, que apesar de tudo que passamos, sempre priorizaram as minhas escolhas e me deram apoio e colo quando precisei. Por me incentivarem a continuar quando pensei em desistir, por me ensinarem a dar o meu melhor em qualquer coisa que eu faça. Por me ensinarem a amar.

Ao meu irmão Pedro Afonso, pelas críticas, pelas risadas, pelos abraços e principalmente por me fazer ouvir e entender que nem sempre tudo é como desejamos.

Ao meu amor, Douglas Donaduzzi, por ser o meu porto seguro, pelo carinho e todo o amor que me ofereces a cada troca de olhar. Agradeço pelo suporte na realização desse trabalho, pelo interesse na minha pesquisa, pela companhia nas noites intermináveis de faixa linear e pela compreensão.

As minhas amigas e colegas de trabalho, Larissa Muller, Gabriela Zemolin, Diana Muratt, Ana Paula Moreira, Mariele Martini, Luciana Gobo e Daiane Dias. Obrigada pela troca de experiências, pelo companheirismo, pelas risadas, pelo apoio sempre. Sem vocês teria sido muito mais difícil, muito mais sem graça e muito mais silencioso (risos).

Em especial, a Monique Jung, por todo o apoio ao longo desse trabalho, por ser meu braço direito, “pau para toda obra”, por ser incrivelmente competente e claro, pela amizade.

Aos professores Marcelo Barcellos e Diogo Silva, desde já pelas contribuições e pela disponibilidade em avaliar esse trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Química.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

*“Já não me preocupo
Se eu não sei porquê
Às vezes o que eu vejo
Quase ninguém vê
E eu sei que você sabe
Quase sem querer
Que eu vejo o mesmo que você.
Tão correto e tão bonito
O infinito é realmente
Um dos deuses mais lindos,
Sei que às vezes uso
Palavras repetidas
Mas quais são as palavras
Que nunca são ditas? (...)”*
Renato Russo

RESUMO

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

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA

Autor: GÉSSICA DOMINGOS DA SILVEIRA

Orientador: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data: Santa Maria, 12 de Março de 2014.

A maioria dos radicais livres gerados no organismo é derivada do oxigênio e estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças. As plantas medicinais são um recurso terapêutico natural na prevenção de patologias e têm sido utilizadas a milênios pela humanidade nos primeiros cuidados com a saúde. Muitas dessas propriedades das plantas estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos os quais possuem diversas propriedades farmacológicas e antioxidantes. A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada na identificação e quantificação desses compostos em plantas. Dessa forma, o presente trabalho desenvolveu e validou um método de HPLC – PAD utilizando eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho para a caracterização de 12 compostos fenólicos em extratos de plantas medicinais da Amazônia. Os extratos das espécies *Conarus perrotettii* var *angustifolius*, *Mansoa alliacea*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa*, *Bauhinia variegata* e *Bauhinia alboflava* demonstraram a presença de pelo menos um dos compostos antioxidantes em estudo. Além disso, as espécies apresentaram atividade antioxidante *in vitro* frente à espécies reativas de oxigênio. A fração acetato da espécie *M. alliacea* demonstrou a maior atividade antioxidante *in vitro* ($70,85 \pm 4,06$ %) frente ao radical superóxido. Frente ao radical peroxil, a espécie *C. palmata* foi responsável pela maior atividade antioxidante ($95,33 \pm 0,95$ %) e frente ao radical hidroxil a espécie *C. obtusa* demonstrou a maior atividade sequestradora ($98,19 \pm 5,93$). O estudo da atividade antioxidante *in vitro* dessas espécies aliada a caracterização química dos seus extratos compreende uma importante chave para possíveis estudos *in vivo*. Ademais, os compostos identificados e quantificados nos extratos dessas espécies apresentam propriedades farmacológicas comprovadas e podem estar associados ao uso popular dessas plantas medicinais.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; Amazônia; compostos fenólicos; HPLC – PAD; atividade antioxidante;

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATION IN MEDICINAL PLANTS EXTRACTS FROM AMAZONIA

Author: GÉSSICA DOMINGOS DA SILVEIRA

Advisor: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Date: Santa Maria, March 12th, 2014.

Most of the free radicals generated in the body is derived from oxygen and are associated with the development of many diseases. Medicinal plants are a natural resource in the treatment prevention of diseases and have been used for the first healthcare. These properties of the plants are related to the presence of phenolic compounds which possess several pharmacological and antioxidant properties. The high performance liquid chromatography has been used to identify and quantify these compounds in plants. Therefore, this study developed and validated an HPLC - PAD method using gold as working electrode to characterize 12 phenolic compounds in herbal extracts from Amazon. The extracts from *Connarus perrotettii* var *angustifolius*, *Mansoa alliacea*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa*, *Bauhinia variegata* and *Bauhinia alboflava* showed the presence of at least one of the antioxidants compounds under study. Furthermore, the species showed *in vitro* antioxidant activity against reactive oxygen species. The acetate fraction of the species *M. alliacea* showed the highest *in vitro* antioxidant activity ($70.85 \pm 4.06\%$) against the superoxide radical. Front of the peroxy radical, the species *C. palmata* was responsible for the hidhest antioxidant activity ($95.33 \pm 0.95\%$) and against hydroxyl radical species *C. obtusa* showed the highest scavenging activity (98.19 ± 5.93). The study of the *in vitro* antioxidant activity of these species coupled with chemical characterization of their extracts comprises an important key to potential *in vivo* studies. Moreover, the compounds identified and quantified in these species extracts have pharmacological properties and may be linked to popular use of these medicinal plants

Key words: Medicinal Plants; Amazon; phenolic compounds; HPLC – PAD; antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fontes e respostas celulares às espécies reativas. (Adaptado de VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2007)	22
Figura 2: Via Biosintética da formação de fenólicos em plantas (Adaptado de AJILA <i>et al.</i> , 2011).....	32
Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides (ANGELO <i>et al.</i> , 2006).....	34
Figura 4: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b) (Adaptado de Ângelo <i>et a.</i> , 2007).....	34
Figura 5: <i>Cecropia obtusa</i>	37
Figura 6: <i>Cecropia palmata</i>	37
Figura 7: <i>Bauhinia variegata</i> var <i>alboflava</i>	38
Figura 8: <i>Bauhinia variegata</i>	38
Figura 9: <i>Mansoa alliacea</i>	40
Figura 10: <i>Connarus perrotettii</i> var <i>angustifolius</i>	41
Figura 11: Formação de radicais superóxido na conversão da Hipoxantina em Xantina e dessa em ácido úrico, pela ação da enzima xantina oxidase (Adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2010).....	44
Figura 12: Formação do formazan a partir da redução do NBT pelo radical superóxido gerado no sistema HPX/XOD (Adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2010).	44
Figura 13: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH (Adaptado de Alves <i>et al.</i> , 2010).	46
Figura 14: Reação química entre o radical DPPH e o BHT (antioxidante sintético). (Adaptado de Oliveira <i>et al.</i> , 2009).....	46
Figura 15: Foto do cromatógrafo Metrohm®.	49
Figura 16: Foto da célula de detecção equipada com eletrodo de ouro e um eletrodo de referência de hidrogênio (Hy-Ref).	50
Figura 17: Voltamogramas hidrodinâmicos dos compostos antioxidantes obtidos através do modo DC do detector amperométrico. Faixa de varredura de potenciais: -0,3 a +1,1 V. Tampão fosfato 10 mM, pH 2,00, 10 mg.L ⁻¹	61
Figura 18: Ciclo da aplicação de potencial na amperometria pulsada. E ₁ é o potencial de amostragem, E ₂ é o potencial de oxidação e E ₃ é o potencial de redução (Adaptado de CARVALHO <i>et al.</i> , 2013)	62

Figura 19: Cromatograma obtido a partir da injeção dos 12 compostos na concentração de 30 mg.L ⁻¹ , nas condições de 30% de metanol, 10 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio e pH 2,00. Fluxo da fase móvel 1 mL.min ⁻¹	64
Figura 20: Cromatograma obtido a partir da injeção dos 12 compostos na concentração de 30 mg.L ⁻¹ , nas condições de 30% de metanol, 50 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio e pH 2,00. Fluxo da fase móvel 1 mL.min ⁻¹ . O cromatograma menor ilustra a separação de Gálico, Catequina e Clorogênico alcançada com o aumento da concentração de fosfato na fase móvel.....	65
Figura 21: Cromatograma obtido através do método de cromatografia líquida de alta eficiência com eluição isocrática para os 12 compostos fenólicos em estudo a partir das condições otimizadas: Metanol 30%, Fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , α -ciclodextrina 1 mmol.L ⁻¹ , pH 2,00, fluxo da fase móvel 1 mL.min ⁻¹ , potencial de detecção + 0,7 V, 25 °C. (1) Ácido Gálico; (2) Catequina; (3) Ácido Clorogênico; (4) Ácido Cafeico; (5) Ácido p - coumárico; (6) Ácido Ferulico; (7) Resveratrol; (8) 4 - hidroxycumarina; (9) Rutina; (10) Miricetina; (11) Quercitrina; (12) Quercetina.	68
Figura 22: Voltamogramas hidrodinâmicos para os compostos flavona e crisina. Os compostos não interferem uma vez que não apresentam corrente de oxidação no potencial de trabalho otimizado.....	70
Figura 23: Identificação dos compostos Ácido Gálico (1) e Catequina(2) na infusão (0,5%) da espécie <i>Conarus perrotettii var angustifolius</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.....	77
Figura 24: Identificação dos compostos Ácido p - coumárico (5), Ácido Ferulico (6) e Resveratrol (7) no extrato acetato (0,5 %) da espécie <i>Mansoa alliacea</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.....	79
Figura 25: Identificação dos compostos Ácido Gálico (1), Catequina (2), Ácido Clorogênico (3), Ácido Cafeico (4), Ácido p – coumárico (5), e Quercetina (12) no extrato acetato (0,3%) da espécie <i>Bauhinia variegata</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.	81
Figura 26: Identificação do composto Rutina (9) na infusão (0,5%) da espécie <i>Bauhinia variegata var alboflava</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.	82
Figura 27: Identificação dos compostos Ácido p – coumárico (5) e Resveratrol (7) no extrato acetato (0,3%) da espécie <i>Cecropia palmata</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.....	84

Figura 28: Identificação de Ácido p-coumárico (5) no extrato acetato (0,3%) da espécie <i>Cecropia obtusa</i> pelo método cromatográfico HPLC – PAD.....	85
Figura 29: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das espécies de plantas medicinais frente ao radical DPPH.....	87
Figura 30: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical superóxido.	89
Figura 31: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical peroxil.	90
Figura 32: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical hidroxil.	91
Figura 33: Voltamograma cíclico do complexo de Rutênio obtido através da varredura de potenciais na faixa de -0,6 a +0,4 V. Velocidade de varredura: 500 mV.s ⁻¹ . Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Platina. (A) Antes do eletrodo ser recoberto; (B) Eletrodo recoberto com a monocamada - Ausência do sinal eletroquímico; (C) Regeneração do sinal eletroquímico do complexo de Rutênio após ataque radicalar; (D) Inibição do dano causado a monocamada pelo extrato de <i>Cecropia obtusa</i> na concentração de 0, 5 g.L ⁻¹	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de Espécies Reativas radicalares e não radicalares	24
Tabela 2: Espécies de plantas medicinais em estudo	52
Tabela 3: Polifenóis em estudo.....	57
Tabela 4: Parâmetros de linearidade do método desenvolvido.....	71
Tabela 5: Limites de detecção e quantificação para os compostos fenólicos em estudo.....	71
Tabela 6: Precisão do método desenvolvido	72
Tabela 7: Exatidão expressa em recuperação (%)......	73
Tabela 8: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Connarus perrottetii</i> var <i>angustifolius</i>	75
Tabela 9: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Mansoa alliacea</i>	76
Tabela 10: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Bauhinia variegata</i>	81
Tabela 11: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Bauhinia variegata</i> var <i>alboflava</i>	83
Tabela 12: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Cecropia palmata</i>	82
Tabela 13: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie <i>Cecropia obtusa</i>	85
Tabela 14: Atividade antioxidante das infusões das plantas medicinais na concentração de 10% frente às ERO.....	88
Tabela 15: Atividade antioxidante das infusões das plantas medicinais frente ao radical hidroxil utilizando uma monocamada auto-organizada adsorvida no eletrodo de ouro.....	94

LISTA DE ESQUEMAS E EQUAÇÕES

Esquema 1: Termodecomposição do reagente ABAP a 37°C e consequente formação de radicais peroxila que atuam na oxidação do reagente DCFH originando o composto fluorescente DCF. (Adaptado de Hilgemann, 2010 e Amado <i>et al.</i> , 2009).	45
Esquema 2: Formação do composto cromógeno a partir da decomposição da deoxirribose pelos radicais hidroxilas gerados a partir da reação de Fenton.	47
Esquema 3: Adsorção de hexanotiol na superfície do eletrodo de ouro. Ataque radicalar à monocamada auto organizada proporciona a recuperação do sinal eletroquímico. (Adaptado de Hilgemann <i>et al.</i> , 2010).	48
Equação 1: Formação de um cátion radical	22
Equação 2: Formação de um ânion radical	22
Equação 3: Formação de um produto não radicalar, o peroxinitrito	24
Equação 4: Radicais como agentes redutores	24
Equação 5: Radicais como agentes oxidantes	25
Equação 6: Abstração de H de uma ligação C – H por um radical.....	25
Equação 7: Formação de radicais peroxil	26
Equação 8: Reação de peróxido de hidrogênio com metais de transição.....	26
Equação 9: Homólise da água por exposição à radiação ionizante	26
Equação 10: Dismutação do radical superóxido	27
Equação 11: Formação do ácido conjugado, radical hidroperóxido, do radical superóxido.....	27
Equação 12: Redução do Fe (III) a Fe (II) e produção de radicais hidroxil.....	27
Equação 13: Reação de Haber-Weiss	28
Equação 14: Produção de radicais superóxido por fagócitos com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase.....	28
Equação 15: Oxidação dos grupos S – H por radicais superóxido.....	28
Equação 16: Dismutação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....	30
Equação 17: Redução do peróxido de hidrogênio a água.....	30
Equação 18-19: regeneração da enzima GSH.....	31
Equação 20: Estabilização do radical na peroxidação lipídica	32
Equação 21: Reação do radical fenoxil com outros radicais	33

Equação 22: Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante (%) frente ao radical DPPH.....	54
Equação 23: Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante (%) frente ao radical superóxido	56
Equação 24: Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante (%) frente ao radical hidroxil através da formação de uma monocamada auto-organizada.....	57

LISTA DE SIGLAS

ANCOMROS: Atividade antioxidante medida pela determinação de espécies reativas de oxigênio, do inglês, *Antioxidant Competence mensured by ROS determination*.

ERO: Espécies reativas de oxigênio, do inglês, ROS - *Reactive oxygen species*.

HPLC: Cromatográfica Líquida de alta Eficiência, do inglês, *High performance liquid chromatography*

HPX: Hipoxantina

XOD: Xantina Oxidase

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

ABAP: 2,2' – azobis (2 – metilamodinopropano)

DC: Corrente direta, do inglês, *current direct*

PAD: Detecção por amperometria pulsada, do inglês, *Pulsed amperometric detection*

DPR: Desvio padrão relativo

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de Quantificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Metabolismo oxidativo e os radicais livres.....	21
2.1.1 Química dos radicais livres.....	23
2.1.2 Principais espécies reativas derivadas do O ₂ (ERO).....	25
2.1.2.1 Radical Hidroxil.....	25
2.1.2.2 Radical Superóxido	26
2.1.2.3 Radical Peroxil.....	28
2.2 Sistema antioxidante endógeno e compostos antioxidantes obtidos da dieta	29
2.2.1 Compostos polifenólicos.....	31
2.2.1.1 Flavonóides, Ácidos Fenólicos e Cumarinas.....	33
2.3 Amazônia e as Plantas Medicinais.....	35
2.3.1 Plantas Medicinais em estudo.....	36
2.3.1.1 <i>Cecropia palmata</i> e <i>Cecropia obtusa</i>	37
2.3.1.2 <i>Bauhinia variegata</i> e <i>Bauhinia variegata</i> var <i>alboflava</i>	38
2.3.1.3 <i>Mansoa alliacea</i>	40
2.3.1.4 <i>Connarus perrottetii</i> var <i>angustifollius</i>	41
2.4 Metodologias para o estudo da atividade antioxidante.....	42
2.4.1 Anion Radical Superóxido – Sistema HPX/XOD	42
2.4.2 Radical Peroxil - Método ANCOMROS (Antioxidant Competence Measured by ROS determination).....	44
2.4.4 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	45
2.4.5 Radical Hidroxil – Método deoxirribose	46
2.4.6 Radical Hidroxil e Monocamadas auto-organizadas.....	47

3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Instrumentação.....	49
3.2 Amostragem.....	50
3.2.1 Preparo dos extratos	51
3.3 Procedimentos experimentais, reagentes e soluções	51
3.3.1 Capacidade Antioxidante frente ao radical DPPH	52
3.3.2 Capacidade Antioxidante frente ao ânion radical superóxido.....	53
3.3.3 Capacidade antioxidante frente ao radical peroxil.....	54
3.3.4 Capacidade antioxidante frente ao radical hidroxil	55
3.3.5 Monocama auto-organizada – Radical Hidroxil.....	55
3.3.6 Caracterização cromatográfica por HPLC – PAD.....	57
3.3.7 Validação do método cromatográfico HPLC – PAD	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1 Desenvolvimento e Otimização do método cromatográfico com detecção pulso- amperométrica	60
4.1.1 Validação do método HPLC – PAD.....	69
4.2 Caracterização cromatográfica das plantas medicinais da Amazônia.....	75
4.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> das espécies de plantas medicinais frente às espécies reativas de oxigênio.....	87
5 CONCLUSÕES	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo oxidativo é de suma importância para a sobrevivência celular e o efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies reativas desempenham funções relevantes no organismo e encontram-se em equilíbrio com os mecanismos de defesa antioxidante (ALVES *et al.*, 2010; BAE *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007). No entanto, o excesso na produção dessas espécies reativas ocasiona o estresse oxidativo que pode vir a apresentar efeitos deletérios ao organismo tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndria e membranas, provocando alterações nas funções celulares (ALVES *et al.*, 2010; ANTOLOVICH *et al.*, 2002) que podem estar associadas a doenças crônicas e degenerativas (YIZHONG *et al.*, 2004). O excesso de radicais livres é combatido através de uma defesa antioxidante de origem endógena ou compostos adquiridos na dieta a exemplo dos compostos polifenólicos como os flavonóides e ácidos fenólicos (BARREIROS *et al.*, 2006).

Estudos sugerem que dois terços das espécies de plantas no mundo apresentam algum valor medicinal e apresentam um bom potencial antioxidante (KRISHNAIAH *et al.*, 2011). Além disso, 80% da população mundial faz uso da medicina popular nos primeiros cuidados com a saúde, os quais envolvem o uso de extratos de plantas contendo componentes bioativos. Muito dos efeitos benéficos do uso de plantas medicinais está relacionado à presença de metabólitos secundários como os compostos fenólicos. Esses metabólitos desempenham um papel importante no crescimento, reprodução, proteção contra patógenos e predadores além de contribuir para a coloração e características sensoriais de frutas e vegetais (AJILA *et al.*, 2011; BRAVO *et al.*, 1998). Dessa forma, os compostos fenólicos provenientes das plantas medicinais tornam-se um caminho natural de prevenção de doenças degenerativas como Alzheimer (KRISHNAIAH *et al.*, 2011).

Dentre as diferentes classes de compostos fenólicos presentes em extratos de plantas pode-se destacar os ácidos fenólicos e flavonóides que são bastante conhecidos por sua ação antioxidante. A atividade antioxidante desses compostos não pode ser medida diretamente, mas sim pelos efeitos dos antioxidantes na extensão da oxidação (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Os diversos testes propostos na

literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Dentre os radicais utilizados nesse trabalho, para mensurar a atividade antioxidante dos extratos das espécies de plantas medicinais, o DPPH tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antiradicalar de diversas frutas, cereais e plantas em geral, além de ser considerado um dos métodos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante (ALVES *et al.*, 2010).

O radical superóxido, por sua vez, pode conduzir a formação de hidroperóxidos pela autooxidação de ácidos graxos insaturados e é responsável pela formação de radicais livres altamente reativos como o radical hidroxila (BARREIROS *et al.*, 2006). Uma vez que o radical hidroxila seja gerado, o organismo não dispõe de mecanismos de defesa frente a esse radical, pois dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo* (VASCONCELOS *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007). Dessa forma, torna-se importante a obtenção de compostos antioxidantes através da dieta que auxiliem na diminuição do dano oxidativo causado por esse radical no organismo.

Além disso, a avaliação da atividade antioxidante de plantas medicinais frente ao radical hidroxil vem sendo mensurada através da mimetização da membrana celular por uma monocamada auto organizada de enxofre fixada a um eletrodo sólido. As monocamadas auto organizadas podem ser degradadas na presença de radicais hidroxil de forma a regenerar a superfície do eletrodo. Na presença dos compostos antioxidantes o dano causado pelos radicais à membrana é minimizado (HILGMANN *et al.*, 2010).

O radical peroxila também vem sendo utilizado na avaliação da atividade antioxidante principalmente por sua formação ser uma etapa importante na peroxidação lipídica (HILGMANN, 2010).

Além de mensurar a atividade antioxidante dos compostos presentes nos extratos de plantas medicinais torna-se imprescindível o desenvolvimento de técnicas analíticas para a identificação e caracterização desses componentes (KRISHNAIAH *et al.*, 2011; AJILA *et al.*, 2011). A maioria dos métodos analíticos propostos para a separação de componentes fenólicos inclui cromatografia a gás, cromatografia líquida de alta eficiência (AJILA *et al.*, 2011; CASELLA *et al.*, 2007) e eletroforese capilar (CASELLA *et al.*, 2007; GOTTI, 2011).

Atualmente as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência são amplamente utilizadas na identificação e separação de inúmeros compostos fenólicos em plantas e geralmente são acoplados a sistemas de detecção baseado na espectrometria UV, fluorimetria, espectrometria de massa, detecção eletroquímica, etc (AJILA *et al.*, 2011; CASELLA *et al.*, 2007).

Para as classes de compostos fenólicos abordados nesse trabalho, a detecção baseada na espectrometria UV tem mostrado uma baixa sensibilidade devido aos valores do coeficiente de extinção dos compostos serem relativamente baixos. Por outro lado, a detecção eletroquímica tem demonstrado ser uma ferramenta analítica bastante útil na detecção de fenólicos devido à presença de hidroxilas que se reduzem e/ou se oxidam na superfície do eletrodo (CASELLA *et al.*, 2007). Quando acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência, a detecção eletroquímica se mostra bastante sensível devido à detecção direta dos analitos eletroativos e a modulação da seletividade pela variação do potencial de trabalho utilizado para a detecção (TROJANOWICZ, 2011).

