

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

**ESTUDO COMPARATIVO DA BIOATIVIDADE
DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
PLANTAS MEDICINAIS**

TESE DE DOUTORADO

Fernanda Oliveira Lima

Orientador: Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**ESTUDO COMPARATIVO DA BIOATIVIDADE
DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS**

por

Fernanda Oliveira Lima

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira Lima, Fernanda
ESTUDO COMPARATIVO DA BIOATIVIDADE DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS / Fernanda Oliveira Lima.-
2013.
145 p.; 30cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho
Coorientador: Paulo Cícero do Nascimento
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2013

1. Polifenóis 2. Métodos de extração 3. Plantas
medicinais I. Machado de Carvalho, Leandro II. Cícero do
Nascimento, Paulo III. Título.

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ESTUDO COMPARATIVO DA BIOATIVIDADE
DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS**

Elaborada por
Fernanda Oliveira Lima

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Química Analítica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leandro Machado de Carvalho, Dr.
(presidente/orientador)

José Maria Monserrat, Dr. (FURG)

Simone Stülp, Dra. (UNIVATES)

Michele Rechia Fighera, Dra. (UFSM)

Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 25 de setembro de 2013

Dedico este trabalho

à minha mãe **Carmen Marilia**,
pela dedicação incansável,
pelo suporte, amor, carinho,
pela força, amizade, compreensão,
pelo companheirismo, apoio e paciência,
enfim, por acreditar em mim,
e apostar nas minhas escolhas

Muito Obrigada por tudo!

Eu amo você!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo qual recebi o dom da vida e que me deu força, coragem e confiança diante às dificuldades e obstáculos;

A minha mãe, Carmen Marília, maravilhosa!!! Pela compreensão, ensinamentos, apoio, paciência e amor incondicional, por dedicar a sua vida pela minha formação, e por sempre me dar o apoio de que precisei, acreditando fielmente em meus sonhos. Sem você eu não teria chegado até aqui... Obrigada! AMO VOCÊ, por certo, a melhor pessoa do mundo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao meu professor orientador, Dr. Leandro Machado de Carvalho, pelo auxílio, pela disponibilidade de tempo, pela atenção dispensada, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela oportunidade, auxílio, disponibilidade de tempo, atenção e paciência.

Ao professor Dr. José Maria Monserrat pela atenção, apoio, transmissão de conhecimentos, paciência e pela colaboração neste trabalho e na banca de qualificação e defesa.

A professora Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli pela disponibilidade, atenção, apoio, transmissão de conhecimentos, paciência e colaboração neste trabalho e na banca de qualificação, bem como seus colaboradores, em especial, aos amigos: Valeska Aguiar; a Mariana Roberto Gama Sato, Aline Barbutti de Oliveira, Bruno Molero da Silva, pelo apoio, companheirismo e contribuições neste trabalho.

Aos professores Dr. José Alberto Fracassi da Silva e Dr. Dossil Pereira de Jesus pela disponibilidade e auxílio neste trabalho.

As amigas e técnicas Aline Guadalupe Coelho, Lucília Vilela de Melo, Rita de Cássia Zacardi de Souza e Priscila Andrade da Silva. Gurias, muito obrigada pela ajuda!

A professora Dra. Simone Stülp pela atenção, transmissão de conhecimentos e auxílio neste trabalho, também a sua aluna Laís Bresciani pela disponibilidade e ajuda.

Aos professores Dra. Michele Rechia Fighera pela atenção, contribuição e auxílio neste trabalho. E seu aluno Iuri Domingues Della pela disponibilidade e ajuda.

A professora Dra. Carine Viana Silva pela atenção, transmissão de conhecimentos, paciência e colaboração neste trabalho, na banca de qualificação e de defesa.

A professora Dra. Renata Pereira Limberger pela transmissão de conhecimentos e auxílio neste trabalho.

Ao meu namorado, Michel Ricardo de Barros Chaves, que esteve ao meu lado fazendo a vida mais bela, sendo amável, compreensivo, incentivador e companheiro! Você é uma pessoa extremamente especial para mim!

A todos colegas do LACHEM, pelo apoio, incentivo e conselhos.