A detecção pulso amperométrica (PAD, do inglês, *pulsed amperometric detection*) apresenta uma sensibilidade ainda maior quando comparada a outros métodos eletroquímicos de detecção (amperometria de corrente direta, por exemplo) principalmente devido a aplicação de pulsos de potenciais que promovem a limpeza da superfície do eletrodo e diminuem a necessidade frequente de polimento manual do eletrodo (TROJANOWICZ, 2011). A detecção pulso amperométrica utilizando eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho tem sido reportado para a detecção de carboidratos¹⁵ e adulterantes em formulações fitoterápicas (MOREIRA, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013), porém há uma falta de informações a respeito da utilização desse eletrodo para detecção de compostos fenólicos separados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Frente a isso, esse trabalho tem como objetivo a caracterização de compostos fenólicos de diferentes classes em extratos de seis plantas medicinais da Amazônia a fim de se obter informações a cerca de seus constituintes químicos. Para isso, o trabalho busca o desenvolvimento de um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção pulso amperométrica utilizando eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho. Além disso, esse trabalho visa avaliar a possível atividade antioxidante dos diferentes extratos frente à espécies reativas de oxigênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo oxidativo e os radicais livres

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo (BARREIROS *et al.*, 2006) uma vez que a transferência de elétrons é um dos processos químicos mais importantes para a sobrevivência celular (ALVES *et al.*, 2010), sendo os radicais livres produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica.

Os radicais livres apresentam um efeito duplo no organismo podendo apresentar efeitos benéficos em baixas concentrações (VALKO *et al.*, 2006) como por exemplo, o envolvimento na produção de energia, na fagocitose (fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor) (VASCONCELOS *et al.*, 2007), regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS *et al.*, 2006). No entanto, uma produção excessiva dessas espécies reativas no organismo pode desencadear o estresse oxidativo.

O organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante o qual abrange a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta. Entretanto, quando a produção é exacerbada o sistema antioxidante se sobrecarrega e permite a instalação do estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Dessa forma, o estresse oxidativo pode ser caracterizado não só pelo aumento da produção de radicais livres, mas também pela ineficiência do sistema antioxidante do organismo, ou seja, um distúrbio que provoque o desequilíbrio no sistema prooxidante ou antioxidante carreando ao dano oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007; ANTOLOVICH *et al.*, 2002; HALLIWELL, 2007).

A figura 1 mostra as fontes endógenas e exógenas de produção de espécies reativas e a extensão da resposta celular frente ao estresse oxidativo.

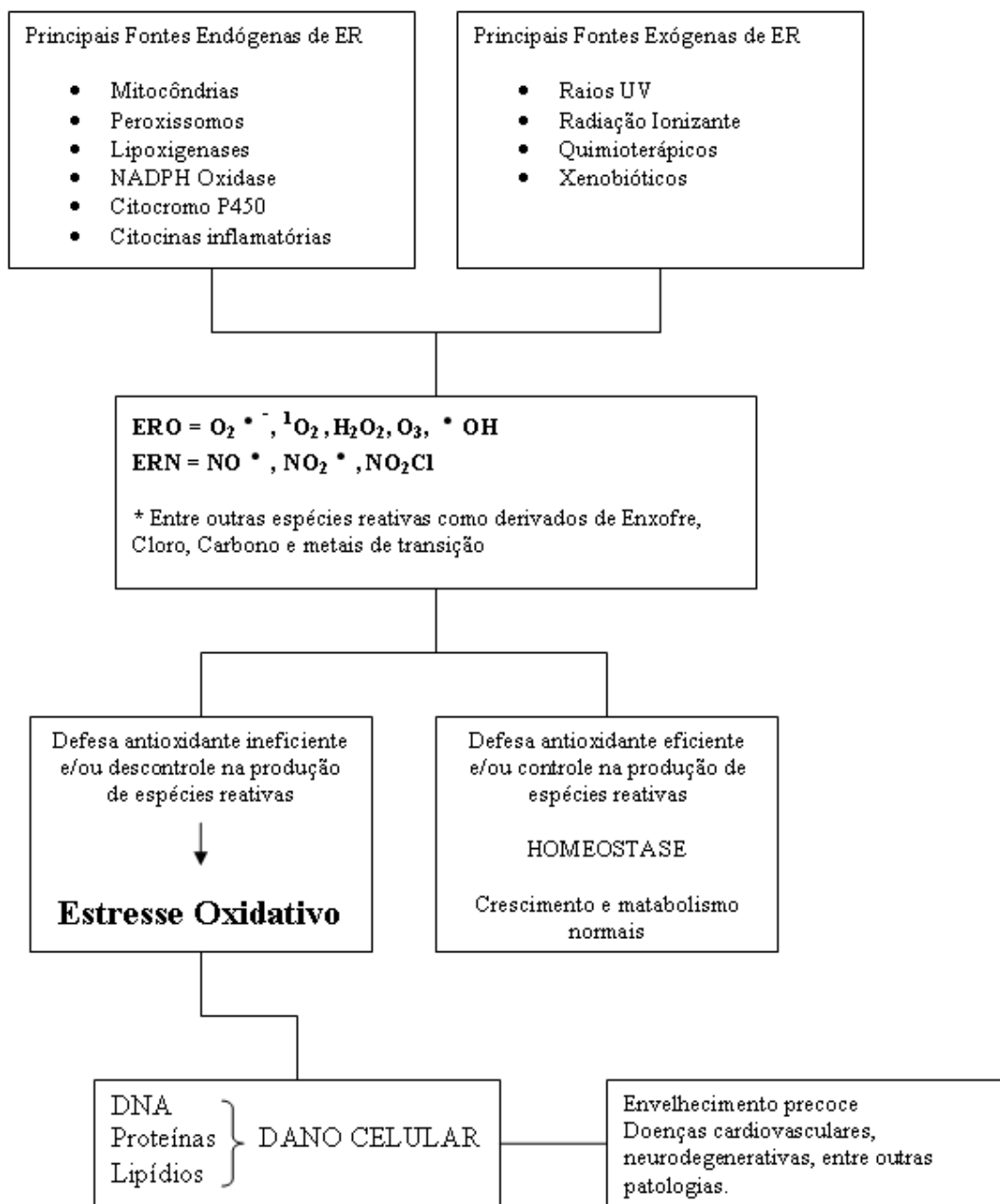


Figura 1: Fontes e respostas celulares às espécies reativas. Adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2007.

O dano oxidativo acumula-se ao longo do ciclo da vida (VALKO *et al.*, 2007) e pode envolver desde danos à proteínas e lipídios até disfunções celulares causadas por danos ao DNA. Além disso, há fortes evidências de que o estresse oxidativo está diretamente ligado aos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução

do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV⁺), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas do pulmão, intoxicação com xenobióticos e muitas outras (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

2.1.1 Química dos radicais livres

Um radical livre pode ser definido de uma maneira simples, como sendo qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular por si só (HALLIWELL, 2007).

O radical livre mais simples é o hidrogênio atômico, H[•], uma vez que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, que deve ser desemparelhado. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados, geralmente faz com que os radicais livres sejam ligeiramente atraídos por um campo magnético e altamente reativos, embora a reatividade química dos radicais varie muito (HALLIWELL, 2007).

Basicamente, os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de uma espécie não radicalar (equação 1) ou pelo ganho de um elétron (equação 2).



Existe uma variedade muito grande de espécies reativas em sistemas vivos, como por exemplo, radicais de carbono-centrado intermediários na peroxidação lipídica, espécies reativas de nitrogênio (ERN), de cloro (ERC), de bromo (ERB), de enxofre (ERS) e até mesmo íons de metais de transição podem ser qualificados como radicais livres (HALLIWELL, 2007). O termo “espécies reativas” é coletivo e inclui radicais livres e não-radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais, alguns exemplos são mostrados na tabela 1.

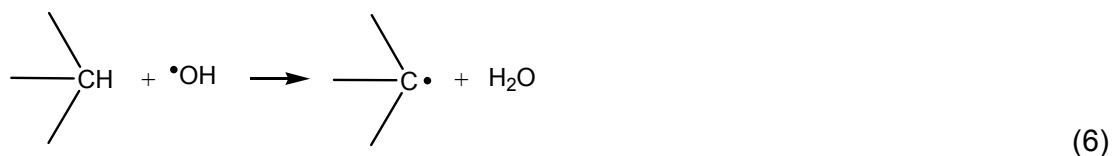
Tabela 1: Exemplos de Espécies Reativas radicalares e não radicalares.

Radicais Livres	Não Radicais
Espécies reativas de Oxigênio (ERO)	
Superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroxil, HO^{\bullet}	Peróxidos Orgânicos, $ROOH$
Peroxil, RO_2^{\bullet}	Peroxinitrato, O_2NOO^-
Alcoxil, RO^{\bullet}	
Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}	
Espécies reativas de Cloro (ERC)	
Cloro atômico, Cl^{\bullet}	Gás cloro, Cl_2
	Dióxido de cloro ClO_2
Espécies reativas de Bromo (ERB)	
Bromo atômico, Br^{\bullet}	Gás Bromo, Br_2
Espécies reativas de Nitrogênio (ERN)	
Óxido nítrico, NO^{\bullet}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}	Cátion Nitrosil, NO^+
Nitrato, NO_3^{\bullet}	Ânion nitroxil, NO^-
	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Fonte: Adaptado de Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C, 2007.

Os radicais livres podem reagir com outro radical formando uma ligação covalente como, por exemplo, na rápida reação do óxido nítrico e o ânion radical superóxido para formar um produto não radicalar, o peroxinitrito (equação 3). Além disso, os radicais podem se adicionar a outra molécula, como a adição do radical, podem ser agentes redutores, doando um elétron para um não radical (equação 4), ou ainda agentes oxidantes, ganhando um elétron de um não radical (equação 5). Os radicais podem ainda, abstrair um átomo de hidrogênio de uma ligação C-H (equação 6) (HALLIWELL, 2007).





O radical hidroxil abstrai um H• de hidrocarbonetos da cadeia lateral de resíduos de ácido graxo e podem ocorrer reações em cadeia se o radical de carbono reagir com O₂ formando radicais peroxil que propagam a peroxidação lipídica (equação 7).



A maioria dos radicais livres em sistemas biológicos é derivada do oxigênio, sendo que este possui significado fundamental para organismos aeróbicos devido a sua participação na obtenção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), através da cadeia respiratória comoceptor final de elétrons (HALLIWELL, 2007).

No organismo, os radicais livres são gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana sendo os radicais $^{\bullet}\text{OH}$ (hidroxila) e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (superóxido) os que possuem maior importância biológica (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

2.1.2 Principais espécies reativas derivadas de O₂ (ERO)

2.1.2.1 Radical Hidroxil ($^{\bullet}\text{OH}$)

O radical hidroxila é o mais danoso e lesivo ao organismo, pois devido o seu tempo de meia-vida muito curto (cerca de 10⁻⁹ segundos) (PEREIRA, 2006), dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* e uma vez formado, o organismo não dispõe de mecanismo de defesa para combatê-lo (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Esse radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS *et al.*, 2006). No organismo é formado principalmente por dois mecanismos: reação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com metais de transição (equação 8) e homólise da água por exposição à radiação ionizante (equação 9) (HALLIWELL, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006).



A incidência de radiação no ultravioleta, raios gama e raios X podem produzir radicais hidroxila nas células da pele. O ataque intenso e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos (BARREIROS *et al.*, 2006).

No DNA, o radical hidroxila ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose sendo que quando ocorre o ataque no açúcar, quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. Além disso, $\cdot\text{OH}$ pode reagir com aminoácidos e proteínas gerando clivagens de ligações, o que pode ter como conseqüência a perda da atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. Os ácidos graxos poliinsaturados também são susceptíveis ao ataque do radical hidroxila, dando início a peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006).

2.1.2.2 Ânion Radical Superóxido (O₂^{•-})

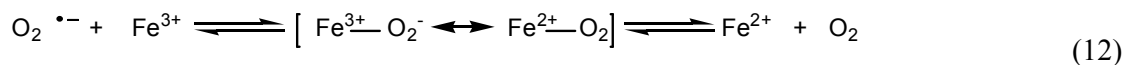
O radical superóxido é gerado continuamente por diversos processos celulares (na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como a xantina oxidase e NADPH oxidase) ou pela redução monoelétrica de oxigênio (BABIOR, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (equação 10). Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HO₂[•]) é mais reativo (equação 11). O radical hidroperóxido é um agente redutor mais poderoso que o

ânion radical superóxido pois possui um potencial padrão de redução menor (-0,46 V e -0,33 V, respectivamente) (HALLIWELL, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006).



O superóxido é menos reativo que o radical hidroxila e não reage com a maioria das moléculas biológicas sendo que, dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação pelo radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é a cisteína (BARREIROS *et al.*, 2006). Sua reatividade com não-radicais é influenciado pelo solvente e pelo pH (HALLIWELL, 2007).

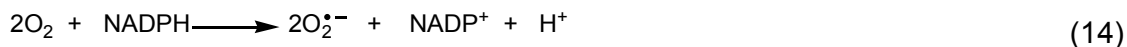
Em certos processos químicos importantes no contexto biológico, a participação do ânion radical superóxido é fundamental. O principal deles é o auxílio na produção de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), através da redução de quelatos de Fe (III) (equação 12), formando Fe(II). Assim, o $\bullet\text{OH}$ pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (BARREIROS *et al.*, 2006) (equação 13).



Além disso, o radical superóxido possui a habilidade de liberar Fe (II) das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente (BARREIROS *et al.*, 2006).

Apesar disso, o radical superóxido tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo estaria desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (BARREIROS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Para combater corpos estranhos, o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução por um

elétron de O₂ com gasto de uma molécula de NADPH (BABIOR, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006) (equação 14).



O radical formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloros (HOCl), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos (BABIOR, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).

O ânion radical superóxido ainda funciona como sinalizador molecular através da sua capacidade de oxidar grupos -SH em ligações dissulfeto (equação 15), podendo ativar e desativar enzimas que contenham metionina (BARREIROS *et al.*, 2006).



2.1.2.3 Radicais peroxila (RO₂•) e alcoxila (RO•)

Os radicais peroxil e alcoxil são bons agentes oxidantes, tendo valores de E° altamente positivos. O radical peroxil mais simples é o radical hidroperoxila (HO₂•), forma protonada do radical superóxido. Esses radicais (RO₂• e RO•) podem abstrair um átomo de hidrogênio de outras moléculas, uma reação importante na peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2007).

A decomposição de peróxidos pelo aquecimento ou pela catálise de metais de transição pode gerar tanto o radical peroxila como o alcoxila. No organismo esses radicais são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica (VASCONCELOS *et al.*, 2006). Os radicais peroxil e alcoxil aromáticos tendem a ser menos reativos que os alifáticos, uma vez que os elétrons se deslocam no anel benzênico.

2.2 Sistema antioxidante endógeno e compostos antioxidantes obtidos da dieta

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar (SOUSA *et al.*, 2007).

De maneira geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (ANTOLOVICH *et al.*, 2007; HALLIWELL, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar uma reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Nenhum antioxidante, isoladamente, reúne todas as características de um bom antioxidante, sendo estas descritas como, um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais, ativo na proteção de moléculas de proteínas e lipídios, ter uma boa biodisponibilidade após a administração oral e parenteral, ter meia vida longa, ser ativo no espaço intra e extracelular e, deve ser capaz de cruzar a membrana celular intacto (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre eles pode-se citar a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares (SOUSA *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2006). Dessa forma, busca-se compreender os mecanismos moleculares que sublinham o estresse redox e propor medicamentos ou alternativas nutricionais (alimentos ou nutrientes específicos) que possam diminuir a ação deletéria dessas espécies reativas sobre a saúde da população humana (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Outro interesse ligado aos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS *et al.*, 2006).

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes (endógeno) sendo o primeiro composto pela enzima SOD (superóxido dismutase), o segundo pela

enzima catalase e o terceiro sistema é formado pela GSH em conjunto com duas enzimas GPx (glutathiona peroxidase) e GR (glutathiona redutase) (BABIOR, 1997).

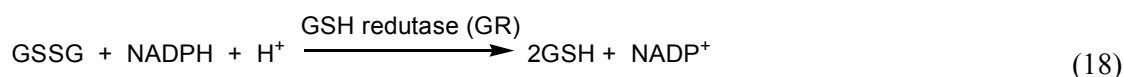
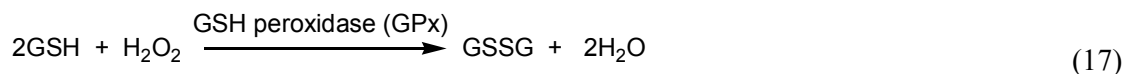
O primeiro sistema antioxidante é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do ânion radical superóxido $O_2^{\bullet-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do radical superóxido ocorre naturalmente, porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$, de forma que há necessidade de maior concentração do radical. A presença da enzima superóxido dismutase (SOD) favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas (BARREIROS *et al.*, 2006).

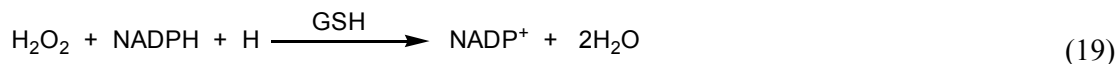
Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR, 1997; BARREIROS *et al.* 2006).

O segundo sistema de prevenção formado pela enzima catalase, é muito mais simples e atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (equação 16).



O terceiro sistema composto pela GSH também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença da enzima GPx formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada (equações 17-19) (BABIOR, 1997; BARREIROS *et al.*, 2006).





A proteção enzimática baseia-se quase que exclusivamente na decomposição do ânion superóxido ou dismutação de peróxido de hidrogênio, agentes oxidantes brandos. Cabe às micromoléculas (que podem ter origem no próprio organismo ou serem adquiridas da dieta (OLIVEIRA *et al.*, 2009)), tais como tocoferóis, carotenóides e flavonóides, o papel de impedir o ataque de ERO e ERN ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais (BARREIROS *et al.*, 2006).

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

2.2.1 Compostos polifenólicos

Os polifenóis compreendem uma ampla família de componentes naturais presentes em vegetais, frutas, legumes, sementes e principalmente em plantas medicinais. Esses compostos fazem parte do metabolismo secundário das plantas e são derivados de duas rotas sintéticas principais: via do chiquimato e via acetato (AJILA *et al.*, 2011; BRAVO, 1998). A figura 2 representa o esquema da síntese desses compostos em plantas.

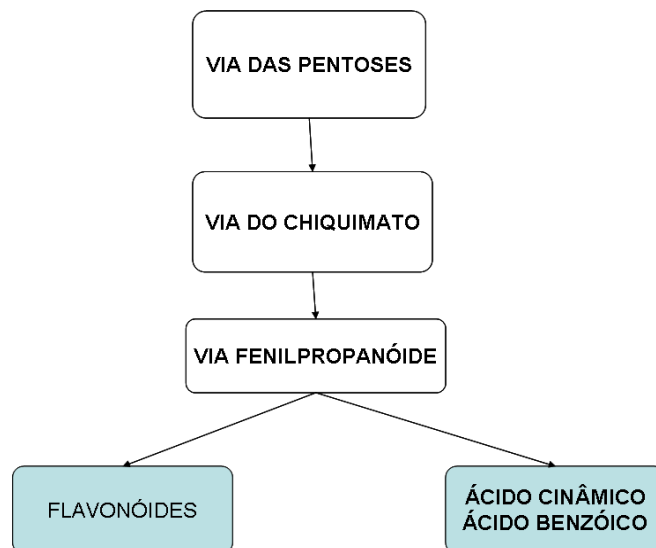


Figura 2: Via Biosintética da formação de fenólicos em plantas (Adaptado de AJILA *et al.*, 2011).

Esses compostos são essenciais para a fisiologia das plantas, pois contribuem para fatores de morfologia (pigmentação), crescimento e reprodução além de estarem envolvidos na proteção contra patógenos e possíveis predadores, sendo formados sob condições de estresse como infecções, ferimentos e radiações UV (AJILA *et al.*, 2011; ANGELO *et al.*, 2008; NACSKI *et al.*, 2004; BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos exibem uma gama de benefícios a saúde, como por exemplo, propriedades antialérgicas, antiinflamatória, antibacteriana, cardioprotetora, entre outras. A maioria desses efeitos provém principalmente da capacidade antioxidante que esses compostos possuem (AJILA *et al.*, 2011).

A eficiência dos polifenóis como antioxidante depende principalmente da sua estrutura química e das propriedades redox, o que permite que eles hajam como agentes redutores (BRAVO, 1998; YOSHIHARA *et al.*, 2010). Além disso, esses compostos também possuem a capacidade de quelar íons metálicos, prevenindo a formação de radicais livres catalisada por metais. Na oxidação de lipídios, os polifenóis são capazes de interferir através da doação de um átomo de hidrogênio ao radical, conforme mostra a equação 20 (AJILA *et al.*, 2011).



O radical fenoxil gerado é um intermediário relativamente estável, uma vez que não propaga a reação radicalar facilmente. Além disso, esse radical pode agir na propagação do dano oxidativo reagindo com outros radicais gerando um novo componente (BRAVO, 1998; SOUSA *et al.*, 2007), conforme mostrado na equação 21.



Os compostos polifenólicos, estruturalmente, possuem um anel aromático substituído por um ou mais grupamentos hidroxila e podem variar desde fenólicos simples a moléculas altamente polimerizadas (AJILA *et al.*, 2011). Podem ser divididos em pelo menos 10 classes dependendo da estrutura molecular básica. No entanto, nesse trabalho serão abordados apenas três classes: os ácidos fenólicos, os flavonóides e as cumarinas. Esses compostos possuem ocorrência natural em plantas e podem ser encontrados livres ou ligados a glicosídeos (BRAVO, 1998).

2.2.1.1 Flavonóides, Ácidos fenólicos e Cumarinas.

Particularmente os flavonóides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonóides pode ser determinada por cinco fatores sendo estes a reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavonil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006).

São compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (figura 3).

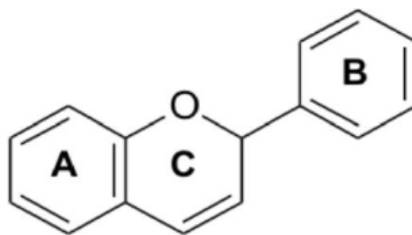
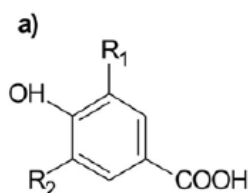


Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides (ANGELO *et al.*, 2006).

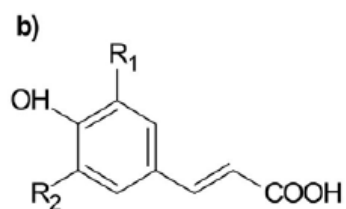
Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (ANGELO *et al.*, 2007; HOLLMAN *et al.*, 1999).

Os ácidos fenólicos são caracterizados por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (ANGELO *et al.*, 2007).

Esses compostos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (figura 4). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuíco, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C₆-C₁, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (ANGELO *et al.*, 2007; BRAVO, 1998).



Ácido p-hidroxibenzóico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido protocatecuíco: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
 Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Figura 4: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b) (Adaptado de Ângelo *et al.*, 2007).

As cumarinas 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).

Assim como os flavonóides e ácidos fenólicos, as cumarinas apresentam muitas propriedades terapêuticas e farmacológicas como antiinflamatória, bactericida, vasorelaxante, agente contra o vírus da hepatite C, atividade antiproliferativa, inibidor da xantina oxidase, antidiabética, anticancerígena, anti HIV, anticoagulante, espasmolítica e são também usados clinicamente para a cura da coagulação de plaquetas (MULLER, 2013).

2.3 Amazônia e o uso das Plantas Medicinais

A sabedoria popular, ao longo dos tempos, vem sendo transmitida entre gerações de forma empírica. O conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais é vasto e, em muitos casos, é o único recurso disponível que a população rural de países em desenvolvimento tem ao seu alcance (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Na Amazônia, as tradições do uso popular de plantas medicinais representam um importante ponto de encontro entre permanências e rupturas culturais, estabelecidas desde os primeiros contatos intertribais e interétnicos e consolidadas no entrecruzamento das principais matrizes presentes no processo de formação do povo brasileiro (SANTOS, 2000).

Ao longo do tempo em que se estreitou o contato com as sociedades ocidentais, o conhecimento fitoterápico dos povos amazônicos passou a incorporar saberes e práticas “civilizados”, oriundos, principalmente, da medicina popular europeia. Com suas estratégias de cura redesenhadas, estas populações envolveram-se, então, a intensa movimentação de nordestinos que introduziria elementos das tradições africanas, as quais chegavam não mais como um conhecimento nativo, autêntico, mas como conhecimentos já validados por uma formação cultural sincrética, típica do Nordeste brasileiro (SANTOS, 2000).

As populações acostumadas a enfrentar, com seus próprios recursos, enfermidades que às vezes desconheciam, criaram novas técnicas de uso, descobrindo novas finalidades para as plantas que já conheciam, a partir dos dados recém-incluídos no seu dia-a-dia. Os saberes amazônicos, sistematizados em seus diversos matizes – indígenas e caboclos, seringueiros, madeireiros, pescadores, colonos, garimpeiros, balateiros, regatões etc – , consolidaram-se em suas práticas, destacando-se o uso dos “remédios do mato” como um de seus traços culturais mais marcantes (SANTOS, 2000). Dessa forma, as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002).

A floresta Amazônica é um dos cinco maiores biomas do Brasil. Isso compreende em uma área de aproximadamente 7 milhões de km², ocupando 40% da América do Sul, incluindo parte dos territórios de 8 países (SANTOS *et al.*, 2012). Dentro desse espaço ainda hoje habitam muitas comunidades praticamente rurais e de baixa renda. Geralmente, nesse tipo de localidade, não existem farmácias comerciais e o suprimento de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS) é irregular. Esse conjunto de fatores faz com que o conhecimento e a utilização de plantas medicinais pela população dessas áreas sejam de grande valor, pois, muitas vezes, constituem a única opção no tratamento das enfermidades (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo que dentre os fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (OLIVEIRA *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011; NEWMAN *et al.*, 2007).

2.3.1 Plantas Medicinais em estudo

Tendo em vista a diversidade no uso popular de plantas medicinais e a importância terapêutica e farmacológica encontrada em muitas espécies, selecionou-se seis espécies de ocorrência natural na Amazônia para a avaliação de seus constituintes e possível atividade antioxidante baseado no conhecimento empírico.

2.3.1.1 *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata*



Figura 5: *Cecropia obtusa*



Figura 6: *Cecropia palmata*

O gênero *Cecropia* é pertencente à família Moraceae/Cecropiaceae e pode ser conhecida pelos nomes populares de embaúba, imbaúba, imbaúva, umbáuba, umbáuva, ambaúba, embaíba, imbaíba e torém. Na Amazônia, as folhas dessas espécies (Figura 5 e 6) têm sido usadas pelas propriedades anti-reumáticas, antidiabética, cicatrizante, tranquilizadoras, além de ser indicada também para pneumonia, tosse e entre outros (SPOSITO *et al.*, 2001; LUENGAS-CAICEDO *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2012).

Vários compostos já foram identificados por HPLC-DAD em espécies de *Cecropia* como, por exemplo, isoquercitrina em *Cecropia glaziovii* (SILVA *et al.*, 2007) além de cumarinas, alcalóides e outros flavonóides em outras espécies desse gênero. Alguns estudos identificaram e quantificaram compostos como o ácido clorogênico e triterpenóides em outras espécies desse gênero como a *Cecropia obtusifolia* e *Cecropia lyratiloba* (TORRES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2007). Além disso, um estudo fitoquímico qualitativo realizado com as folhas da espécie de *Cecropia obtusa* apontou a presença de açúcares redutores,

derivados de cumarinas, catequinas, triterpenóides e esteróides, além de taninos e saponinas (LAMEIRA *et al.*, 2004).

As espécies do gênero *Cecropia* são mais conhecidas e possuem uma série de publicações a cerca de seus constituintes na literatura, quando comparadas as outras espécies de estudo nesse trabalho. No entanto, quanto as espécies *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata* a literatura fornece poucas informações no que diz respeito aos contituintes fenólicos nos extratos dessas plantas.

2.3.1.2 *Bauhinia variegata* e *Bauhinia variegata* var *alboflava*



Figura 7: *Bauhinia variegata* var *alboflava*



Figura 8: *Bauhinia variegata*

As espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* fazem parte da família Leguminosae, porém essa se divide em subfamílias sendo a *Bauhinia variegata* (Figura 8) e *Bauhinia variegata alboflava* (Figura 7) pertencentes à Fabaceae-Caesalpinoideae (BIANCO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002). Essas espécies são

encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta e vêm sendo utilizadas como remédio na medicina popular em um vasto número de países. Alguns estudos fitoquímicos realizados com plantas do mesmo gênero (*Bauhinia*) indicaram a presença de flavonóides, triterpenos, lactonas e glicosídeos esteróidicos na sua constituição (SILVA *et al.*,2002). As infusões da casca de *Bauhinia variegata* têm sido usadas contra úlceras, doenças de pele além de ser útil na escrofulose e possuir propriedades adstringentes e tônicas. Não obstante, as raízes dessa espécie são usadas em dispepsia e como antídoto para veneno de cobra (REDDY *et al.*, 2003). Além disso, estudos farmacológicos com essas espécies têm demonstrado potencial antifúngico (REDDY *et al.*,2003), atividade anti-diabética (SARAVANAMUTTU *et al.*,2012), anti-úlceras (PRUSTY *et al.*,2012), antioxidante e entre outros.

2.3.1.3 *Mansoa alliacea*



Figura 9: *Mansoa alliacea*

A espécie *Mansoa alliacea* (Lam.) A. H. Gentry (Figura 9) é pertencente a família Bignoniaceae e no Brasil é popularmente conhecida como *cipó d’alho*. Seu nome popular é deriva do seu aroma característico de alho devido a presença de compostos organosulfurados. Pode ser encontrada em toda América do Sul e é utilizada por muitas comunidades na Amozônia para fins como gripe, dores de cabeça, febre, reumatismo e em problemas respiratórios (ZOGHBI *et al.*,2009).

Extratos dessa planta têm sido utilizados como inseticida e também como parte de rituais agregando um valor “místico-medicinal”, segundo as comunidades indígenas da Amazônia. Além disso, estudos fitoquímicos têm apresentado a presença de compostos como alcanóis, triterpenóides, flavonóides e compostos organosulfurados. Apesar de todos os usos associados a essa espécie ainda se têm muito pouca informação a respeito do seu uso como fitoterápico quando comparado ao alho (ZOGHBI *et al.*,2009; ODONNE *et al.*, 2013).

2.3.1.4 *Connarus perrottettii* var *angustifolius*



Figura 10: *Connarus perrottettii* var *angustifolius*

A espécie *Connarus perrottettii* var *angustifolius* Radlk. (Figura 10) é popularmente conhecida no Brasil como *barbatimão* e pertence a família Connaraceae (PARACAMPO *et al.*,2011). É uma planta encontrada principalmente nos trópicos e no Brasil pode ser encontrada em todos os Biomas com exceção dos Pampas.

No norte do reino da Tailândia, a decocção das folhas de *Connarus semidecandrus* Jack tem sido usada no tratamento de diarreia (PARACAMPO *et al.*,2011). 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 geniturinárias 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 (FERREIRA *et al.*,2009). Muitos estudos farmacológicos a cerca de espécies dessa família têm sido desenvolvido, porém pesquisas químicas e

farmacológicas sobre a espécie *Conarus perrotettii* ainda são bastante escassas mesmo seu uso tradicional tendo sido confirmado.

2.4 Metodologias para o estudo da atividade antioxidante

A atividade antioxidante não pode ser medida diretamente e sim pelo efeito dos antioxidantes no controle da extensão da oxidação (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de capturação (“trap assays”). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para se ter uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como, onde e a extensão do dano causado. Assim, o entendimento sobre os efeitos dos compostos antioxidantes somente pode ser aperfeiçoado se metodologias mais específicas forem utilizadas, e se estas forem capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (ALVES *et al.*, 2010).

Alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total, em vez da análise de antioxidantes isolados, uma vez que há dificuldade em medir cada antioxidante e, principalmente, devido à interação que existe entre eles (ALVES *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2007).

2.4.1 Ânion Radical Superóxido – Sistema HPX/XOD

A produção do ânion radical superóxido, uma espécie reativa de oxigênio, é essencial para a defesa de organismos vivos, pois esse radical atua na transferência de sinais entre células vivas. Entretanto, a superprodução de $O_2^{\bullet-}$ pode causar estresse oxidativo e estar envolvida em diversas patologias (ALVES *et al.*, 2010).

Xantina Oxidase (XOD) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido (figura 11), por isso é considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio (ALVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2009). A atividade de um grande número de substâncias pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido gerado nesse sistema enzimático.

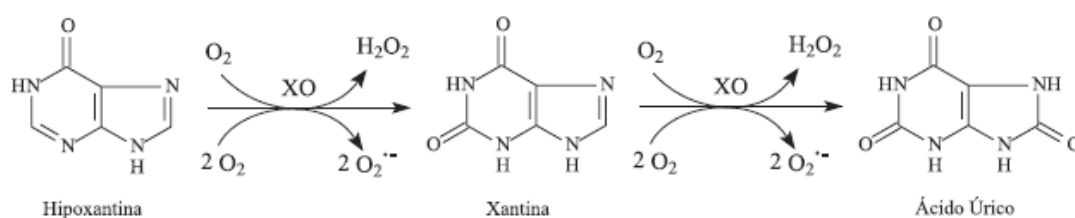


Figura 11: Formação de radicais superóxido na conversão da Hipoxantina em Xantina e dessa em ácido úrico, pela ação da enzima xantina oxidase (Adaptado de Alves *et al.*, 2010).

No método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o radical superóxido produzido reduz o nitroblue tetrazolium (NBT) a formazan em pH 7,4 e temperatura ambiente (figura 12), e a geração do formazan é acompanhada por espectrofotometria através da mudança na coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazan no comprimento de onda de 560 nm (ALVES *et al.*, 2010). As moléculas que atuam como antioxidantes reagem com o radical superóxido inibindo a formação de formazan, com consequente decaimento na coloração púrpura.

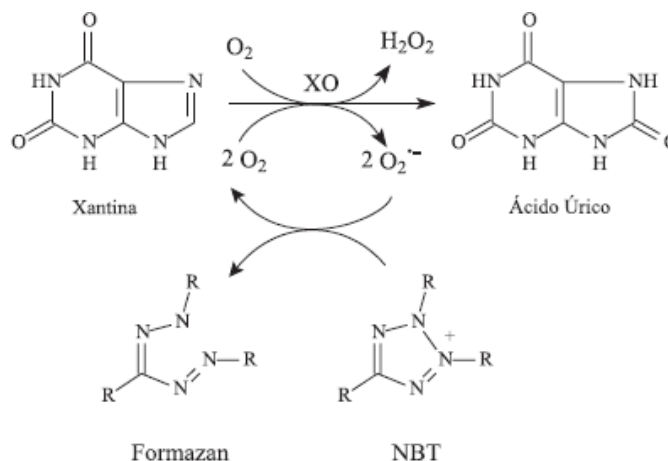
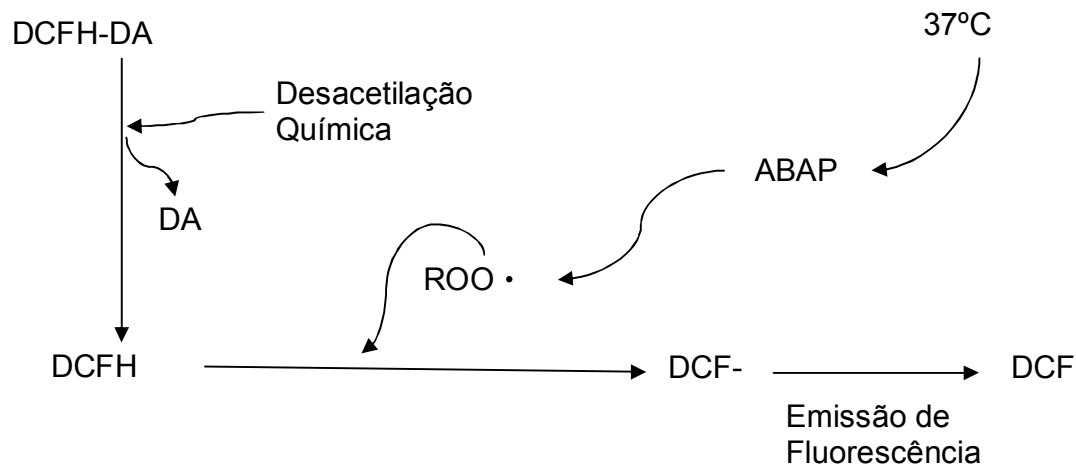


Figura 12: Formação do formazan a partir da redução do NBT pelo radical superóxido gerado no sistema HPX/XOD (Adaptado de Alves *et al.*, 2010).

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

A determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila é avaliada através da detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS) na presença e na ausência de um gerador do radical (AMADO *et al.*, 2009). A metodologia desenvolvida por Amado *et al.*, 2009 para a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxila 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 radical peroxila oxida o DCFH ao composto fluorescente DCF que é detectado nos comprimentos de onda de 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente (VASCONCELOS *et al.*, 2006). O esquema 1 demonstra a termodecomposição do ABAP com conseqüente formação do radical peroxila e oxidação do composto DCFH a DCF.



Esquema 1: Termodecomposição do reagente ABAP a 37°C e consequente formação de radicais peróxila que atuam na oxidação do reagente DCFH originando o composto fluorescente DCF. (Adaptado de Hilgemann, 2010 e Amado *et al.*, 2009).

A decomposição térmica do ABAP é monitorada a cada 5 minutos durante 30 minutos. Os resultados são estimados pela diferença das áreas das curvas de fluorescência registradas na presença e na ausência de ABAP em função do tempo (30 min). A diferença relativa entre as curvas das amostras e a do controle é considerada como sendo a medida da capacidade antioxidante, visto que os valores de fluorescência são obtidos após a formação de ERO, o que significa uma grande competência em neutralizar os radicais peróxila (AMADO *et al.*, 2009).

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

Este ensaio baseia-se na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH reduzindo-o a difenil-picril-hidrazina (YOSHIHARA *et al.*, 2010) (figura 13). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (ALVES *et al.*, 2010).

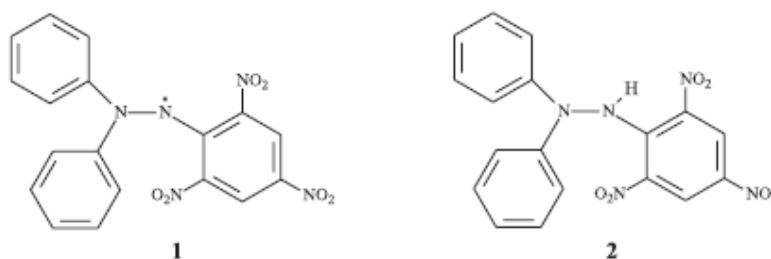


Figura 13: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH (Adaptado de Alves *et al.*, 2010).

Quando uma determinada substância que atua como doador de átomos de hidrogênio, é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta para amarelo pálido. O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração do átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio (SOUSA *et al.*, 2007) (figura 14).

O método de controle mais utilizado é o decaimento da absorvância no comprimento de onda observado entre 515 a 528nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante (ALVES *et al.*, 2010).

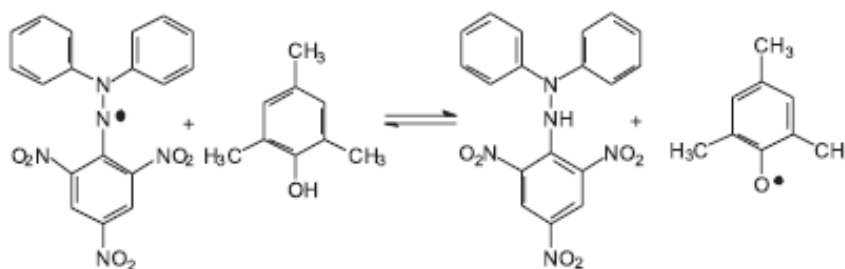
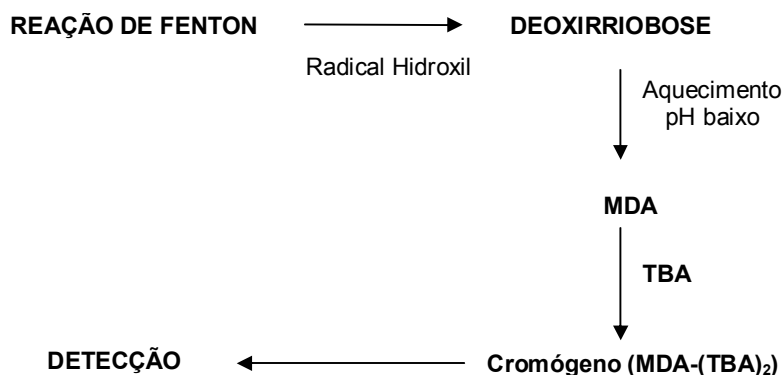


Figura 14: Reação química entre o radical DPPH e o BHT (antioxidante sintético). (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2009)

2.4.4 Radical Hidroxil – Método deoxirribose

Como pode-se esperar, a exposição do DNA (ou RNA) à presença de radicais hidroxila pode vir a gerar uma série de produtos devido a alta reatividade desse radical (ANGELO *et al.*, 2007). O açúcar deoxirribose (2 deoxi-D-ribose), presente na

estrutura do DNA, é fragmentado pelo radical hidroxila formando produtos que quando sob aquecimento e pH baixo, se decompõem para formar malondialdeído (MDA) (ANGELO *et al.*, 2007). Através da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) ocorre a formação de um cromógeno (MDA-(TBA)₂) rosa que pode ser detectado por espectrofotometria em 532 nm conforme mostrado no esquema 2.



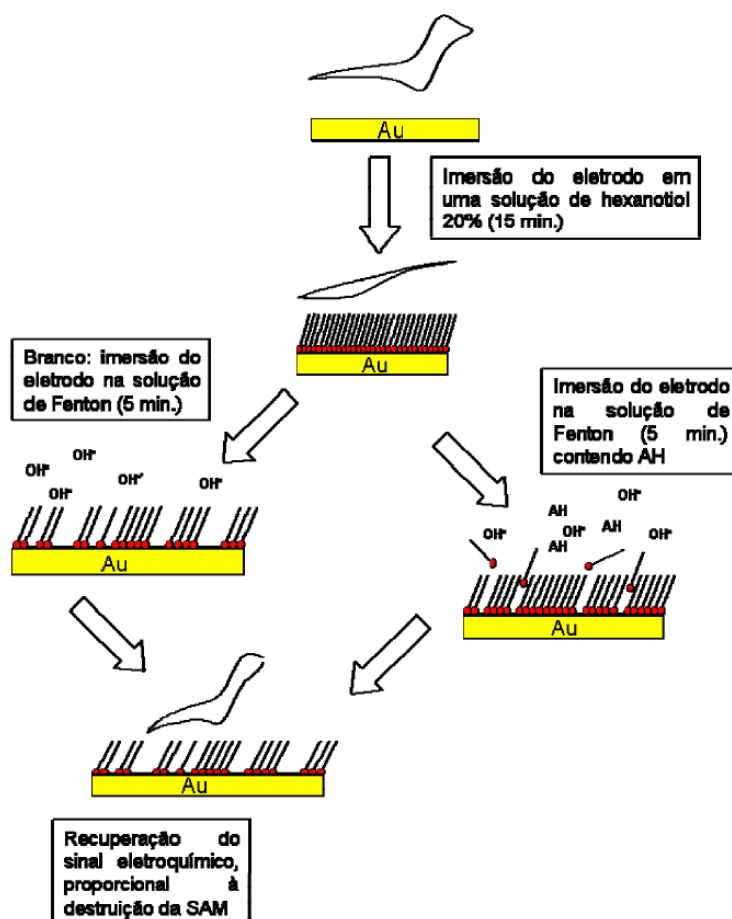
Esquema 2: Formação do composto cromógeno a partir da decomposição da deoxirribose pelos radicais hidroxilas gerados a partir da reação de Fenton.

Os radicais hidroxila são gerados através da mistura de ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe-EDTA. Na presença de um composto antioxidante ocorre a competição do açúcar pelo radical inibindo a formação de MDA e consequentemente a formação do cromógeno (NACZK *et al.*, 2004).

2.5.6 Radical Hidroxil – Monocamadas auto organizadas

As monocamadas auto organizadas (SAM, do inglês *self-assembled monolayers*) de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas organizadas vêm sendo amplamente utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, sendo o grupo mais empregado, indubitavelmente, alcanos de tióis sobre superfície de ouro. Quando os compostos de enxofre estão adsorvidos na superfície do eletrodo, o sinal eletroquímico de um par redox presente no meio pode ser completamente inibido (HILGMANN *et al.*, 2010). Embora as monocamadas auto organizadas sejam conhecidas pela sua estabilidade, descobriu-se que elas podem ser degradadas por radicais livres, como por exemplo, o radical hidroxil.

Quando o eletrodo recoberto com a SAM é exposto a uma solução onde radicais livres são formados, ocorre a degradação da monocamada e consequente regeneração do sinal eletroquímico do par redox presente no meio. A recuperação do sinal eletroquímico do par redox se dá de forma proporcional à extensão do dano causado pelos radicais à monocamada adsorvida no eletrodo (HILGMANN *et al.*, 2010). O esquema 3 ilustra o ataque radicalar à SAM e consequente regeneração do par redox.



Esquema 3: Adsorção de hexanotiol na superfície do eletrodo de ouro. Ataque radicalar à monocamada auto organizada proporciona a recuperação do sinal eletroquímico. (Adaptado de Hilgmann *et al.*, 2010).