A Aline Sobreira Bezerra, Luís Manoel do Rosário Ferraz, Henrique Faccin, Alessandro Hermann, Carla Grassmann Santana, Liziara da Costa Cabrera, Sandra Ribeiro, pessoas importantíssimas na minha vida profissional e pessoal, companheiros e conselheiros para todos os momentos sendo eles de alegria ou tristeza no enfrentamento das dificuldades. Adoro vocês!!!

A minha amiga Greice Franciele Fehy dos Santos Montagner, pelo amor, carinho, dedicação, apoio e conselhos. Adoro você!!!

A todos os professores e funcionários que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Ademir e a Valeria, pelo incentivo e disponibilidade sempre que precisei.

E, a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho.

A todos o meu muitíssimo obrigado!

"Peça a Deus que abençoe seus planos
e eles darão certo"

Provérbios 16:3

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO COMPARATIVO DA BIOATIVIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

AUTORA: FERNANDA OLIVEIRA LIMA
ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO
Santa Maria, 25 de setembro de 2013.

Os compostos fenólicos constituem-se por um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, que apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes. Mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, os antioxidantes podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação dos radicais livres. Desta forma, este estudo teve como objetivo classificar e determinar quantitativamente os compostos antioxidantes isolados e naturais quanto a sua contribuição na atividade antirradicalar a partir da análise cromatográfica (HPLC-DAD) e de um estudo sistemático da atividade antirradicalar de compostos antioxidantes isolados (padrões de referência) e naturais (extratos de plantas medicinais) usando métodos *in vitro* e *ex vivo*. Além disso, a bioatividade das espécies antioxidantes foi avaliada a partir de células de córtex e da permeação por biomembranas celulares artificiais lipídicas. Dentre os antioxidantes estudados, a quercitrina apresentou ação protetora contra radicais livres em nível celular (células de córtex), alta ação antirradicalar *in vitro* e em nível celular (*ex vivo*), além de permear biomembranas. Essas respostas, quando somadas, podem credenciar a quercitrina com um dos antioxidantes da classe dos polifenóis de maior relevância em nível fisiológico.

Palavras-chave: Polifenóis, Métodos de extração e quantificação, Ervas medicinais.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Post graduate Program in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

COMPARATIVE STUDY OF THE BIOACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN MEDICINAL PLANTS

AUTHOR: FERNANDA OLIVEIRA LIMA
ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO
Santa Maria, September 25th, 2013.

Phenolic compounds are secondary metabolites, widely distributed in the plant kingdom, which present antiinflammatory, antibacterial, antiviral, antiallergical and antitumoral activities, in addition to antioxidant activities. Even in low concentrations compared to the oxidant substrate, the antioxidant compounds can delay or inhibit free radical oxidation rates. Thus, this study aimed to quantitatively determine and classify the compounds as natural antioxidants isolated and its contribution to the antiradical activity from the chromatographic analysis (HPLC-DAD) and a systematic study of the antiradical activity of antioxidant compounds isolated (patterns reference) and natural (herbal extracts) using in vitro and ex vivo.bem. Furthermore, the antioxidant species bioactivity was assessed from cells of the cortex and permeation cell biomembranes, artificial lipid. Among the antioxidant compounds studied, quercetrin presented protection action against free radicals on cell-based studies (cortex cells), high in vitro and cell-based antiradical actions, and also biomembrane permeations. These responses, when added, can confer to quercitrin higher relevance as a antioxidant at physiological levels when compared to others poliphenols. This work presents a systematic study on antiradical activities of isolated antioxidant compounds (from reference standards) and natural antioxidant compounds (medicinal plant extracts), by using in vitro and ex vivo methods.