Quando uma espécie antioxidante capaz de sequestrar os radicais hidroxila está presente no meio, ocorre uma diminuição no dano à monocamada e, portanto não haverá total regeneração do sinal eletroquímico do par redox. Sendo assim, é possível mensurar a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil de forma indireta

através da diminuição da corrente (sinal eletroquímico) do par redox no meio, uma vez que menos radicais degradam a monocamada, menos sítios do eletrodo estarão disponíveis para a reação eletroquímica com o par redox.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

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 espectrofotômetro de fluorescência Agilent Technologies® modelo Cary Eclipse.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em cromatógrafo modelo 882 Compact IC Plus acoplado a um detector pulso amperométrico modelo 871 Advanced Bioscan e interface 771 IC Compact Interface, Metrohm® (Herisau, Suíça) (Figura 15).

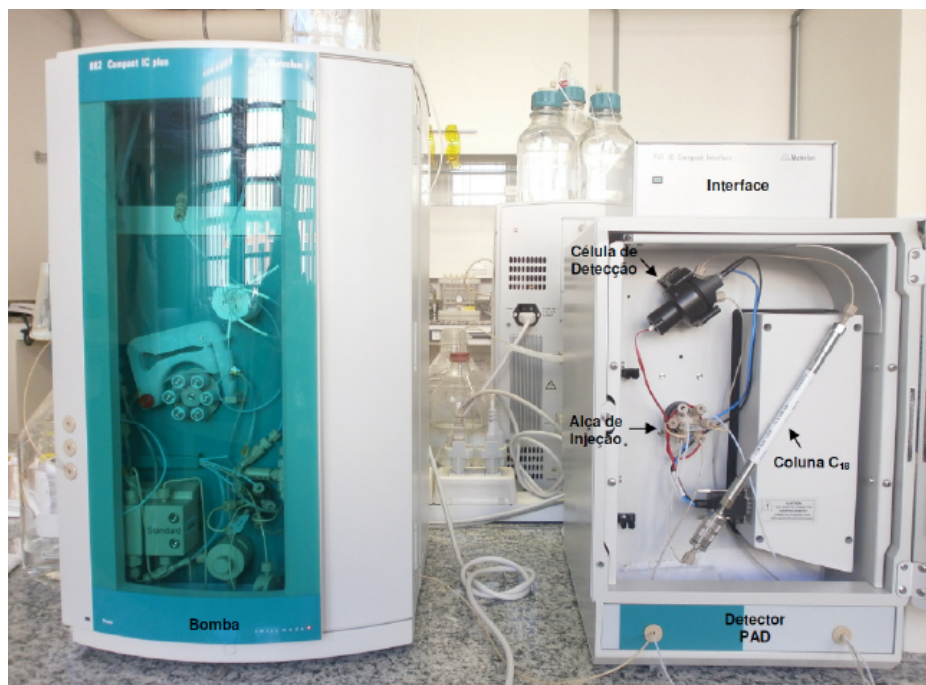


Figura 15: Foto do cromatógrafo Metrohm®.

Foi utilizado um disco de ouro como eletrodo de trabalho, platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de referência de hidrogênio em fase sólida, Metrohm® (Figura 16).

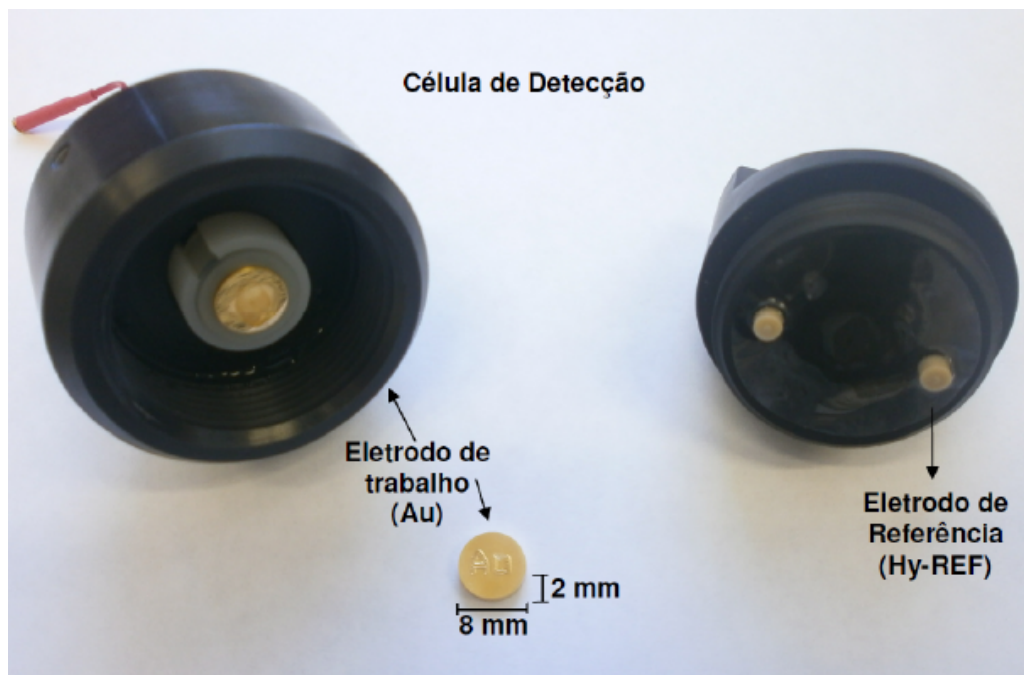


Figura 16: Foto da célula de detecção equipada com eletrodo de ouro e um eletrodo de referência de hidrogênio (Hy-Ref).

A separação dos compostos foi conduzida em uma coluna C18, Thermo Scientific® com dimensões de 150 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μ m. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro Metrohm® sendo o equipamento calibrado diariamente com tampão 4,00 e 7,00.

As medidas voltamétricas foram realizadas em polarógrafo Metrohm® 646 VA Processor e 694 VA Stand.

3.2 Amostragem

As seis espécies de plantas medicinais utilizadas nesse trabalho foram obtidas através de projeto de cooperação científica estabelecido com a Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA). As amostras foram fornecidas como matéria seca sendo necessária apenas a elaboração dos extratos. A tabela 2 abaixo fornece o

nome da espécie bem como o seu número de registro no Horto Florestal da EMBRAPA e o nome popular.

Tabela 2: Espécies de plantas medicinais em estudo

Espécie	Registro	Nome Popular
<i>Mansoa alliacea</i>	IAN 1843394	Cipó d'alho
<i>Cecropia palmata</i>	IAN 185556	Embaúba branca
<i>Cecropia obtusa</i>	IAN 185555	Embaúba vermelha
<i>Connarus perrottettii var angustifolius</i>	IAN 184393	Barbatimão do Pará
<i>Bauhinia variegata var alboflava</i>	IAN 185831	Pata-de-vaca
<i>Bauhinia variegata</i>	IAN 185932	Pata-de-vaca branca

3.2.1 Preparo dos extratos

Utilizou-se 450 g de matéria seca, constituída das folhas de cada espécie (para espécie *Connarus perrottettii* foram utilizadas as cascas da planta), para o preparo dos extratos com solvente orgânico.

A massa pesada foi macerada com etanol 70% à temperatura ambiente durante quatro semanas. Após esse período, o extrato hidroetanólico obtido foi filtrado e o solvente foi evaporado à temperatura de 40°C restando apenas um extrato aquoso. Parte desse extrato aquoso foi evaporado até a secura para obtenção do extrato bruto. O restante foi particionado com os solventes acetato de etila e n-butanol para obtenção dos respectivos extratos com diferentes polaridades. Os solventes foram evaporados até a secura e resuspendidos em metanol para a concentração final de 2%.

O preparo das infusões constituiu-se na pesagem de 5 gramas da matéria seca de cada planta com posterior infusão em 50 mL de água à temperatura de 90°C durante 30 minutos. Após o período de infusão os extratos foram filtrados primeiramente em algodão e depois em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm.

3.3 Procedimentos experimentais, reagentes e soluções

3.3.1 Capacidade Antioxidante frente ao radical DPPH

O radical DPPH (Aldrich Chemistry®) foi obtido comercialmente. Foi preparada uma solução estoque de DPPH em metanol a fim de se obter uma solução de trabalho $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Inicialmente o espectrofotômetro foi zerado com metanol. Para análise dos extratos procedeu-se da seguinte forma: 1500 μL do extrato foram adicionados a 1480 μL da solução de trabalho de DPPH e 20 μL do solvente no qual encontravam-se as amostras (metanol ou água). Paralelamente conduziu-se um branco para cada amostra contendo 1500 μL do extrato e 1500 μL do solvente. 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 metanol. 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 23.

$$\%AA = (A_{\text{DPPH}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})) \times 100 / A_{\text{DPPH}} \quad (22)$$

Onde:

A_{DPPH} = Absorvância do DPPH

A_{amostra} = Absorvância da amostra

A_{branco} = Absorvância do branco da amostra

AA = Atividade antioxidante

3.3.2 Capacidade Antioxidante frente ao ânion radical superóxido, $\text{O}_2^{\cdot-}$

A atividade de sequestro do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ dos extratos 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 Cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT). O EDTA da marca Nuclear® foi obtido no comércio local.

Inicialmente adicionou-se 100 μL de EDTA 30 mmol.L^{-1} , 100 μL de HPX 3 mmol.L^{-1} e 200 μL de NBT $1,42 \text{ mmol.L}^{-1}$ a 100 μL do extrato. Esperou-se 3 minutos

e adicionou-se 100 µL da enzima XOD 0,75 unit.mL⁻¹. O volume foi completado a 3 mL com tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (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 24.

$$\%AA = [1 - (S - S_b)/(C - C_b)] \times 100 \quad (23)$$

Onde:

S = absorvância da amostra

S_b = absorvância do branco da amostra

C = absorvância do controle

C_b = absorvância do branco do controle

3.3.3 Capacidade Antioxidante frente ao radical peroxil pelo método ANCOMROS

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 MgCl₂ (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, analisou-se o extrato hidroetanólico das cultivares de cevada 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 µL do reagente gerador de radical (ABAP). Nas poças A1, A2 e A3 adicionou-se 10 µL de solução hidroetanólica (branco da amostra), e a partir das poças A4, A5 e A6 foram adicionados 10 µL do extrato da cultivar, 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 μL do tampão de reação e 10 μL 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.

3.3.4 Radical Hidroxil – Método deoxirribose

O ensaio para medir a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil pelo método da deoxirribose foi conduzido conforme Zhao *et al.*, 2006 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[®], Porto Alegre, RS.

Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 25 mmol.L^{-1} , pH 7,4. Em um tubo reacional foi adicionado 100 μL do extrato, 100 μL de EDTA 1 mmol.L^{-1} , 100 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol.L^{-1} , 100 μL de 2 deoxi-D-ribose 36 mmol.L^{-1} , 100 μL de H_2O_2 e 100 μL de ácido ascórbico 1 mmol.L^{-1} , 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 equação 3 (a mesma utilizada para o radical superóxido) foi possível calcular a atividade antioxidante das infusões frente ao radical hidroxil.

3.3.5 Monocamada auto-organizada – Radical Hidroxil

O método da atividade antioxidante frente ao radical hidroxil, através da degradação de monocamadas fixadas em eletrodo de ouro, foi conduzido conforme Hilgmann *et al.*, 2010, com modificações.

O complexo Cloreto de hexamino rutênio (III), $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ e o padrão de Hexanotiol foram adquiridos da Sigma[®], Porto Alegre, RS. Sulfato ferroso amoniacal foi adquirido do comércio local.

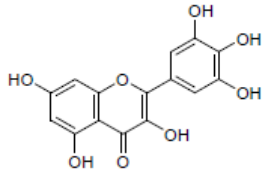
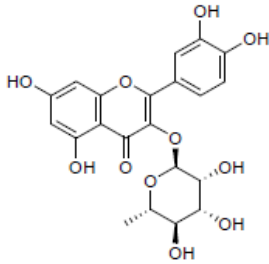
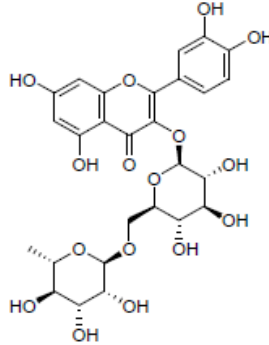
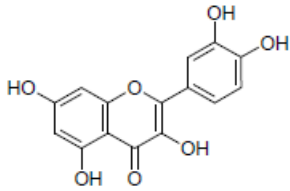
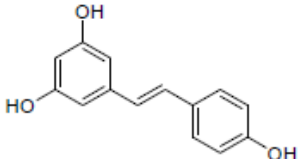
Para formação da monocamada auto-organizada no eletrodo de ouro, primeiramente submeteu-se o eletrodo a três diferentes tratamentos: tratamento químico, que consistiu na imersão do eletrodo em uma solução piranha de H_2SO_4 : H_2O_2 (3:1) durante 3 minutos; polimento manual com pasta de diamante (Metrohm[®]) e tratamento eletroquímico que consistiu na aplicação de 100 ciclos voltamétricos na faixa de 0,0 V a 1,8 V em uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido sulfúrico com uma velocidade de varredura de 500 mV.s^{-1} . Concluída a limpeza da superfície do eletrodo, a monocamada de hexanotiol foi preparada através da imersão do eletrodo em uma solução etanólica de hexanotiol a 20% durante 15 minutos. Após o tempo reacional, o eletrodo foi lavado com etanol e água e finalmente imerso em uma solução contendo o complexo de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. A solução $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ foi preparada em tampão acetato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,6. Através da aplicação da voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -0,6 V a + 0,4 V foi possível registrar um voltamograma cíclico com a ausência do sinal do par redox em solução. Após o registro do voltamograma, o eletrodo recoberto foi submetido à reação de fenton na presença do extrato. Em um tubo reacional, $1000 \mu\text{L}$ da solução $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ de sulfato ferroso amoniacal foram adicionados ao extrato da planta. Após a imersão do eletrodo 4 mL de H_2O_2 $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ foram adicionados e dando início a reação de Fenton. Após 30 minutos de ataque radicalar, um voltamograma cíclico do par redox foi novamente registrado. A diferença da corrente gerada pelo par redox na ausência e na presença do extrato é proporcional a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil. A atividade antioxidante é calculada através da equação abaixo onde, I_{se} é a corrente do par redox registrada após o ataque radicalar, sem a presença do extrato e I_{ce} é a corrente do par redox registrada após o ataque radicalar à monocamada, na presença do extrato.

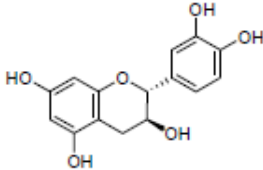
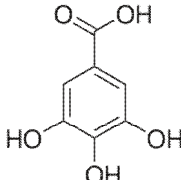
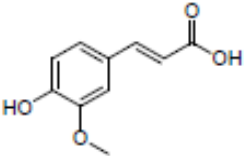
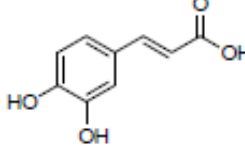
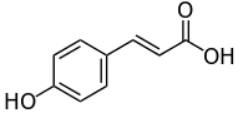
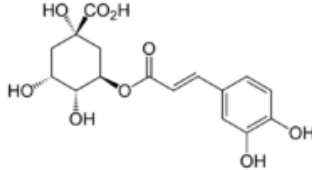
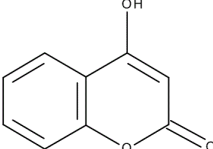
$$\text{AA\%} = [(I_{se} - I_{ce}) / I_{se}] \times 100 \quad (24)$$

3.3.6 Caracterização cromatográfica por HPLC – PAD

Os padrões utilizados para o desenvolvimento da metodologia cromatográfica foram adquiridos da Sigma Aldrich® e estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Polifenóis em estudo

Classe	Exemplo	Estrutura
Flavonóides	Miricetina	
	Quercitrina	
	Rutina	
	Quercetina	
Diarileteno	Resveratrol	

Catequinas	Catequina	
Ácidos Fenólicos	Ácido gálico	
	Ácido Ferúlico	
	Ácido Cafeico	
	Ácido p-coumárico	
	Ácido Clorogênico	
Cumarinas	4-hidroxicumarina	

Uma solução estoque de 1000 mg.L⁻¹ em metanol foi preparada para cada um dos compostos e diluídas na fase móvel até a concentração desejada para injeção.

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido com sistema de eluição isocrática acoplado a um detector de amperometria pulsada.

Utilizou-se Coluna analítica C18 de dimensões 4,6 mm x 150 mm x 5 µm (Thermo Scientific) para a separação cromatográfica e eletrodo de ouro para a detecção amperométrica.

Para análise cromatográfica das plantas medicinais, diariamente a coluna cromatográfica (C18) foi condicionada com a fase móvel 50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, 1 mmol L⁻¹ de β - Ciclodextrina, 30% (v/v) de metanol e pH 2,00 por aproximadamente 30 minutos em fluxo de 1 mL min⁻¹, tempo suficiente para a estabilização da linha base. A detecção foi efetuada utilizando o modo Pulso do software do detector sendo o potencial de trabalho E₁ otimizado para +0,7 V.

Após o intervalo de condicionamento, as soluções de trabalho foram injetadas de forma manual utilizando uma alça de injeção de 20 µL. No final do dia a coluna era lavada com água ultra pura por uma hora, em fluxo de 1,0 mL min⁻¹ para que todo o sal fosse retirado da coluna, e solução de metanol:água ultrapura (90:10) por 30 minutos em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, sendo esta última a solução de armazenamento da coluna.

A preparação da fase móvel foi seguida do ajuste do pH com soluções de ácido fosfórico e hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e filtração em membrana de acetato com poro de 0,45 µm. Após a filtração, a fase móvel foi desaerada durante 60 minutos em ultrassom. A limpeza do eletrodo de ouro, Vario Cell para Bioscan (Metrohm®), com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, compreendeu a aplicação de ciclos de limpeza durante a medida e quando necessário polimento manual do eletrodo utilizando suspensão de diamante.

Os solventes Acetonitrila e Metanol foram adquiridos no comércio local e eram de grau HPLC.

3.3.7 Validação do método cromatográfico por HPLC – PAD

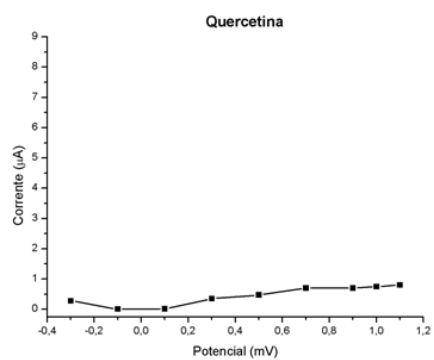
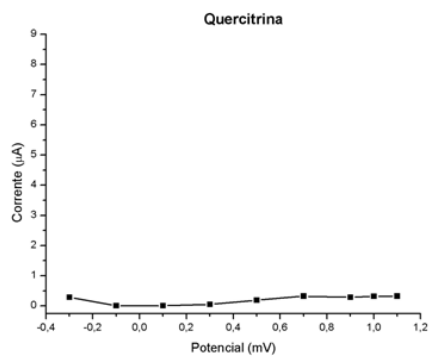
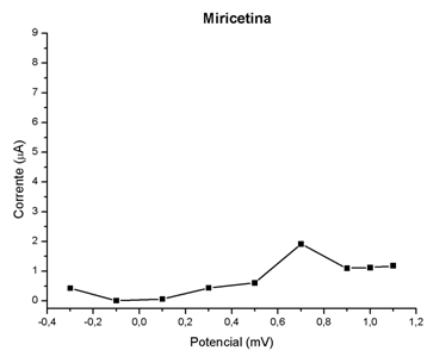
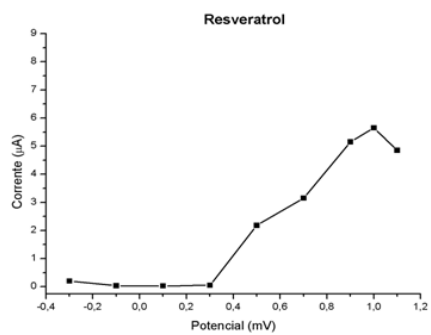
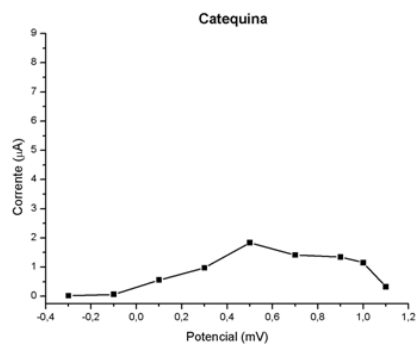
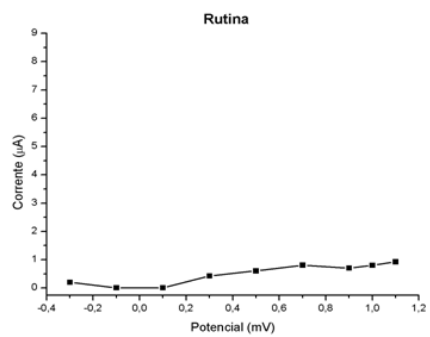
Para validação do método cromatográfico procedeu-se segundo a resolução prevista pela ANVISA nº 899 de 29 de maio de 2003 que dispõem o Guia de validação para métodos analíticos e bioanalíticos. Segunda essa resolução, é considerada validada as metodologias que sejam avaliadas sob os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Desenvolvimento e Otimização do método cromatográfico com detecção pulso-amperométrica

Para otimização do método cromatográfico baseado na detecção pulso-amperométrica, foi necessário investigar inicialmente o potencial voltamétrico de oxidação-redução dos compostos fenólicos em estudo. Aplicando uma varredura de potenciais de -0,3 V a +1,1 V foi possível observar, através de um voltamograma hidrodinâmico de cada antioxidante individualmente, as correntes geradas a partir da reação da troca de elétrons dos compostos com a superfície do eletrodo de trabalho.

A varredura foi possível através da utilização do modo DC (corrente contínua, do inglês, *current direct*) o qual permite a aplicação de um potencial constante no eletrodo de trabalho. A faixa de potenciais foi delimitada a partir das informações a respeito da faixa útil de potenciais para o eletrodo de ouro (METROHM, 2007) a qual varia de acordo com o pH do meio. A figura 17 mostra o voltamograma hidrodinâmico dos compostos elucidando o comportamento eletroquímico na faixa útil de potencial do eletrodo de ouro.



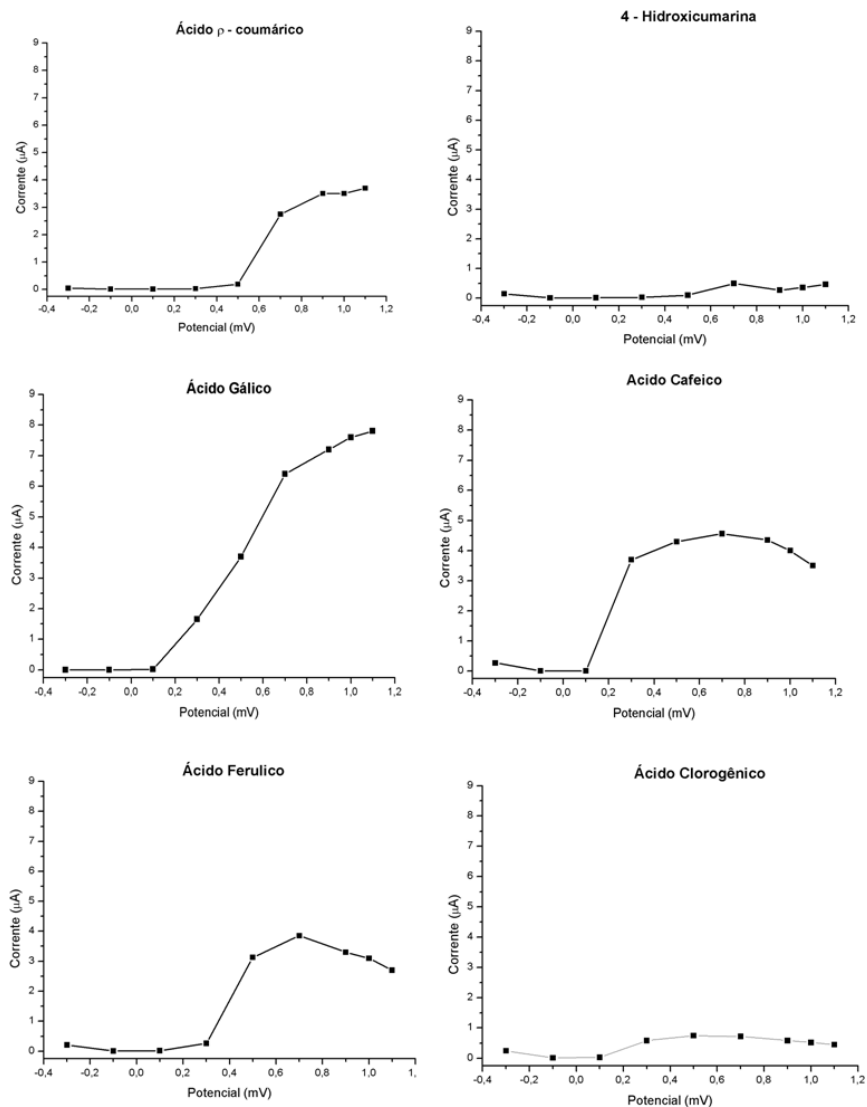


Figura 17: Voltamogramas hidrodinâmicos dos compostos antioxidantes obtidos através do modo DC do detector amperométrico. Faixa de varredura de potenciais: -0,3 a +1,1 V. Tampão fosfato 10 mM, pH 2,00, 10 mg.L⁻¹.

Como pode-se observar nos voltamogramas, o potencial de + 0,7 V mostrou-se adequado para a detecção dos compostos por se tratar do potencial que fornece maiores valores de corrente para a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides em pH 2,0. Uma vez que a corrente gerada da reação com o eletrodo está diretamente relacionada à concentração dos compostos, o potencial escolhido permitiu uma maior sensibilidade na detecção.

A otimização da detecção também foi estudada em pH 4,0 e 7,0; porém observou-se uma diminuição considerável na sensibilidade principalmente dos

flavonóides uma vez que esse pH é bastante próximo dos valores de pKa desses analitos. Tendo em vista que o pKa dos flavonóides varia em torno de 6,5 é esperado que em valores de pH mais baixos obtenha-se uma maior sensibilidade na detecção da mesma forma para os ácidos fenólicos que possuem pKa em torno de 4,5. Esse comportamento indica que as reações de troca de elétrons no eletrodo de ouro envolvem a participação de íons H^+ nos processos redox.

O detector amperométrico (PAD) tem sido mais amplamente investigado principalmente pela possibilidade da aplicação de pulsos de potencial no eletrodo de trabalho, o que conduz a um aumento significativo na sensibilidade da detecção (TRAJANOWICZ, 2011). A principal ideia da aplicação de ondas na forma tempo-potencial para a polarização do eletrodo de trabalho (principalmente metais nobres como Pt e Au) é promover uma diminuição na barreira de ativação para a oxidação de determinados analitos.

A figura 18 esquematiza um ciclo completo da detecção amperométrica onde E_1 é o potencial de amostragem, ou seja, o potencial necessário para oxidar ou reduzir os analitos que eluem da separação cromatográfica, E_2 é o potencial positivo aplicado em determinado intervalo de tempo e E_3 é o potencial negativo responsável pela redução catódica dos óxidos da superfície do eletrodo.

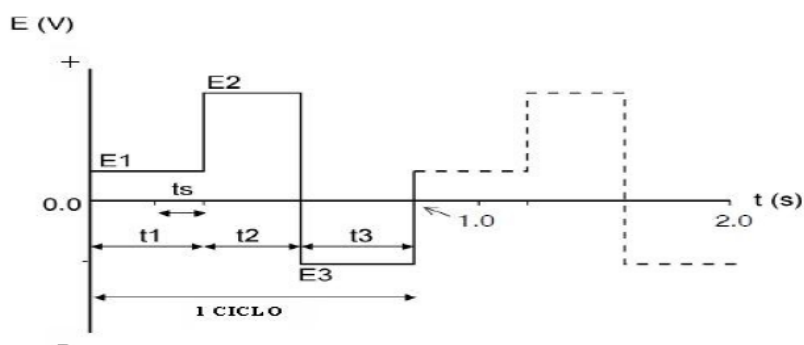


Figura 18: Ciclo da aplicação de potencial na amperometria pulsada. E_1 é o potencial de amostragem, E_2 é o potencial de oxidação e E_3 é o potencial de redução (Adaptado CARVALHO *et al.*, 2013).

Alguns produtos intermediários da reação eletrodo-analito podem se adsorver fortemente à superfície do eletrodo. Dessa forma, a aplicação de um potencial de oxidação por um curto período (E_2) provoca simultaneamente a formação de óxidos

do metal no qual o eletrodo é formado (por exemplo, AuOH), e através de uma redução catódica os óxidos da superfície são reduzidos e a superfície do eletrodo regenerado (E_3), eliminando ou diminuindo a adsorção dos produtos intermediários na superfície do eletrodo.

Sendo assim, uma das principais vantagens da amperometria pulsada, além do aumento da sensibilidade na detecção, é a eliminação da necessidade freqüente de polimento manual da superfície do eletrodo uma vez que, a aplicação de pulsos promove a limpeza da superfície do metal (TRAJANOWICZ, 2011). Neste trabalho, o ciclo de detecção dos compostos foi otimizado para 2 segundos sendo que o potencial de trabalho (+ 0,7 V) foi aplicado durante 0,4 segundos, o potencial de oxidação (+ 1,0 V) durante 0,4 segundos e o potencial de redução (- 0,2 V) durante 1,2 segundos. A aplicação dos potenciais +1,0 V e -0,2 V permitiram a limpeza e a regeneração da superfície do eletrodo de trabalho através da oxidação e redução, respectivamente, das impurezas que possivelmente viessem a se adsorver no eletrodo de ouro.

Uma vez otimizada a detecção dos compostos partiu-se para o desenvolvimento da separação por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando fase reversa. Para a otimização da fase móvel os seguintes parâmetros foram avaliados: concentração do solvente orgânico (metanol e acetonitrila), concentração de fosfato de sódio, surfactantes como dodecilsulfato de sódio e octilsulfato de sódio, aditivos como a β -ciclodextrina e o pH, sendo esse um fator crítico da otimização uma vez que interfere na sensibilidade da detecção. O fluxo da fase móvel também foi otimizado.

Utilizando-se um mistura dos padrões na concentração de 10 mg.L^{-1} de cada composto, iniciou-se o desenvolvimento da metodologia de separação pela variação na concentração do modificador orgânico da fase móvel. Em um primeiro cenário, a concentração de fosfato de sódio foi mantida em 10 mmol.L^{-1} variando-se a concentração de metanol entre 10 e 50% (v/v) e o pH de 2 a 7. A concentração de 50% não foi satisfatória uma vez que os 12 analitos coeluíram no início do cromatograma. Da mesma forma, a concentração de 10% também não se mostrou eficiente tendo em vista que proporcionou um tempo de análise muito grande e em 70 minutos os analitos mais apolares não foram eluídos da coluna.

A concentração de acetonitrila foi variada de 10 a 50% (v/v) utilizando fosfato de sódio 10 mmol.L^{-1} em pH 4,0 sendo que a concentração de 25% forneceu uma

melhor separação dos compostos porém apresentou um auto ruído na linha de base devido a maior adsorção do solvente na superfície do eletrodo de ouro. A fim de se evitar uma diminuição na sensibilidade de detecção, optou-se pelo uso do metanol o qual ofereceu menos danos a superfície do eletrodo e diminuiu a frequência da necessidade de polimento manual.

A concentração de 30% de metanol em pH 2,00 foi a que apresentou a melhor separação dos analitos em estudo uma vez que nesse pH todos os compostos encontram-se protonados e portanto favorecem o equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. No entanto, ainda foi possível observar a co-eluição dos compostos catequina, ácido gálico e ácido clorogênico no início do cromatograma, conforme o cromatograma apresentado na figura 19.

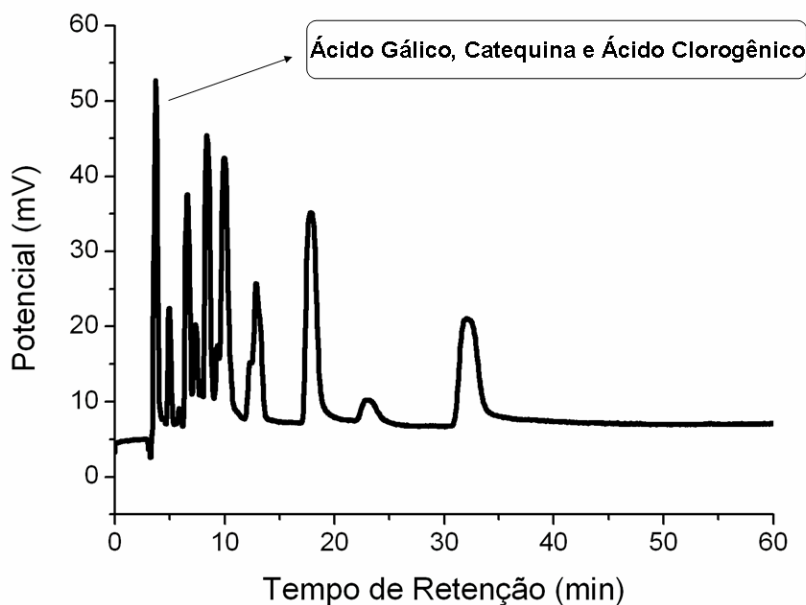


Figura 19: Cromatograma obtido a partir da injeção dos 12 compostos na concentração de 30 mg.L^{-1} , nas condições de 30% de metanol, 10 mmol.L^{-1} de fosfato de sódio e pH 2,00. Fluxo da fase móvel 1 mL.min^{-1} .

O fluxo da fase móvel foi variado de $0,5$ a $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ a fim de se obter a separação desses três compostos, no entanto não foi o bastante para proporcionar a separação uma vez que trata-se de compostos com polaridade bastante semelhante. O fluxo da fase móvel foi mantido em $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

Partiu-se então para a otimização da concentração do fosfato de sódio e o uso de aditivos na fase móvel. O fosfato foi variado de 10 a 50 mmol.L⁻¹ sendo que a concentração de 50 mmol.L⁻¹ proporcionou a separação do ácido gálico, catequina e ácido clorogênico entre 2 e 4 minutos (figura 20) contudo, os analitos mais apolares levaram mais tempo para serem eluídos da coluna visto que o aumento da concentração de sal tende a aumentar o tempo de retenção dos analitos.

Além do acréscimo no tempo de análise, o aumento da concentração de fosfato também elevou o ruído da linha base conforme pode se observar no cromatograma da figura 20.

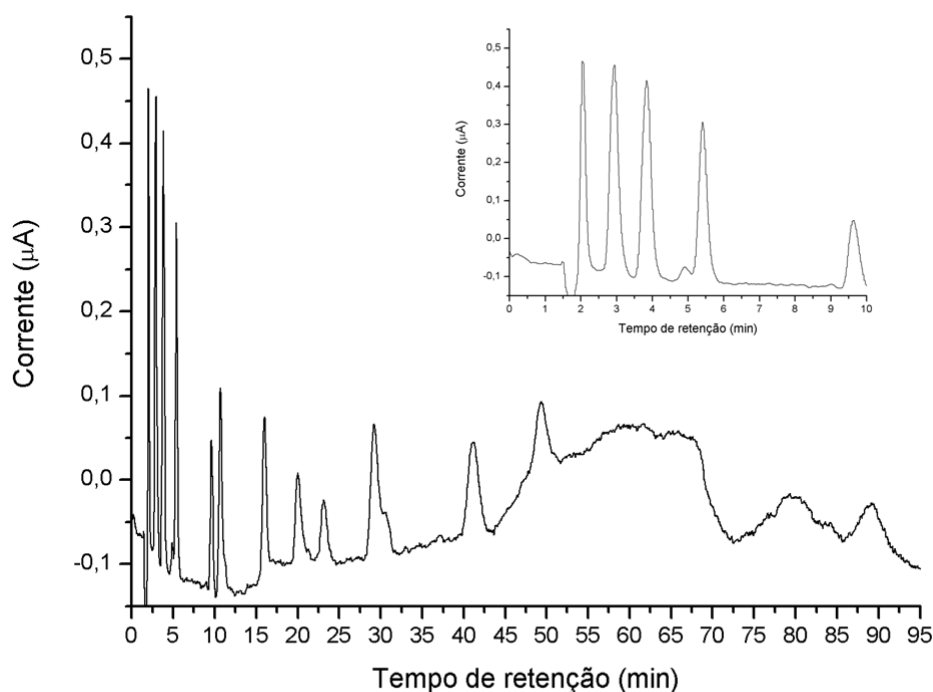


Figura 20: Cromatograma obtido a partir da injeção dos 12 compostos na concentração de 30 mg.L⁻¹, nas condições de 30% de metanol, 50 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio e pH 2,00. Fluxo da fase móvel 1 mL.min⁻¹. O cromatograma menor ilustra a separação de Gálico, Catequina e Clorogênico alcançada com o aumento da concentração de fosfato na fase móvel.

A fim de melhorar a resolução do cromatograma testou-se os aditivos dodecil sulfato de sódio e octil sulfato de sódio para a formação de pares iônicos ao longo do processo de eluição em fase reversa. Porém, nenhum dos surfactantes testados

modificou de forma positiva o cenário da separação sendo que o SDS ainda diminuiu a sensibilidade dos compostos quando utilizado em altas concentrações.

Além do SDS e do octil, a β -ciclodextrina foi testada como aditivo da fase móvel. As ciclodextrinas já vêm sendo utilizadas como modificadores de fase móvel na cromatografia líquida de alta eficiência para as mais diversas aplicações (CLAUDE *et al.*, 2004). No entanto, há uma falta de informações a cerca do uso desses compostos como aditivos para a separação de ácidos fenólicos e flavonóides utilizando fase reversa. O exterior das moléculas das ciclodextrinas é hidrofílico enquanto possuem uma cavidade hidrofóbica que podem incluir seletivamente moléculas orgânicas para formar complexos de inclusão não covalentes (CLAUDE *et al.*, 2004). Uma vez que os compostos sejam incluídos na cavidade menos polar das ciclodextrinas, as propriedades químicas dos compostos podem ser afetadas (CLAUDE *et al.*, 2004) e conseqüentemente a separação cromatográfica. Assim, as moléculas de ciclodextrina influenciam na partição do soluto entre a fase estacionária e o complexo de inclusão formado na fase móvel (SCHNEIDERMAN *et al.*, 2000).

A resolução e a eficiência na separação dependem da concentração de ciclodextrina utilizada, da fase móvel e da temperatura (SCHNEIDERMAN *et al.*, 2000). Dessa forma, a concentração de β -ciclodextrina foi testada de 0,5 a 5 mmol.L⁻¹. Uma vez que o fenômeno de inclusão dos compostos na cavidade da ciclodextrina aumenta a solubilidade desses na fase móvel, o tempo de retenção é diminuído e, portanto, nas concentrações de 4 e 5 mmol.L⁻¹ houve a co-eluição dos compostos mais polares. A concentração de 1 mmol.L⁻¹ mostrou-se a mais satisfatória uma vez que promoveu a diminuição do tempo de análise (de 95 para 70 minutos) e proporcionou um aumento na resolução do cromatograma bem como um aumento na sensibilidade da detecção dos compostos no eletrodo de ouro.

Por fim, a temperatura ideal da coluna para a separação foi otimizada utilizando um forno de temperatura. Variou-se a temperatura de 20 a 30°C. Em temperaturas menores, houve a formação de caudas nos picos dos compostos menos polares. Em temperaturas acima de 25°C a velocidade de difusão dos analitos foi aumentada melhorando a resolução do cromatograma, no entanto, diminuiu o tempo de retenção provocando a co-eluição dos compostos mais polares. A temperatura de 25°C mostrou-se a temperatura ideal para a separação dos 12

compostos utilizando complexos de inclusão com a β -ciclodextrina na concentração de 1 mmol.L^{-1} .

A figura 21 ilustra o cromatograma obtido através das condições otimizadas para a separação isocrática dos compostos: Ácido Gálico, Catequina, Ácido clorogênico, Ácido Cafeico, Ácido ρ - coumárico, Ácido Ferulico, Resveratrol, 4 – hidroxycumarina, Rutina, Miricetina, Quercitrina e Quercetina, sendo que as condições otimizadas foram: Metanol 30%, Fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} , β -ciclodextrina 1 mmol.L^{-1} , pH 2,0, fluxo da fase móvel de 1 mL.min^{-1} , potencial de detecção + 0,7 V e temperatura do forno de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

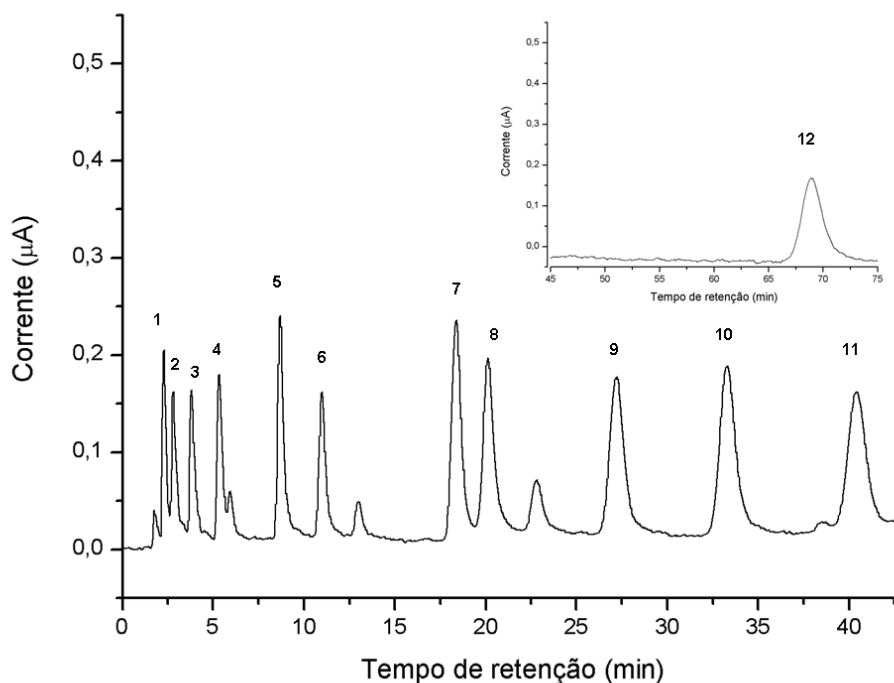


Figura 21: Cromatograma obtido através do método de cromatografia líquida de alta eficiência com eluição isocrática para os 12 compostos fenólicos em estudo a partir das condições otimizadas: Metanol 30%, Fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} , β -ciclodextrina 1 mmol.L^{-1} , pH 2,00, fluxo da fase móvel 1 mL.min^{-1} , potencial de detecção + 0,7 V, $24,7 \text{ }^\circ\text{C}$. (1) Ácido Gálico; (2) Catequina; (3) Ácido Clorogênico; (4) Ácido Cafeico; (5) Ácido ρ - coumárico; (6) Ácido Ferulico; (7) Resveratrol; (8) 4 – hidroxycumarina; (9) Rutina; (10) Miricetina; (11) Quercitrina; (12) Quercetina.

4.1.1 Validação do método HPLC – PAD

O método cromatográfico desenvolvido foi validado sob os parâmetros de especificidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez.

A especificidade e seletividade do método foram avaliadas pela possível interferência de compostos fenólicos da mesma natureza dos analitos em estudo que pudessem vir a estarem presentes na matriz. Foram testados os seguintes interferentes: galangina, luteolina, apigenina, 3,6 – diidroxiflavona, ácido vanílico, 6 – hidroxycumarina, 3 acetilcumarina, canferol, crisina, flavona e ácido rosmarínico.

Os compostos galangina, luteolina e apigenina co-eluíram entre si e não interferiram na separação cromatográfica dos 12 antioxidantes. Foi possível observar a eluição do ácido rosmarínico logo após a quercitrina sendo que, se estiver presente nas amostras pode ser identificado e não interfere na quantificação dos analitos em estudo.

Os compostos 3,6 – diidroxiflavona, ácido vanílico, 6 – hidroxycumarina, 3 acetilcumarina e canferol não foram eluídos dentro do tempo de análise dos compostos fenólicos de abrangência desse trabalho, portanto, não interferem na caracterização e quantificação dos compostos nas plantas medicinais.

Além disso, o estudo do comportamento eletroquímico foi aplicado também aos interferentes testados sendo que todos apresentaram corrente de oxi-redução no eletrodo de ouro com exceção dos compostos crisina e flavona. Esses compostos não foram facilmente detectáveis uma vez que apresentaram valores de corrente relativamente baixos no eletrodo de trabalho dentro da faixa de potenciais estudada (Figura 22).