Keywords: Polyphenol, Extraction and quantification methods, Medicinal herbs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O).....	25
Figura 2 – Reação direta dos antioxidantes (Ant) com os radicais livres (RL).....	28
Figura 3 – Percursos de formação de ROS, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas).	30
Figura 4 – Estrutura básica dos ácidos fenólicos. A) ácido benzoico e B) ácido cinâmico	33
Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides.	33
Figura 6 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes.....	48
Figura 7 – Reação química de conversão de hipoxantina a ácido úrico no sistema hipoxantina-xantina oxidase.....	49
Figura 8 – Reação química de formação do formazan a partir do NBT no sistema hipoxantina-xantina oxidase.	49
Figura 9 – Fluxograma do método ANCOMROS	50
Figura 10 – Reação de fotodecomposição do H ₂ O ₂	51
Figura 11 – Esgotamento vegetal à quente (extração 1).....	57
Figura 12 – Esgotamento vegetal à frio (extração 2).....	58
Figura 13 – Hidrólise ácida (extração 3) realizada nas plantas medicinais.....	59
Figura 14 – Placa de análise do método ANCOMROS.....	67
Figura 15 – Representação esquemática do sistema de irradiação UV com fonte de radiação de Hg.....	69
Figura 16 – Esquema de montagem da placa de análise do método PAMPA.....	74
Figura 17 – Placa de análise do método PAMPA, com imagem de aproximação dos discos de microfiltro hidrofóbicos.	74
Figura 18 – Esgotamento vegetal à quente (extração 1), amostra de carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	77
Figura 19 – Esgotamento vegetal à frio (extração 2), amostra de carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	78
Figura 20 – Hidrólise ácida (extração 3), amostra de carqueja (<i>Baccharis trimera</i>). .	79
Figura 21 – Perfil cromatográfico do extrato de <i>Cecrópia palmata</i>	81
Figura 22 – Recuperações para compostos fenólicos após extração em fase sólida (SPE) e determinação por HPLC	82
Figura 23 – Separação cromatográfica dos antioxidantes por eluição isocrática	84
Figura 24 – Separação cromatográfica dos antioxidantes (17 mg.L ⁻¹).....	86
Figura 25 – Eletroferograma da separação dos antioxidantes isolados (50 mg.L ⁻¹). .	91
Figura 26 – Perfil cromatográfico: a) arnica (<i>Solidago microglossa D. C.</i>), b) cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>), c) camomila (<i>Matricaria recutita</i>), e d) goiabeira (<i>Psidium guajava</i>).....	97
Figura 27 – Perfil cromatográfico: a) louro (<i>Laurus nobilis L.</i>), b) macela (<i>Achirocline satureoides</i>). c) mastruz (<i>Coronopus didymus (L.) Smith.</i>) e d) quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i>).....	98
Figura 28 – Perfil eletroforético: a) arnica (<i>Solidago microglossa D. C.</i>), b) cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>), c) camomila (<i>Matricaria recutita</i>), e d) goiabeira (<i>Psidium guajava</i>).....	99