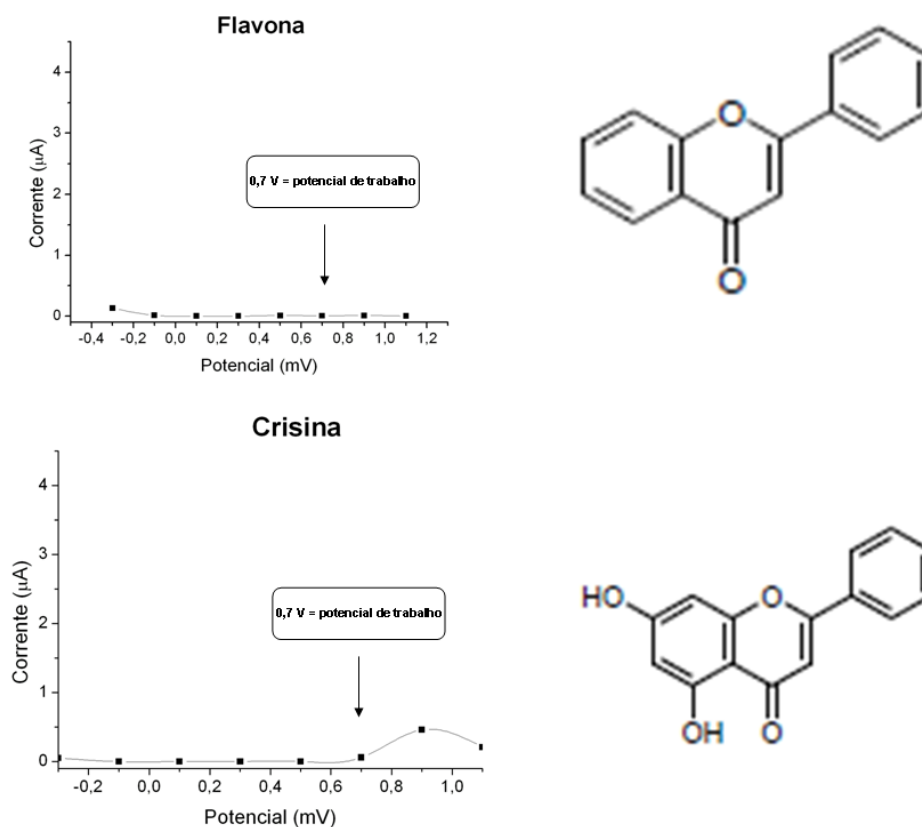


Figura 22: Voltamogramas hidrodinâmicos para os compostos flavona e crisina. Os compostos não interferem uma vez que não apresentam corrente de oxidação no potencial de trabalho otimizado.

Para a flavona, esse comportamento pode estar associado principalmente à ausência de grupamentos hidroxilas na sua estrutura, os quais se reduzem no eletrodo de ouro na faixa de potenciais estudada. Já a crisina apresenta dois grupamentos hidroxilas, porém não estão localizados no anel B da estrutura básica dos flavonóides. A corrente observada de +0,8 a +1,1 V para a crisina deve-se, possivelmente, as hidroxilas do anel A.

Dessa forma, os compostos crisina e flavona não interferem na separação cromatográfica do método desenvolvido uma vez que não são detectadas no potencial de + 0,7V.

Para verificar a linearidade do método fez-se uso da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados, com base na relação área vs concentração. Foram injetados 10 pontos de diferentes concentrações dos analitos em estudo para avaliar a faixa linear. Os resultados de linearidade são mostrados na

tabela 4. Além disso, a faixa de trabalho foi determinada pela injeção de 5 pontos em triplicata.

Tabela 4: Parâmetros de linearidade do método desenvolvido.

Analito	Faixa Linear (mg.L⁻¹)	Faixa de trabalho (mg.L⁻¹)	Equação da reta	Faixa do RSD (%) individual	r
Ácido Gálico	0,1 – 100	0,5 – 50	$y = 0,2935x + 0,3202$	2,72 – 4,60	0,998
Ácido Clorogênico	0,3 – 125	2 – 50	$y = 0,1091x + 0,3370$	2,04 – 5,17	0,992
Ácido p-coumárico	0,1 – 125	0,5 – 30	$y = 0,6905x + 1,7777$	0,05 – 5,39	0,993
Resveratrol	0,3 – 125	0,5 – 30	$y = 1,2404x + 2,8794$	0,87 – 3,32	0,991
Miricetina	0,3 – 125	0,5 – 30	$y = 0,6375x + 1,5749$	0,29 – 3,99	0,996
Catequina	0,05 – 125	0,3 – 50	$y = 0,8057x + 0,5479$	1,73 – 5,88	0,999
Ácido Cafeico	0,3 – 50	1,0 – 30	$y = 0,1827x + 0,1585$	2,66 – 4,97	0,996
Ácido Ferúlico	0,5 – 100	1 – 50	$y = 0,3629x - 0,8267$	0,46 – 5,50	0,991
4-Hidroxicumarina	0,3 – 100	0,5 – 30	$y = 0,5156x + 0,6464$	1,01 – 5,41	0,998
Rutina	0,5 – 100	1 – 50	$y = 0,3163x + 0,4451$	0,78 – 5,00	0,993
Quercitrina	0,3 – 100	2,5 – 30	$y = 0,5155x + 0,7553$	2,77 – 5,46	0,990
Quercetina	0,75 – 100	1 – 50	$y = 1,1245x - 1,2684$	2,03 – 6,19	0,998

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação foram injetadas 10 replicatas da linha base sendo que o LD foi considerado 3 vezes o desvio padrão das injeções e o LQ 10 vezes. Os resultados são mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Limites de detecção e quantificação para os compostos fenólicos em estudo.

Analito	LD (mg.L⁻¹)	LQ (mg.L⁻¹)
Ácido Gálico	0,029	0,098
Ácido Clorogênico	0,378	1,261
Ácido p-coumárico	0,034	0,112
Resveratrol	0,023	0,078
Miricetina	0,043	0,143
Catequina	0,016	0,053
Ácido Cafeico	0,075	0,249
Ácido Ferúlico	0,170	0,566
4-Hidroxicumarina	0,025	0,082
Rutina	0,079	0,264
Quercitrina	0,023	0,077
Quercetina	0,035	0,115

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intra-corrída), através da triplicata de 5 concentrações no mesmo dia, e precisão intermediária (inter-corrída) através da injeção em triplicata do ponto intermediária da curva em três dias diferentes. Segundo Ribani (2004), o desvio padrão relativo ou CV (%) da precisão para amostras complexas pode ser aceito em valores de até 20%. Os resultados da precisão são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Precisão do método desenvolvido

Analito	Concentração (mg.L⁻¹)	Repetibilidade CV (%)	Precisão intermediária CV (%)*
Ácido Gálico	0,5	2,97	6,64
	5	2,35	
	10	2,92	
	30	2,60	
	50	2,97	
Ácido Clorogênico	2	2,13	
	5	1,20	

	10	4,22	6,09
	30	3,17	
	50	4,21	
Ácido p-coumárico	0,5	0,26	
	5	2,57	
	10	0,23	6,53
	15	1,21	
	30	1,63	
Resveratrol	0,5	3,30	
	5	2,04	
	10	1,52	6,93
	15	1,96	
	30	1,93	
Miricetina	0,5	1,12	
	5	0,20	
	10	3,06	2,27
	15	3,33	
	30	2,62	
Catequina	0,3	3,50	
	1	3,70	
	10	3,85	9,01
	30	3,51	
	50	1,70	
Ácido Cafeico	1	1,52	
	5	3,42	
	10	4,78	5,65
	30	2,73	
	50	2,65	
Ácido Ferúlico	1	1,34	
	5	0,18	
	15	2,89	6,02
	30	3,98	
	50	0,16	
4-Hidroxicumarina	0,5	1,81	
	1	3,71	
	10	1,46	8,68
	30	3,08	
	50	0,96	
Rutina	1	3,69	
	5	4,16	

	15	1,54	3,84
	30	3,87	
	50	3,57	
Quercitrina	2,5	3,68	
	10	4,58	
	15	4,14	5,57
	30	2,62	
Quercetina	1	3,84	
	5	4,55	
	15	2,22	2,75
	30	2,63	
	50	1,98	

* CV (%) determinado pela injeção em triplicata da concentração intermediária (10 mg L⁻¹, com exceção do Ácido Gálico e Catequina cuja concentração utilizada para a precisão inter-dia foi de 16,67 mg L⁻¹) em três dias diferentes.

A exatidão do método foi avaliada pelo método da adição do padrão nas amostras em estudo. Para os analitos Ácido Gálico e Catequina, a exatidão foi avaliada na infusão da espécie *Conarus perrotettii*. A exatidão dos outros analitos foi avaliada na fração butanólica da espécie *Mansoa alliacea*. Às amostras foram adicionadas três concentrações crescentes dos analitos. Através da regressão linear obteve-se uma curva analítica sendo que a concentração encontrada para cada adição correspondeu a “x” e a concentração conhecida adicionada correspondeu a 100% sendo os resultados expressos em percentual de recuperação. As recuperações variaram de 82% para o ácido clorogênico a 114% para a rutina e estão listadas na tabela 7.

Tabela 7: Exatidão expressa em recuperação (%).

Analito	Recuperação (%)
Ácido Gálico	111,13
Resveratrol	110,90
Ácido clorogênico	81,95
Ácido Cafeico	88,00
Ácido p – coumárico	97,53
Ácido Ferulico	113,00
4 – Hidroxicumarina	92,88
Rutina	114,29
Miricetina	100,58
Quercitrina	103,13

Catequina	99,57
Quercetina	102,00

Para avaliar a robustez do método, pequenas variações na temperatura, no pH e na concentração dos reagentes da fase móvel foram analisadas sendo que o método mostrou-se robusto a todas as variações numa faixa de 0,05 para mais ou para menos nos parâmetros testados. Além disso, o método mostrou-se reprodutível quando realizado por diferentes analistas.

4.2 Caracterização cromatográfica das plantas medicinais da Amazônia

Posto que o método cromatográfico para a caracterização dos compostos fenólicos nas plantas medicinais tenha sido desenvolvido e validado foi possível analisar os extratos das seis espécies de plantas em estudo nesse trabalho.

Tendo em vista a ausência de informações na literatura quanto a presença ou ausência de compostos fenólicos nessas espécies, um *screening* de todas as frações de cada espécie foi realizado a fim de se ter uma visão do perfil cromatográfico dos extratos. Para a maioria das espécies foi possível identificar e quantificar diversos compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção e foram quantificados pelo método da adição do padrão em três níveis de fortificação.

A espécie *Connarus perrotettii* var *angustifolius* possui um potencial etnofarmacológico comprovado pelas comunidades do norte do Brasil (PARACAMPO, 2011), no entanto seu uso popular tem sido relacionado apenas a presença de alcalóides uma vez que não há estudos na literatura com outras classes de compostos com propriedades similares nessa espécie. Pela caracterização dos extratos da espécie *Connarus perrotettii*, foi possível identificar e quantificar os compostos Ácido Gálico, Catequina e Ácido Cafeico pelo método cromatográfico desenvolvido nesse trabalho. A figura 23 ilustra a quantificação dos compostos na infusão dessa espécie na concentração de 0,5%.

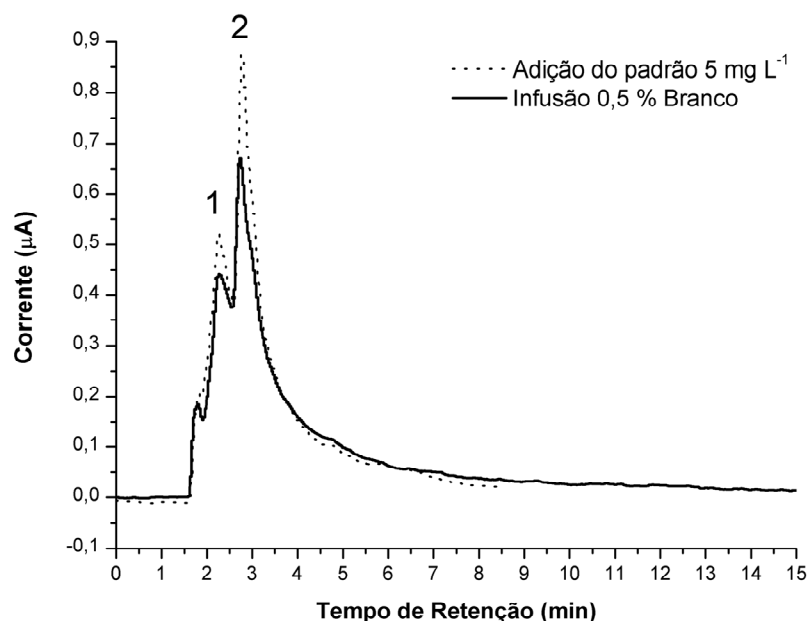


Figura 23: Identificação dos compostos Ácido Gálico (1), Catequina(2) na infusão (0,5%) da espécie *Connarus perrottetii* var *angustifolius* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Os compostos Ácido Gálico e Catequina foram quantificados em maiores quantidades na infusão da espécie e totalizam aproximadamente 0,6% (m/m) da massa bruta da planta medicinal. Levando em consideração o uso medicinal, o consumo do chá das cascas dessa espécie pode fornecer quantidades razoáveis desses compostos para o organismo, podendo estar associados aos diversos usos farmacológicos nas comunidades Amazonenses. A tabela 8 ilustra a quantificação dos compostos encontrados em cada fração da espécie *Connarus perrottetii*.

Tabela 8: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Connarus perrottetii* var *angustifolius*

Compostos quantificados	Teor em g.kg ⁻¹ de planta			
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato	Fração Butanólica
Ácido Gálico	2,580	0,557	1,867	0,426
Catequina	3,260	0,294	2,388	0,349
Ácido Cafeico	nd	nd	0,031	0,239

*nd = não detectado pelo método.

A infusão das cascas da *Connarus* corresponde a massa total da planta sendo que as frações são extratos mais concentrados e podem oferecer um maior interesse para a indústria farmacêutica em relação a planta enquanto matéria bruta. Por exemplo, levando em consideração o teor quantificado no extrato e na planta total, a concentração de Catequina é aproximadamente 28 vezes mais concentrada em 1000 gramas da fração acetato do que em 1000 gramas das cascas da planta.

Dessa forma, a maceração a frio das cascas dessa espécie com etanol 70% e posterior fracionamento com solventes como acetato de etila, pode concentrar as espécies antioxidantes presentes na planta tornando o extrato um produto rico em espécies bioativas.

Dentre as espécies em estudo nesse trabalho, a espécie *Mansoa alliacea* apresenta propriedades bastante semelhantes ao alho (*Allium sativum*) possuindo compostos organossulfurados que contribuem para o aroma característico (ZOGHBI *et al.*, 2009). No entanto, sua composição química quanto a presença de ácidos fenólicos e flavonóides ainda é bastante restrita na literatura.

Os extratos dessa espécie foram caracterizados sendo possível a identificação e quantificação dos compostos Ácido Ferulico, Ácido ρ – coumárico e Resveratrol. No entanto, não foram detectados nenhum dos compostos fenólicos em estudo nas frações etanólica e butanólica dessa planta. O perfil cromatográfico da fração acetato de etila é mostrado na figura 24.

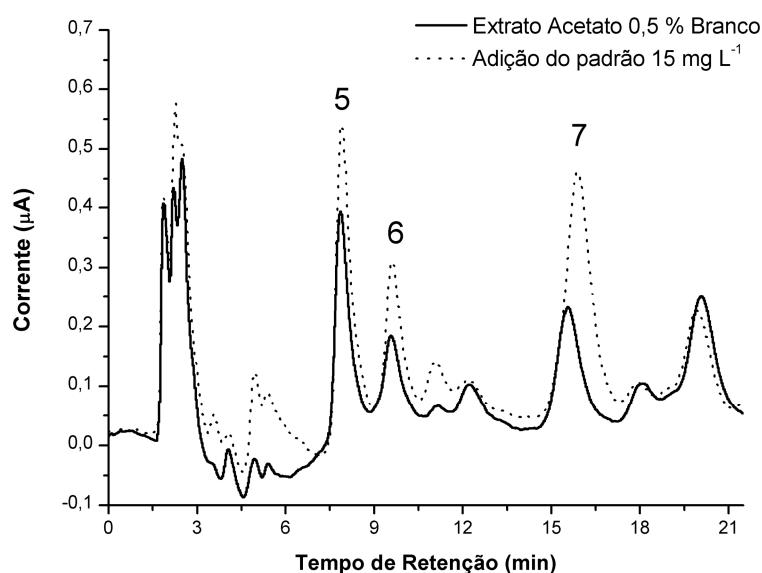


Figura 24: Identificação dos compostos Ácido p – coumárico (5), Ácido Ferulico (6) e Resveratrol (7) no extrato acetato (0,5 %) da espécie *Mansoa alliacea* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Os compostos Ácido Ferulico e Ácido p – coumárico foram quantificados em maiores quantidades na infusão da matéria seca da planta. A infusão das folhas dessa espécie tem sido relatada para o uso contra febres, resfriados e também como analgésica contra dores de cabeça (ZOGHBI *et al.*, 2009). No entanto, essas propriedades não podem ser atribuídas exclusivamente aos compostos quantificados por esse método uma vez que a espécie possui outras classes como os organossulfurados, na sua composição química.

Além disso, como se pode observar no cromatograma da figura 24, outros compostos, além dos de abrangência nesse estudo, foram detectados na fração acetato sendo necessário um estudo com outras classes de compostos para a melhor compreensão da composição química da espécie *Mansoa alliacea*. Por ora, os compostos Ácido Ferulico, Ácido p – coumárico e Resveratrol foram quantificados e os valores são mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Mansoa alliacea*.

Compostos quantificados	Teor em g.kg^{-1} de planta		
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato
			Fração Butanólica

Ácido p - coumárico	0,679	nd	0,0324	nd
Ácido Ferúlico	1,302	nd	0,023	nd
Resveratrol	nd	nd	0,019	nd

*nd = não detectado pelo método.

As espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia e América Central e do Sul. No Brasil, as plantas desse gênero são utilizadas em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades como, infecções, processos dolorosos e diabetes (SILVA *et al.*, 2002).

Em algumas espécies já foram identificados alguns dos compostos de abrangência desse estudo como, rutina e quercetina, sendo o efeito hipoglicemiante das espécies relacionados, pelo menos parcialmente, a presença desses compostos (FILHO *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2002). As espécies brasileiras *Bauhinia variegata* e *Bauhinia var alboflava* são utilizadas popularmente por apresentarem as propriedades acima citadas, no entanto não possuem um acervo de informações quanto a presença de ácidos fenólicos e flavonóides quando comparada à outras espécies desse gênero.

Através da caracterização dos extratos da espécie *Bauhinia variegata* foi possível identificar e quantificar os compostos Ácido Gálico, Catequina, Ácido Clorogênico, Ácido Cafeico, Ácido Ferulico, Ácido ρ - coumárico, Rutina e Quercetina. O cromatograma da figuras 25 ilustra o perfil cromatográfico da fração acetato de etila na concentração de 0,3%.

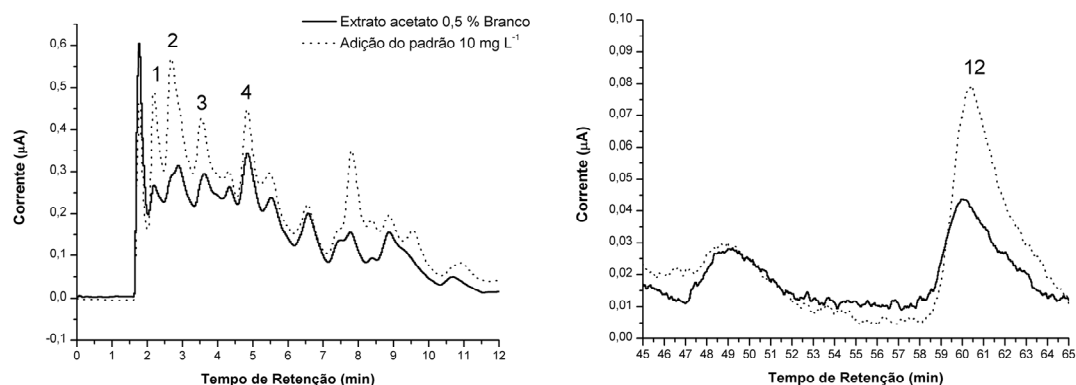


Figura 25: Identificação dos compostos Ácido Gálico (1), Catequina (2), Ácido Clorogênico (3), Ácido Cafeico (4), Ácido p – coumárico (5), e Quercetina (12) no extrato acetato (0,3%) da espécie *Bauhinia variegata* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Como se pode observar na figura 25, o composto Quercetina foi identificado e quantificado apenas na fração acetato. Tendo em vista que se trata de um composto apolar, quando comparado aos outros compostos em estudo, é esperado obter maiores teores na fração mais apolar. A quantificação dos compostos fenólicos na espécie *Bauhinia variegata* é mostrada na tabela 10.

Tabela 10: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Bauhinia variegata*.

Compostos quantificados	Teor em g.kg ⁻¹ de planta			
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato	Fração Butanólica
Ácido Gálico	nd	nd	0,087	0,080
Catequina	nd	nd	0,065	nd
Ácido Clorogênico	nd	0,136	0,295	nd
Ácido Cafeico	nd	nd	0,358	0,037
Ácido p - coumárico	nd	nd	0,167	0,013
Ácido Ferúlico	0,776	nd	nd	0,012
Rutina	0,520	nd	nd	nd
Quercetina	nd	nd	0,570	nd

* nd = não detectado pelo método.

Os compostos quantificados na infusão das folhas da espécie *Bauhinia variegata* representam aproximadamente 0,13% (m/m) ($1,296 \text{ g.Kg}^{-1}$ de planta) da massa bruta da planta da mesma forma a fração acetato de etila ($1,542 \text{ g.Kg}^{-1}$ de planta) representa aproximadamente 0,15% (m/m). No entanto, quando pensamos em termos de extrato concentrado, a fração acetato apresenta 20 g.Kg^{-1} de compostos fenólicos no extrato, ou seja, aproximadamente 15 vezes mais compostos antioxidantes quando comparado a planta enquanto matéria bruta. Dessa forma, a fração acetato dessa espécie representa uma possível ferramenta de estudo para a indústria farmacêutica no que se diz respeito ao tratamento da diabetes, uma vez que esses compostos foram relacionados com os efeitos hipoglicemiantes de outras espécies do gênero *Bauhinia*.

Da mesma forma, a espécie *Bauhinia variegata* var *alboflava* foi caracterizada pelo método cromatográfico desenvolvido e demonstrou a presença dos compostos Ácido Clorogênico, Ácido Cafeico, Rutina e Quercitrina. Diferentemente da espécie *Bauhinia variegata*, na fração acetato da *Bauhinia alboflava* foi possível identificar apenas o composto Quercitrina e em baixa concentração. A figura 26 mostra o perfil cromatográfico da infusão na concentração de 0,5% dessa espécie.

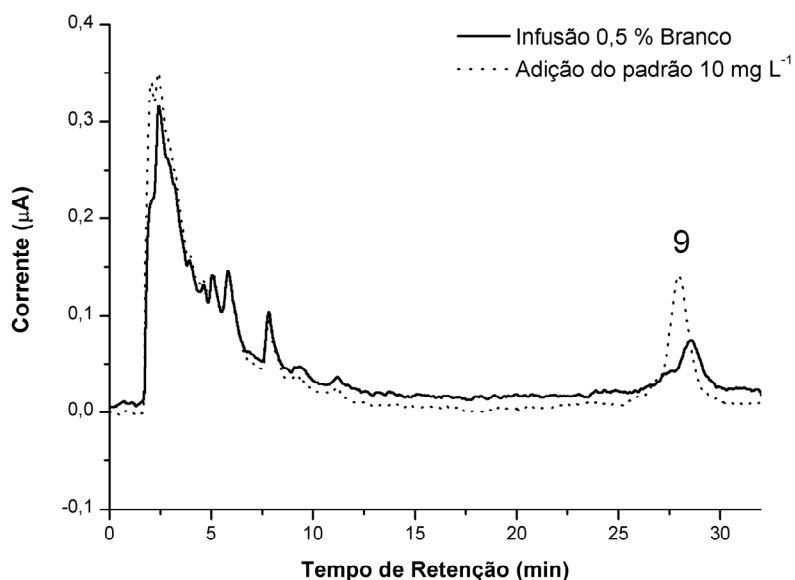


Figura 26: Identificação do composto Rutina (9) na infusão (0,5%) da espécie *Bauhinia variegata* var *alboflava* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Espécies pertencentes ao mesmo gênero não necessariamente apresentam os mesmos compostos na sua constituição. Dessa forma, a espécie *Bauhinia alboflava* possui um menor teor de compostos fenólicos quando comparada a espécie *Bauhinia variegata*, no entanto não significa que essa espécie possua um menor potencial farmacológico uma vez que outras classes de compostos podem estar presentes nos extratos dessa espécie.

Os compostos quantificados são listados na tabela 11.

Tabela 11: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Bauhinia variegata* var *alboflava*.

Compostos quantificados	Teor em g.kg ⁻¹ de planta			
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato	Fração Butanólica
Ácido Clorogênico	nd	nd	nd	0,150
Ácido Cafeico	nd	0,224	nd	0,142
Rutina	1,059	nd	nd	nd
Quercitrina	nd	0,232	0,057	nd

*nd = não detectado pelo método.

O composto Rutina foi quantificado apenas na infusão das folhas dessa espécie e foi responsável por 56,8 % do teor total de compostos quantificados na planta pelo método proposto. Além disso, se 100 mL da infusão das folhas dessa planta na concentração de 10% forem consumidos, 10,6 mg de rutina possivelmente serão fornecidos ou seja, o chá das folhas dessa espécie possivelmente apresentará alguma das propriedades relacionadas a atividade antioxidante dos compostos fenólicos.

As plantas do gênero *Cecropia* são mais conhecidas na literatura e possuem mais informações no que diz respeito a constituição química dos extratos de algumas espécies. No entanto, as espécies *Cecropia palmata* e *Cecropia obtusa* apesar de serem amplamente consumidas na Amazônia para os mais diversos fins terapêuticos, não apresentaram, até o devido momento, uma caracterização dos seus extratos quanto a presença de ácidos fenólicos e flavonóides.

Com a aplicação do método de HPLC – PAD desenvolvido foi possível identificar e quantificar diversos compostos nos extratos das espécies *C.palmata* e *C.obtusa* dentre eles ácidos fenólicos, catequina e flavonóides como rutina, resveratrol e quercetina.

O cromatograma da figura 27 apresenta o perfil cromatográfico obtido para o extrato acetato de etila na concentração de 0,3% da espécie *Cecropia palmata*.

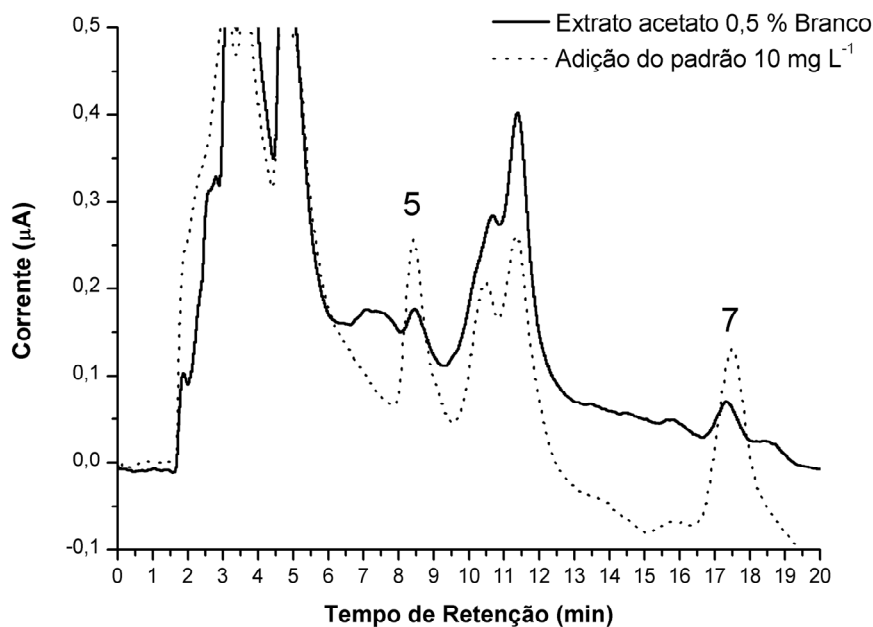


Figura 27: Identificação dos compostos Ácido p – coumárico (5) e Resveratrol (7) no extrato acetato (0,3%) da espécie *Cecropia palmata* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Foi possível identificar e quantificar compostos fenólicos em todas as frações da espécie contudo, a infusão foi o método que conseguiu extrair mais compostos antioxidantes das folhas da planta. Além disso, em relação a planta total, a infusão extraiu o maior teor quantificado de componentes fenólicos ($2,708 \text{ g.Kg}^{-1}$), conforme observa-se na tabela 12.

Tabela 12: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Cecropia palmata*.

Compostos quantificados	Teor em g.kg^{-1} de planta		
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato
			Fração Butanólica

Catequina	0,002	nd	nd	nd
Ácido Clorogênico	1,752	0,100	nd	0,768
Ácido Cafeico	0,184	0,143	nd	0,431
Ácido p - coumárico	0,031	nd	0,012	nd
Ácido Ferúlico	0,739	nd	nd	nd
Resveratrol	nd	nd	0,005	0,101
Rutina	nd	0,355	nd	0,625

* nd = não detectado pelo método.

A presença de ácido clorogênico em espécies do gênero *Cecropia* tem sido relatada na literatura e os teores compreendem valores em torno de $0,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ nos extratos aquosos dessas espécies (TOLEDO *et al.*, 2008). No entanto, o extrato aquoso da espécie *Cecropia palmata* demonstrou teores maiores quando comparada as outras espécies do mesmo gênero ($1,752 \text{ g.Kg}^{-1}$). A fração butanólica também apresentou esse composto sendo que em termos de extrato concentrado o teor quantificado compreende em $2,877 \text{ g.Kg}^{-1}$ de ácido clorogênico no extrato.

Da mesma forma, a espécie *Cecropia obtusa* também demonstrou a presença de ácido clorogênico sendo este composto o único quantificado nas infusões dessa espécie pelo método cromatográfico desenvolvido. O cromatograma da figura 28 ilustra o *screening* da fração acetato dessa espécie.

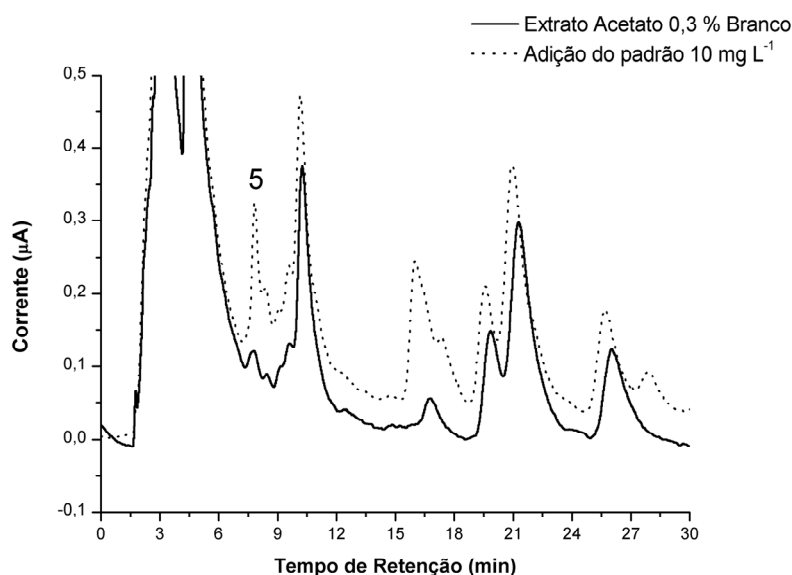


Figura 28: Identificação de Ácido p-coumárico (5) no extrato acetato (0,3%) da espécie *Cecropia obtusa* pelo método cromatográfico HPLC – PAD.

Não foi possível identificar nenhum dos compostos em estudo na fração butanólica da espécie *Cecropia obtusa*. Além disso, o Ácido Clorogênico demonstrou ser o composto majoritário dentre as frações estudadas dessa espécie.

A tabela 13 apresenta os compostos fenólicos quantificados na espécie *Cecropia obtusa*.

Tabela 13: Compostos fenólicos quantificados nas frações da espécie *Cecropia obtusa*.

Compostos quantificados	Teor em g.kg ⁻¹ de planta			
	Infusão	Fração Etanólica	Fração Acetato	Fração Butanólica
Ácido Clorogênico	1,285	nd	nd	nd
Ácido p - coumárico	nd	nd	0,023	nd
Resveratrol	nd	0,110	nd	nd

*nd = não detectado pelo método.

As plantas medicinais da Amazônia, no âmbito desse trabalho, apresentaram um ou mais compostos fenólicos compreendendo ácidos fenólicos e flavonóides na

constituição química de seus extratos. Os compostos fenólicos quantificados nas plantas medicinais em estudo são conhecidos por diversas propriedades farmacológicas sendo essas, associadas a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, a avaliação da atividade antioxidante dessas espécies frente à espécies radicalares derivadas de oxigênio também foi efetuada para a possível comprovação das propriedades atribuídas à essas plantas.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das espécies de plantas medicinais frente às espécies reativas de oxigênio

Em um primeiro momento, as espécies de plantas foram submetidas ao método de sequestro do radical DPPH. Esse método é bastante utilizado na literatura para mensurar a atividade antioxidante de plantas medicinais (KRISHNAIAH *et al.*, 2011). Dentre as espécies estudadas, todas apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH uma vez que 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. Sendo assim, era esperado que os extratos das plantas demonstrassem alguma atividade antioxidante frente a esse radical.

As infusões das plantas na concentração de 10% variaram a atividade antioxidante entre $97,49 \pm 4,86$ % a $41,48 \pm 2,17$ % sendo a maior atividade atribuída à espécie *Cecropia palmata* e a menor atividade à espécie *Bauhinia variegata* var *alboflava*. Além disso, a infusão da espécie *Cecropia palmata* apresentou o maior número de compostos fenólicos identificados pelo método de HPLC – PAD, podendo essa atividade estar associado ao efeito combinado dessas espécies para sequestrar o radical DPPH.

Ademais, a atividade antioxidante da infusão da espécie *Cecropia palmata* pode ser atribuída também aos teores de ácido clorogênico, uma vez que a espécie *Cecropia obtusa* também apresentou esse composto na infusão e foi responsável pela segunda maior atividade antioxidante *in vitro* observada (70,89 %). Não obstante, o ácido clorogênico demonstrou ser o principal responsável pela atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical DPPH para espécies de plantas chinesas as quais apresentam esse composto como componente majoritário (LAN, 2007).

Dentre as frações das seis plantas em estudo, todas apresentaram uma boa atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical DPPH e os valores calculados variaram de $99,41 \pm 0,16$ % a $35,24 \pm 4,86$ % para as frações etanólicas das espécies *B.variegata* e *C.perrottettii*, respectivamente. O gráfico de barras da figura 29 ilustra uma visão geral da atividade antiradicalar das espécies frente ao radical DPPH.

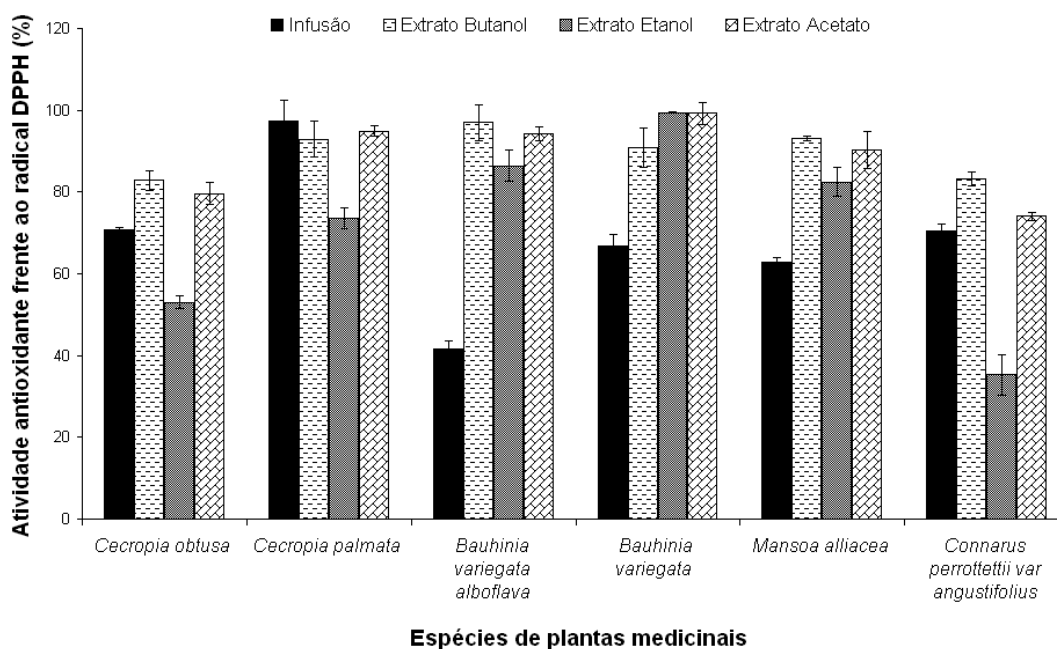


Figura 29: Atividade antioxidante *in vitro* das espécies de plantas medicinais frente ao radical DPPH.

Frente às espécies reativas de oxigênio, as plantas não apresentaram a mesma atividade uma vez que os radicais hidroxil, peróxil e superóxido apresentam reatividades e potenciais de redução distintos entre si, o que torna a reação com os compostos antioxidantes bastante relativa tendo em vista que também depende das características reacionais dos compostos. Além disso, os extratos das plantas medicinais são complexos e podem envolver efeitos de sinergismo e antagonismo dos componentes fenólicos em estudo com outras classes de compostos.

As infusões das plantas medicinais na concentração de 10% apresentaram atividade antioxidante *in vitro* frente a todas as espécies reativas de oxigênio conforme mostrado na tabela 14.

Tabela 14: Atividade antioxidante das infusões plantas medicinais na concentração de 10% frente às ERO.

Plantas Mediciniais	Atividade Antioxidante (%)		
	Radical Superóxido	Radical Hidroxil	Radical Peroxil
<i>Cecropia obtusa</i>	29,79 ± 0,66	88,23 ± 2,62	54,96 ± 9,74
<i>Cecropia palmata</i>	58,27 ± 3,64	66,67 ± 5,62	28,55 ± 1,97
<i>Bauhinia variegata var alboflava</i>	62,46 ± 2,65	90,57 ± 4,87	86,06 ± 1,42
<i>Bauhinia variegata</i>	69,87 ± 2,32	34,21 ± 2,16	46,36 ± 9,67
<i>Mansoa alliacea</i>	56,94 ± 1,83	85,68 ± 5,39	25,82 ± 3,73
<i>Conarus perrottettii var angustifolius</i>	76,50 ± 0,46	84,70 ± 1,30	35,09 ± 1,02

A espécie *C.perrottettii* apresentou a maior atividade antioxidante *in vitro* calculada ($76,50 \pm 0,46$ %) frente ao radical superóxido podendo essa atividade antioxidante estar relacionada ao teor de Ácido Gálico e Catequina quantificados pelo método HPLC – PAD na infusão dessa espécie. Tendo em vista que o radical superóxido é a espécie mais polar dentre os radicais em estudo, a atividade antioxidante dessa planta pode estar associada à polaridade dos compostos presentes na infusão, o que poderia favorecer o mecanismo reacional com o radical quando comparado as infusões das outras espécies que apresentaram compostos menos polares na sua constituição química.

Na avaliação da atividade antiradicalar contra o radical hidroxil, a espécie *Bauhinia variegata var alboflava* apresentou a maior atividade antioxidante *in vitro* calculada ($90,57 \pm 4,87$). Essa atividade antioxidante pode estar relacionada à presença do flavonóide rutina quantificado na concentração de $1,056 \text{ g.Kg}^{-1}$ da planta sendo esse composto responsável por 56,8 % do teor total de compostos quantificados nessa espécie. Estudos com o padrão de rutina demonstram que esse composto possui a maior atividade antioxidante frente ao radical hidroxil gerado pela fotólise do peróxido de hidrogênio, quando comparado a outros compostos como, Ácido Cafeico, Quercetina, Ácido Ferulico e Resveratrol (CARVALHO *et al.*, 2013 (b)).

No entanto, a espécie *Bauhinia variegata* apresentou a menor atividade antioxidante ($34,21 \pm 2,16$) mesmo possuindo rutina na sua constituição. Isso pode ser explicado por um possível efeito antagônico junto a Rutina dos compostos Ácido Cafeico e Ácido Ferulico presentes na infusão da *Bauhinia variegata* ou também à presença de outras classes de compostos desconhecidos pelo presente trabalho.

Da mesma forma, a infusão da espécie *Bauhinia alboflava* apresentou a maior atividade antioxidante frente ao radical peróxil ($86,06 \pm 1,42$).

As frações das plantas medicinais foram avaliadas da mesma forma que as infusões sendo que, frente ao radical superóxido a fração acetato da espécie *Mansoa alliacea* demonstrou a maior atividade antioxidante *in vitro* ($70,85 \pm 4,06$ %) seguida da fração acetato da espécie *Bauhinia variegata* var *alboflava* ($65,57 \pm 7,05$ %) conforme demonstra o gráfico de barras da figura 30.

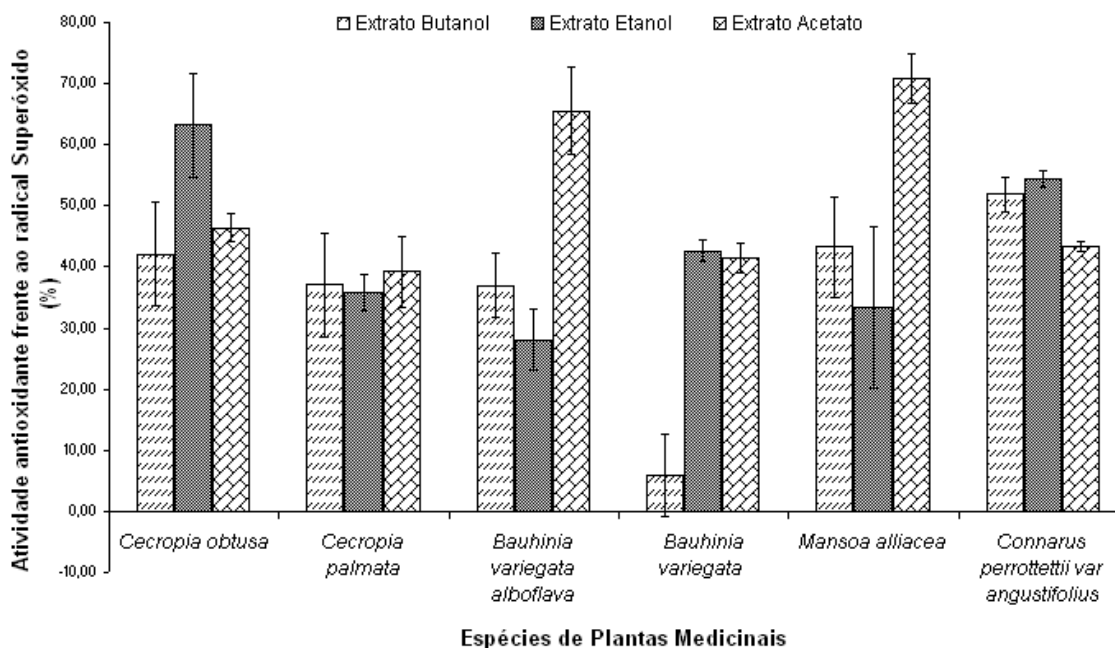


Figura 30: Atividade antioxidante *in vitro* das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical superóxido.

Apesar dos extratos dessas espécies possuírem uma alta atividade antioxidante frente ao radical superóxido, demonstraram baixas concentrações dos compostos fenólicos quantificados pelo método HPLC – PAD. Dessa forma, a atividade antioxidante dessas frações pode estar associada à combinação dos compostos identificados com outras classes que podem vir a estarem presentes.

Além disso, a espécie *Mansoa alliacea* possui compostos organossulfurados na sua constituição o que também pode vir contribuir para a maior atividade antioxidante dessa espécie frente a esse radical.

Na avaliação da atividade antioxidante frente ao radical peroxil, as maiores atividades antioxidantes *in vitro* foram observadas nas frações acetato das espécies *Cecropia palmata* e *Conarus perrottetii* ($95,33 \pm 0,95 \%$ e $92,07 \pm 0,36 \%$, respectivamente).

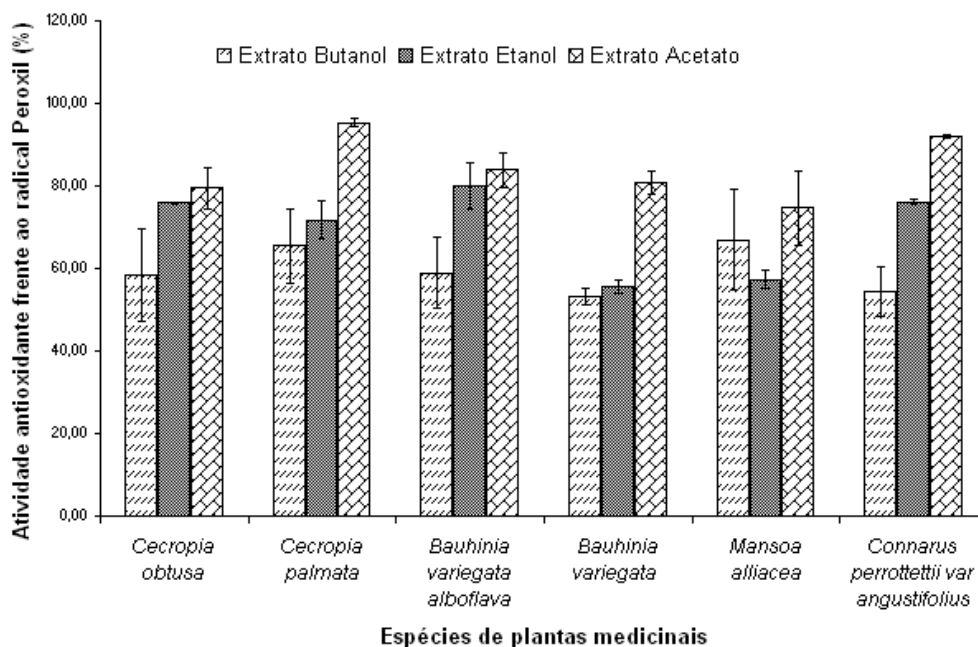


Figura 31: Atividade antioxidante *in vitro* das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical peroxil.

Como pode se observar na figura 31, as frações acetato de todas as espécies em estudo apresentaram maiores atividades antioxidantes frente às outras frações. Possivelmente, por se tratar de um radical menos polar, os compostos menos polares extraídos pela fração acetato foram favorecidos na reação com o radical peroxil.

Além disso, essa atividade antioxidante pode ser atribuída também aos compostos fenólicos identificados e quantificados pelo método HPLC – PAD uma vez que as frações acetato de todas as espécies de plantas medicinais apresentaram pelo menos um dos compostos em estudo. Ainda, esses compostos podem sofrer efeitos de sinergismo com outras classes também presentes nessas frações fornecendo uma maior atividade antioxidante frente a esse radical.

Já a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil foi avaliada através de dois ensaios com diferentes substratos oxidáveis pelo radical. Uma vez que esse radical é o mais lesivo ao organismo e não existe um sistema antioxidante endógeno para combatê-lo, torna-se interessante buscar fontes naturais que possam sequestrá-lo.

A figura 32 apresenta o gráfico em barras para a atividade antioxidante das espécies frente ao radical hidroxil pelo método da deoxirribose.

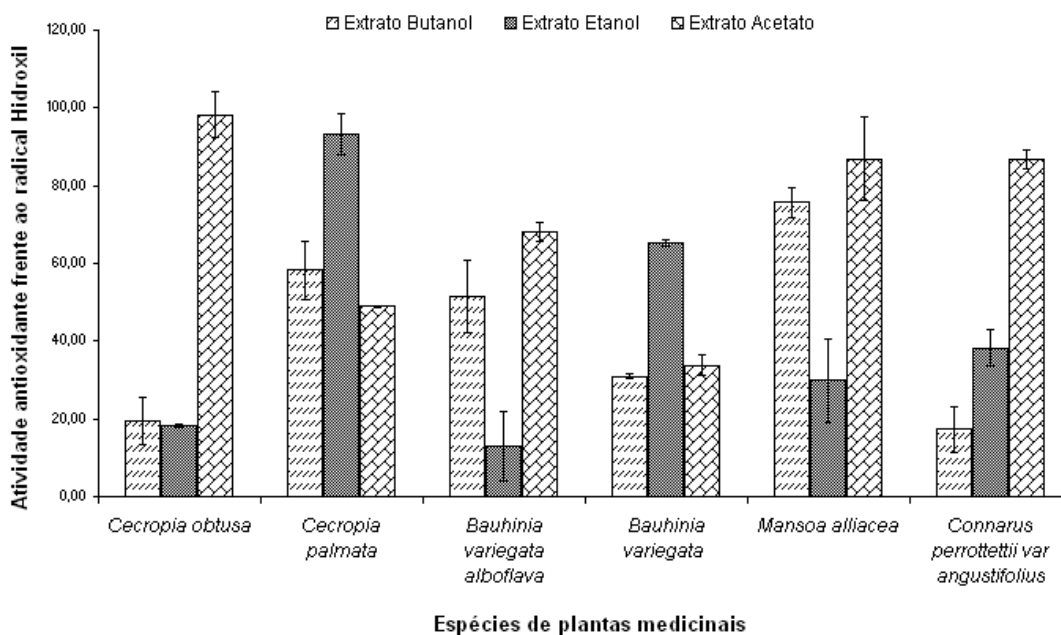


Figura 32: Atividade antioxidante *in vitro* das frações das espécies de plantas medicinais frente ao radical hidroxil.

Todas as frações das espécies de plantas medicinais da Amazônia apresentaram atividade antioxidante *in vitro* frente ao radical hidroxil.

Como se pode observar para a espécie *Cecropia obtusa* a fração acetato apresentou atividade antioxidante maior ($98,19 \pm 5,93$) quando comparada às outras frações da mesma espécie e também em comparação às outras plantas em estudo. Tendo em vista os compostos fenólicos quantificados nas frações etanol, butanol e acetato dessa espécie, a última apresentou cerca de 70 % dos compostos totais quantificados pelo método HPLC – DAD. Isso pode estar associado à maior atividade antioxidante observada em relação as frações etanólicas e butanólicas da *Cecropia obtusa*.

No entanto, o radical hidroxil é extremamente reativo e devido ao tempo de meia vida muito pequeno é difícil de ser sequestrado até mesmo *in vitro*, dessa forma não se pode pontuar a atividade antioxidante das frações a presença de apenas um ou dois compostos antioxidantes. A concentração, estrutura molecular e a complexidade do extrato devem ser levadas em consideração.

Utilizando a formação de monocamadas auto-organizadas adsorvidas sobre a superfície de um eletrodo de ouro foi possível observar a inibição do dano oxidativo causado pelo radical hidroxil à monocamada pelas infusões das plantas em estudo.

O método foi realizado em três diferentes concentrações dos extratos a fim de observar o comportamento da atividade antioxidante das espécies com o aumento da concentração. Além disso, essa metodologia, assim como algumas já estudadas nesse trabalho, avaliou a atividade antioxidante dos extratos de forma indireta e não possibilitou a avaliação das frações com solventes orgânicos devido à alta adsorção causada na superfície do eletrodo dificultando as medidas da corrente.

A monocamada de enxofre adsorvida à superfície do eletrodo possui uma cauda lipofílica a qual sofre o ataque dos radicais hidroxila formados pela reação de Fenton. Esse dano causado a monocamada mimetiza o ataque dos radicais hidroxil a membrana fosfolipídica das células. Uma vez que os antioxidantes presentes nos extratos das plantas medicinais sejam capazes de minimizar o dano causado pelos radicais à membrana, essas plantas tornam-se uma fonte importante para estudos *in vivo*.

Inicialmente fez-se a leitura do complexo de rutênio sem a imobilização da monocamada à superfície do eletrodo conforme mostrado na figura 33 (a). Após o período de exposição do eletrodo a solução de hexanotiol 20% em etanol foi possível observar a ausência do sinal eletroquímico do complexo de rutênio (figura 33 (b)). Quando radicais hidroxilas foram gerados no meio sem a presença de espécies antioxidantes, ocorreu a degradação da monocamada e a superfície do eletrodo foi regenerada fornecendo novamente o sinal eletroquímico do complexo (figura 33 (c)).

A imobilização da monocamada de hexanotiol na superfície do eletrodo fez com que a solução estivesse em contato com a parte apolar da molécula. Na presença do extrato aquoso das plantas medicinais o dano oxidativo à monocamada foi minimizado devido ao sequestro dos radicais hidroxila pelos compostos antioxidantes presentes nos extratos, portanto uma menor corrente do complexo de

rutênio foi observada uma vez que a monocamada sofreu um menor dano (figura 33(d)).

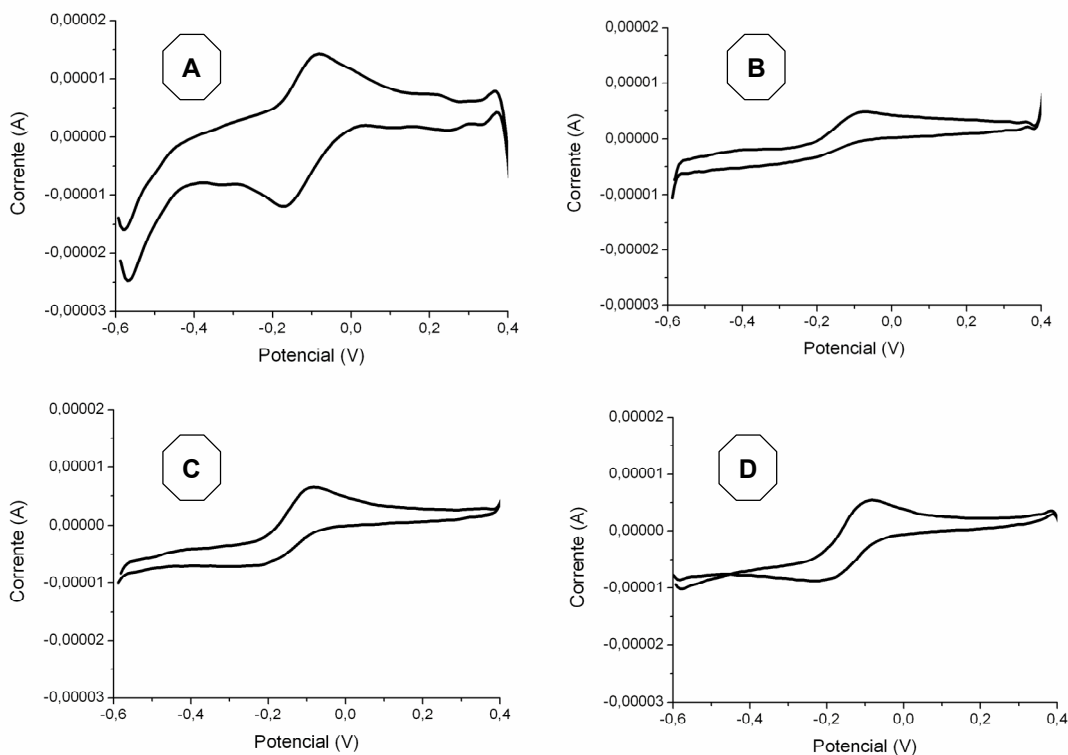


Figura 33: Voltamograma cíclico do complexo de Rutênio obtido através da varredura de potenciais na faixa de -0,6 a +0,4 V. Velocidade de varredura: $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Eletrodo de referência: Ag/AgCl. Contra eletrodo: Platina. (A) Antes do eletrodo ser recoberto; (B) Eletrodo recoberto com a monocamada - Ausência do sinal eletroquímico; (C) Regeneração do sinal eletroquímico do complexo de Rutênio após ataque radicalar; (D) Inibição do dano causado a monocamada pelo extrato de *Cecropia obtusa* na concentração de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A corrente do complexo de rutênio é menor quando a espécie de planta está presente, portanto a diferença da corrente na presença e na ausência do extrato forneceu a atividade antioxidante das espécies. A tabela 15 ilustra as atividades antioxidantes encontradas para as infusões de cada uma das espécies nas diferentes concentrações sendo a *Conarus perrottetii var angustifolius* a espécie que proporcionou a maior atividade antioxidante na concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (94,02%).

Tabela 15: Atividade antioxidante das infusões das plantas medicinais frente ao radical hidroxil utilizando uma monocamada auto-organizada adsorvida no eletrodo de ouro.

Espécie de Planta	Concentração (g.L ⁻¹)	AA%
<i>Cecropia palmata</i>	0,2	5,08
	0,5	46,79
	1,0	70,70
<i>Cecropia obtusa</i>	0,2	39,47
	0,5	52,32
	1,0	68,64
<i>Mansoa alliacea</i>	0,2	9,76
	0,5	66,89
	1,0	89,06
<i>Bauhinia variegata</i>	0,2	19,28
	0,5	27,85
	1,0	30,28
<i>Bauhinia variegata</i> var <i>alboflava</i>	0,2	21,43
	0,5	38,50
	1,0	67,18
<i>Connarus perrotettii</i> var <i>angustifolius</i>	0,2	-11,45
	0,5	45,95
	1,0	94,02

A infusão dessa espécie apresentou o maior teor de compostos fenólicos quantificados (5,84 g.Kg⁻¹) em relação às infusões das outras plantas medicinais. Dessa forma, a alta minimização do dano oxidativo ocasionada pela espécie *C.perrotettii* pode estar associada a alta concentração de compostos fenólicos antioxidantes presente em 1 grama das cascas dessa planta.

Da mesma forma, na concentração de 0,2 g.L⁻¹ a mesma espécie proporcionou uma atividade prooxidante, ou seja, o dano ocasionado pelos radicais hidroxil à membrana foi aumentado quando os compostos antioxidantes da planta estavam em uma baixa concentração.

A espécie *B. alboflava* apresentou a menor atividade antioxidante frente ao radical hidroxil na concentração de 1 g.L⁻¹ de infusão. Em coerência, foi a espécie que apresentou o menor teor de compostos fenólicos quantificados pelo método HPLC – PAD (1,059 g.Kg⁻¹) nas infusões das plantas medicinais em estudo.

Além disso, foi possível observar que com o aumento da concentração da infusão das plantas uma maior atividade antioxidante frente aos radicais hidroxilas foi observada uma vez que mais compostos antioxidantes estavam presentes para evitar o dano oxidativo dos radicais à monocamada auto-organizada de enxofre.

5 CONCLUSÃO

Os compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonóides, são conhecidos pela suas propriedades antioxidantes e por estarem amplamente presentes no reino vegetal. Dessa forma, o presente trabalho apresentou um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector pulso amperométrico para a identificação e quantificação dos compostos Ácido Gálico, Catequina, Ácido Clorogênico, Ácido Cafeico, Ácido p – coumárico, Ácido Ferúlico, Resveratrol, 4 – hidroxycumarina, Rutina, Miricetina, Quercitrina e Quercetina em espécies de plantas medicinais.

A fase móvel desenvolvida permitiu a separação dos 12 compostos em estudo através de uma eluição isocrática constituída de Metanol 30%, fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, β – Ciclodextrina 1 mmol.L⁻¹, pH 2,00 e fluxo de 1 mL.min⁻¹. Além disso, o uso do aditivo β - Ciclodextrina permitiu uma maior resolução do cromatograma e um tempo de análise de 70 minutos. A separação cromatográfica foi otimizada sob temperatura de 25 °C e utilizando a aplicação de + 0,7 V de potencial no eletrodo de trabalho para a detecção.

A metodologia analítica foi validada e mostrou-se seletiva e robusta para a análise dos compostos fenólicos em estudo. O método apresentou baixos limites de detecção e quantificação tornando-se uma alternativa sensível para a análise de ácidos fenólicos e flavonóides em plantas medicinais quando comparado a métodos que utilizam arranjo de diodos como detector. Além do mais, os resultados de precisão e exatidão do método ficaram dentro do previsto pela ANVISA para ensaios analíticos e permitiram a caracterização dos extratos das plantas medicinais.

Os extratos das espécies *Conarus perrotettii* var *angustifolius*, *Mansoa alliacea*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa*, *Bauhinia variegata* e *Bauhinia alboflava* foram caracterizadas pelo método HPLC – PAD desenvolvido. Todos os extratos demonstraram a presença de pelo menos um dos compostos fenólicos em estudo com exceção das frações etanólica e butanólica da espécie *Mansoa alliacea* e da fração butanólica da espécie *Cecropia obtusa* que não apresentaram nenhum dos 12 compostos.

Além disso, a maceração a frio da matéria seca das plantas com posterior fracionamento com solvente orgânico concentrou em até 13 vezes mais o teor de

compostos fenólicos quando comparado a massa bruta de planta medicinal, como o observado para a espécie *Bauhinia variegata*. Dessa forma, o extrato concentrado dessas espécies pode se tornar uma fonte de compostos bioativos à indústria farmacêutica no que se diz respeito a busca de produtos naturais para fins terapêuticos e medicamentosos.

Todas as seis espécies de plantas estudadas nesse trabalho apresentaram alguma atividade antioxidante frente às metodologias *in vitro* que foram aplicadas. Essa atividade antioxidante observada para as espécies de plantas medicinais pode estar associada em partes aos teores de ácidos fenólicos e flavonóides quantificados nos extratos. Além disso, o fato de uma espécie possuir maior ou menor atividade antioxidante frente a um radical não significa necessariamente que esse resultado se manterá frente a outros radicais, pois isso depende do meio reacional em que o extrato está exposto, do radical que está sendo gerado e dos efeitos de sinergismo e antagonismo de outras classes presentes nos extratos. Uma vez que a produção excessiva de radicais livres esteja associada ao envelhecimento e o desenvolvimento de doenças degenerativas, o uso de plantas medicinais pode vir a ser uma prevenção natural ao longo do ciclo da vida, tendo em vista que o dano oxidativo é acumulativo no organismo.

Ainda assim, o estudo da atividade antioxidante *in vitro* dessas espécies aliada a caracterização química dos seus extratos compreende uma importante chave para possíveis estudos *in vivo*. Ademais, os compostos identificados e quantificados nos extratos dessas espécies apresentam propriedades farmacológicas comprovadas e podem estar associados ao uso popular dessas plantas medicinais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJILA, C.M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-249, 2011.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; 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.

ANGELO, P.M.; JORGE, N.; Compostos Fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDE, E.; Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p. 183-198, 2002.

ARJUNAN, V., SAKILADEVI, S., MARCHEWKA, M. K., MOHAN, S.; FTIR, FT-Raman, FT-NMR and quantum chemical investigation of 3 – acetyl coumarin. **Spectrochimica acta part A: Molecular and Biomolecular spectroscopy**, v. 109, p. 79-89, 2013

BABIOR, M. B.; Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997

BAE, G.U.; SEO, D.W.; KWON, H.K.; Hydrogen Peroxide Activates p70^{S6k} Signalin Pathway. **J. Biol. Chem**, v. 274, n. 46, p. 32596-32602, 1999.

BIANCO, E.M., SANTOS, C.A.M.; Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 n.2, p. 93-99, 2003.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução 899 de 2003**. Guia para validação de métodos Analíticos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/> Acesso em setembro 2013.

BRAVO, L.; Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARVALHO, L.M., VIANA, C., MOREIRA, A.P.L., Pulsed amperometric detection (PAD) of diuretic drugs in herbal formulations using a gold electrode following ion-pair chromatographic separation. **J Solid State Electrochemi**, v. 17, p 1601-1608, 2013.

CARVALHO, L. M., MONSERRAT, J. M., SCHOLZ, F., Substrate-free determination of the radical scavenging activity of phenolic compounds by photochemical generation of hydroxyl radicals and HPLC-UV detection. **Separation Science and Technology**, v. 48, p. 1123-1131, 2013.

CASELLA, I.G.; COLONNA, C.; CONTURSI, M.; Electroanalytical Determination of some phenolic acids by high-performance liquid chromatography at gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 19, n. 14, p. 1503-1508, 2007.

CLAUDE, B., MORIN, Ph., LAFOSSE, M., ANDRE, P., Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized B – and Y – cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 37-42, 2004.

COSTA, G. M., ORTMANN, C.F., SCHENKEL, E. P., REGINATTO, F.H., An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* species. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.6, p. 1096-1102, 2011.

FERREIRA, C.; Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n.1, p. 159-175, 2009.

FILHO, C., BREVIGLIERI, E., A FILHO, W., Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 76, n.4, p. 115-117, 1995.

FREIRE, R.S., PESSOA, C.A., KUBOTA, L.T., Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim Nova**, v. 26, n.3, p. 381 – 389, 2003.

GOTTI, R.; Capillary Electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 775-801, 2011.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 4ª edição, Nova York, 2007.

HILGMANN, M., SCHOLZ, F., KAHLERT, H.; Electrochemical Assay to quantify hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts. **Electroanalysis**, v. 22, n. 4, p. 406-412, 2010.

HILGMANN, M., Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* contra radicais peróxido e hidroxila em amostras de plantas medicinais. **Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Química**, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2010.

HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B.; Dietary flavonoids: intake, healthy effects and bioavailability. **Food Chem toxicol**, v. 37, n.9, p. 937-942, 1999.

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

LAMEIRA, O. A.; PAIVA, J. S.; OLIVEIRA, E. C. P.; Fenologia e Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais de Ocorrência na Amazônia. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, 2004.

LAN, W., Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of *Flos Lonicerae* extracts. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n.9, p. 673-679, 2007.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *cecropia glaziovii* snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante, **Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2005.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, V. F., Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 429 – 438, 2002.

MELO, J.G., SANTOS, A.G., AMORIM, E.L.C., Medicinal Plants used as antitumor agents in Brazil: an Ethnobotanical approach. **Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, Article ID 365359, 14 pag, doi:10.1155/2011/365359, 2011.

METROHM, Manual 8.110.8004EN Metrohm ion analysis. IC Equipament Set variocell for Bioscan 6.5.331.1x0, 2007.

MOREIRA, A.P.L; Determinação cromatográfica e eletroforética de diuréticos e laxantes em formulações farmacêuticas à base de plantas medicinais. **Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em ciências farmacêuticas**; Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2012.

MULLER, L.S.; Caracterização de Extratos de *Connarus perrotettii* var *angustifolius* e avaliação do comportamento antioxidante frente a espécies radicalares. **Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.

NACZK M., SHAHIDI, F., Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p. 461-477, 2007.

NICASIO-TORRES, M.P., MECKES-FISCHER, M., SANTAMARÍA, L.A., Production of chlorogenic acid and isoortientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. **Acta Physiol Plant**, v. 34, p. 307-316, 2012.

ODONNE, G., VALADEAU, C., CASTILLO, J.A., Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Parapuru basin (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n.1, p. 127-153, 2013.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; **Fontes Vegetais naturais de Antioxidantes. Quim Nova**, Vol 32, No 3, 689-702, 2009.

OLIVEIRA, L.S., MUZITANO, M.F., COUTINHO, M.A.S., Plantas Medicinais como recurso terapêutico em Comunidade do entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica internacional**, v. 4, n. 17, p 54-74, 2011.

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

PEREIRA, B.; Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**, v.2, n.2, 1996.

PRUSTY, K.B., KIRAN, B., BHARGAVI, V., Anti-ulcer investigation of the different extracts of the bark of *Bauhinia variegata* Linn (Caesalpinaceae) by pyloric ligation & aspirin plus pyloric ligation model. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**. v.21, n.2, p. 248-262, 2012.

REDDY, M.V.B., REDDY, M.K., GUNASEKAR, D., A flavonone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 879-882, 2003.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quim Nova**, v. 27, n.5, p. 771 – 780, 2004.

ROCHA, G. G., SIMOES, M., LUCIO, K. A., Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7355-7360, 2007.

SANTOS, F. S. D., Folk traditions in the use of medicinal plants in the Amazon. **História, Ciências, Saúde – Manguinho**, v. 6, p. 919 – 939, 2000.

SANTOS, J. F. L., PAGANI, E., RAMOS, E., RODRIGUES, E., Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 503-515, 2012.

SARAVANAMUTTU, S., SUDARSANAM, D.; Antidiabetic plants and their active ingredients: A review. **Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. V.3, n.10, p. 3639-3650, 2012

SCHNEIDERMAN, E., STALCUP, A. M., Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 83-102, 2000.

SILVA, K.L., FILHO, V.C., Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição Química e potencial farmacológico. **Quim Nova**, v. 25 n.3, p. 449-454, 2002.

SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; Fenóis totais e Atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPOSITO, T. C., SANTOS, F. A. M., Scaling os stem and crown in eight *Cecropia* (Cecropiaceae) species of Brazil **American Journal of Botany**, v. 88, n. 5, p. 939–949, 2001.

TOLEDO, V. M., TÉLLEZ, M. G.O., SORTIBRÁN, A. N.C., Genotoxicity testing of *Cecropia obtusifolia* extracts in two in vivo assays: The wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila* and the human cytokinesis-block micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116,p. 58-63, 2008.

TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections – A review Part II. Liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 8 – 25, 2011.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 20, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

Vasconcelos, S.M.L.; Silva, A.M.; Goulart, M.O.F.; Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

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

ZHAO, H.; DONG, J.; LU, J.; Effects of Extraction Solvent mixtures on Antioxidant activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare L.*). **J. Agric. Food Chem**, v. 54, p. 7277-7286, 2006.

ZOGHBI, M.G.B., OLIVEIRA, J., SKELDING, G.M., The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 795-804, 2008.