Figura 29 – Perfil eletroforético: a) louro (<i>Laurus nobilis</i> L.), b) macela (<i>Achirocline satureoides</i>). c) mastruz (<i>Coronopus didymus</i> (L.) Smith.) e d) quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i>).....	100
Figura 30 – Correlação entre os métodos de separação desenvolvidos, HPLC-DAD e CZE-DAD.	101
Figura 31 – Perfil cromatográfico da <i>Cecrópia palmata</i> Willd.(registro IAN 18555).	105
Figura 32 – Perfil cromatográfico da <i>Cecrópia obtusa</i> (IAN 185555).	106
Figura 33 – Perfil cromatográfico da <i>Bauhinia variegata</i> (registro IAN 185932).....	107
Figura 34 – Perfil cromatográfico da <i>Bauhinia var. alboflava</i> Wit (registro IAN 185831)	108
Figura 35 – Perfil cromatográfico da <i>Mansoa alliaceae</i> (registro IAN 184394).....	109
Figura 36 – Teor médio de compostos fenólicos totais nas plantas medicinais de uso popular.....	110
Figura 37 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes isolados, em diferentes concentrações, frente ao radical DPPH (A), peroxil (B), hidroxil (C) e superóxido (D).	114
Figura 38 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes naturais, em diferentes concentrações, frente ao radical DPPH (A), peroxil (B) e superóxido (C)	119
Figura 39 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes naturais, na concentração de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, frente ao radical hidroxil	123
Figura 40 – Níveis de DCFH-DAD entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	125
Figura 41 – Níveis de catalase entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	125
Figura 42 – Níveis de SOD entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – ROS e os antioxidantes.....	30
Tabela 2 – Relação de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.	37
Tabela 3 – Relação de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.	55
Tabela 4 – Dados do método cromatográfico desenvolvido.....	85
Tabela 5 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e canferol por HPLC-DAD.....	87
Tabela 6 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de catequina, crisina, fisetina e flavona por HPLC-DAD.	88
Tabela 7 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina por HPLC-DAD.	89
Tabela 8 – Resultados obtidos na análise da precisão e exatidão do HPLC-DAD desenvolvido para análise dos antioxidantes em estudo.	90
Tabela 9 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de catequina, rutina, quercitrina, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico por CZE-DAD.	92
Tabela 10 – Resultados obtidos na análise da precisão e exatidão do CZE-DAD desenvolvido para análise dos antioxidantes em estudo.	93
Tabela 11 – Dados espectrais de massa dos compostos antioxidantes estudados em modo negativo.....	94
Tabela 12 – Concentração de antioxidantes, determinadas por HPLC-DAD, CZE-DAD e confirmados por ESI-MS/MS, nas plantas medicinais de uso popular em estudo.	96
Tabela 13 – Concentração de antioxidantes, determinados por HPLC-DAD, nas plantas medicinais da Amazônia.....	102
Tabela 14 – Concentração de antioxidantes, determinados por HPLC-DAD, nas plantas medicinais da Amazônia.....	104
Tabela 15 – Classificação dos antioxidantes isolados pelos métodos <i>in vitro</i>	111
Tabela 16 – Classificação e estrutura química dos antioxidantes em estudo.	112
Tabela 17 – Atividade antirradicalar frente ao radical DPPH dos antioxidantes isolados.....	115
Tabela 18 – Atividade antirradicalar frente ao radical peróxido dos antioxidantes isolados.....	115
Tabela 19 – Atividade antirradicalar frente ao radical hidroxil dos antioxidantes isolados.....	116
Tabela 20 – Atividade antirradicalar frente ao radical superóxido dos antioxidantes isolados.....	116
Tabela 21 – Classificação dos antioxidantes naturais pelos métodos <i>in vitro</i>	118
Tabela 22 – Atividade antirradicalar frente ao DPPH das plantas medicinais.....	120
Tabela 23 – Atividade antirradicalar frente ao peróxido das plantas medicinais.....	121
Tabela 24 – Atividade antirradicalar frente ao superóxido das plantas medicinais.....	122
Tabela 25 – Atividade antirradicalar frente ao hidroxil dos compostos fenólicos naturais.	123

Tabela 26 – Características químicas e físicas dos compostos fenólicos estudados.	143
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAP	dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
AH	Antioxidante
a-H⁻	Aglicona desprotonada
ALA	Ácido α -lipóico
ANCOMROS	<i>Antioxidant Competence is Measured by ROS</i>
ANOVA	Análise de variância
Ant	Antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	Arnica
ARR	Arruda
Asc⁻	Ascorbato
BOL	Boldo
CAF	Ácido cafeico
CAJ	Cajueiro
CAM	Camomila
CAN	Canferol
CAP	Capim-limão
CAR	Carqueja
CAT	Catalase
CATE	Catequina
CID	Dissociação induzida por colisão
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CRI	Crisina
CZE	Eletroforese capilar de zona
CZE-DAD	Eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos
DCF⁻	2',7'-diclorofluoresceína diacetato oxidado
DCFH₂	2',7'-diclorofluoresceína diacetato desacetilado
DCFH₂-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DHLA	ácido dihidrolipoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
E^o	Potencial padrão de redução
ESI	Ionização por eletrospray
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas tandem com ionização por electrospray
FER	Ácido ferúlico
FIS	Fisetina
FLA	Flavona
GAE	Ácido gálico
GAL	Ácido gálico
GOI	Goiabeira
GPx	Glutathione peroxidase
GRA	Graviola
Gred	Glutathione reductase

GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GUA	Guaco
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazina etanosulfônico
HO[·]	Radical hidroxil
HO₂[·]	Radical hidroperoxil
HOO[·]	Radical hidroperoxil
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
HPX	Hipoxantina
IAN	Registro
KCl	Cloreto de potássio
KH₂HPO₄	Fosfato monopotássico
L	Radical lipídico
LC	Cromatografia líquida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Ácidos graxos poli-insaturados
LO	Lipídicos alcóxil
LOD	Limite de detecção
LOO	Radical peroxil lipídico
LOQ	Limite de quantificação
LOU	Louro
m/v	Massa por volume
m/z	Massa/carga
MAC	Macela
MAS	Mastruz
MgCl₂	Cloreto de magnésio
M-H⁻	Molécula desprotonada
MIR	Miricetina
MS/MS	Espectrometria de massas tandem
N₂	Azoto
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato monossódico
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitro azul de tetrazólio
O₂	Oxigênio
O₂^{-·}	Radical ânion Superóxido
PAMPA	Avaliação de permeabilidade celular
PBS	Tampão fosfato-salino
pKa	Constante de acidez
PNPIC	Política Nacional Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
QUE	Quercetina
QUEB	Quebra-pedra
QUER	Quercitrina
R	Coeficiente de correlação
RES	Resvertrol
RL	Radical livre
ROO[·]	Radical peroxil
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUT	Rutina
SOD	Superóxido dismutase
SPE	Extração em fase sólida
SUS	Sistema Único de Saúde
TER	Terramicina
TIR	Tiririca
TO	Vitamina E
T-OH	Vitamina E reduzida
tr	Tempo de retenção
UV	Radiação ultravioleta
v/v	volume por volume
Vis	Radiação visível
XOD	Xantina

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ESTUDADOS	143
---	------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Radicais livres	23
2.1.1	Espécies Reativas de oxigênio (ROS)	24
2.1.1.1	Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	26
2.1.1.2	Radical hidroxil (HO^{\bullet})	26
2.1.1.3	Radical hidroperoxil ($HO_2^{\bullet-}$)	27
2.1.1.4	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	27
2.1.2	Defesas antioxidantes	28
2.2	Compostos fenólicos como captadores radicalares	32
2.3	Plantas medicinais	35
2.4	Interações antioxidantes	45
2.5	Métodos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antioxidante	47
2.5.1	Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	48
2.5.2	Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD	48
2.5.3	Radical Peroxil – Método ANCOMROS	49
2.5.4	Radical hidroxil gerado por fotólise do H_2O_2	51
3	OBJETIVO GERAL	52
3.1	Objetivos específicos	52
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	Materiais, reagentes e soluções	54
4.2	Amostras	55
4.3	Instrumentação	56
4.4	Procedimentos analíticos	57
4.4.1	Isolamento dos antioxidantes naturais por extração em fase sólida	60
4.4.2	Identificação e quantificação dos antioxidantes naturais	60
4.4.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	60
4.4.2.2	Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	61
4.4.2.3	Confirmação dos compostos antioxidantes por ESI-MS/MS	62
4.4.3	Validação dos métodos de separação	62
4.4.4	Quantificação dos compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu	64
4.4.5	Avaliação da atividade antirradicalar <i>in vitro</i>	65
4.4.5.1	Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	65
4.4.5.2	Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD	66
4.4.5.3	Radical Peroxil – Método ANCOMROS	67
4.4.5.4	Radical Hidroxil gerado pela fotólise do H_2O_2	68
4.4.6	Avaliação da atividade antirradicalar <i>ex vivo</i>	70
4.4.6.1	Animais	70
4.4.6.2	Grupos experimentais	70
4.4.6.3	Modelo de estresse repetido por contenção	71
4.4.6.4	Tratamento	71
4.4.6.5	Preparação do tecido	72
4.4.6.6	Determinação dos níveis de Diclorofluoresceína Oxidado (DCFH-DA)	72
4.4.6.7	Determinação da atividade da catalase (CAT)	72
4.4.6.8	Determinação da enzima superóxido dismutase (SOD)	73
4.4.7	Avaliação da permeabilidade celular dos antioxidantes estudados	73

4.4.8	Análise estatística	75
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1	Extração de compostos fenólicos em plantas medicinais	76
5.2	Isolamento dos compostos fenólicos por extração em fase sólida	81
5.3	Identificação e quantificação de compostos fenólicos por métodos de separação.....	83
5.3.1	Separações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	83
5.3.2	Separações por Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	91
5.3.3	Confirmação dos compostos antioxidantes por ESI-MS/MS	93
5.4	Compostos fenólicos em plantas medicinais	95
5.4.1	Quantificação de compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu.....	109
5.5	Atividade antirradicalar de compostos fenólicos por método <i>in vitro</i>	110
5.5.1	Antioxidantes isolados (sintéticos).....	111
5.5.2	Antioxidantes naturais.....	118
5.6	Atividade antirradicalar de compostos fenólicos por métodos <i>ex vivo</i> ...	124
5.7	Permeação de compostos fenólicos em membranas	126
5.8	Estudo comparativo da bioatividade <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> dos antioxidantes isolados e naturais.....	127
6	CONCLUSÕES.....	130
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos constituem-se por um grupo de metabólitos secundários, amplamente distribuídos no reino vegetal, que apresentam propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes e inibirem a atividade de muitas enzimas como as xantina-oxidases (PIETTA, 2000; SIMÕES et al., 2004; HAVSTEEN, 2002; VALKO et al., 2007).

Mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, os antioxidantes podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação dos radicais livres (BIANCHI ; ANTUNES, 1999). Os radicais livres derivados do oxigênio, chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) representam a classe mais importante de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2007).

A determinação da reatividade de radicais livres por métodos *in vitro*, normalmente envolve o uso de uma fonte de radicais livres e um substrato específico, que deve ser atacado pelos radicais livres gerados artificialmente. Neste contexto, vários métodos analíticos que usam diferentes reagentes e princípios de medição física para monitorar a reação, em um tempo definido, tem sido desenvolvidos. Assim, podem ser explicados os resultados contraditórios normalmente obtidos por métodos independentes, que fazem uso de diferentes substratos, espécies reativas de oxigênio e princípios de detecção (ANTOLOVICH et al., 2002).

As plantas medicinais tem desempenhado um papel fundamental na saúde mundial, já que o interesse em drogas derivadas de plantas, especialmente os fitoterápicos, tem aumentado expressivamente, devido ao poder antioxidante apresentado. Estima-se que aproximadamente de 25% de todos os medicamentos são, direta ou indiretamente, derivados de plantas (CALIXTO, 2000; FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

Este trabalho apresenta um estudo sistemático da atividade antirradicalar de compostos antioxidantes isolados (padrões de referência) e naturais (extratos de plantas medicinais), usando métodos *in vitro* e *ex vivo*.

Os métodos *in vitro* baseados na geração de radicais OH^\bullet , ROO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e DPPH a partir de reações diferentes, foram aplicados para a determinação quantitativa da atividade antirradicalar dos antioxidantes isolados – ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, canferol, (+) - catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina – e dos naturais, extraídos de plantas medicinais brasileiras, caracterizados por HPLC-DAD, CZE-DAD e ESI-MS/MS.

Desta forma, este estudo teve como objetivo classificar e determinar quantitativamente os compostos antioxidantes isolados e naturais quanto a sua contribuição na atividade antirradicalar, bem como avaliar a bioatividade das espécies antioxidantes, a partir de células de córtex e da permeação por biomembranas celulares artificiais lipídicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Nas últimas décadas, pesquisas apontam os radicais livres como principais responsáveis pelo envelhecimento e por doenças degenerativas (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; BIANCHI ; ANTUNES, 1999; HAVSTEEN, 2002; VALKO et al., 2007, VELLOSA et al., 2007; REN et al., 2003; OLIVEIRA, 2007).

Os radicais livres podem ser definidos como espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares, ou seja, que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Este elétron não pareado, geralmente, confere um alto grau de reatividade aos radicais livres (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

As reações de oxi-redução são fontes de radicais livres, uma vez que eles provocam ou resultam deste tipo de reação. O radical livre pode ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou receber um elétron, reduzindo-se. Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al, 2007).

Para limitar os níveis de radicais livres e impedir a indução de danos, defesas antioxidantes agem frente à produção contínua deles durante os processos metabólicos com o objetivo de equilibrar a formação e a remoção de espécies radicalares do organismo. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva, ultrapassando a capacidade do sistema de defesa antioxidante de neutralizá-los (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; BIANCHI ; ANTUNES, 1999; VALKO et al, 2007).

2.1.1 Espécies Reativas de oxigênio (ROS)

Radicais livres derivados do oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2007). O oxigênio é o último aceptor de elétrons no sistema de produção de energia aeróbica, sendo essencial neste metabolismo (PIETTA, 2000).

A terminologia ROS inclui as espécies de radicais livres de oxigênio e outras que, apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005).

As ROS são onipresentes e derivadas do metabolismo do oxigênio. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Figura 1). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (HO^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007; ROBERTS ; SINDHU, 2009).

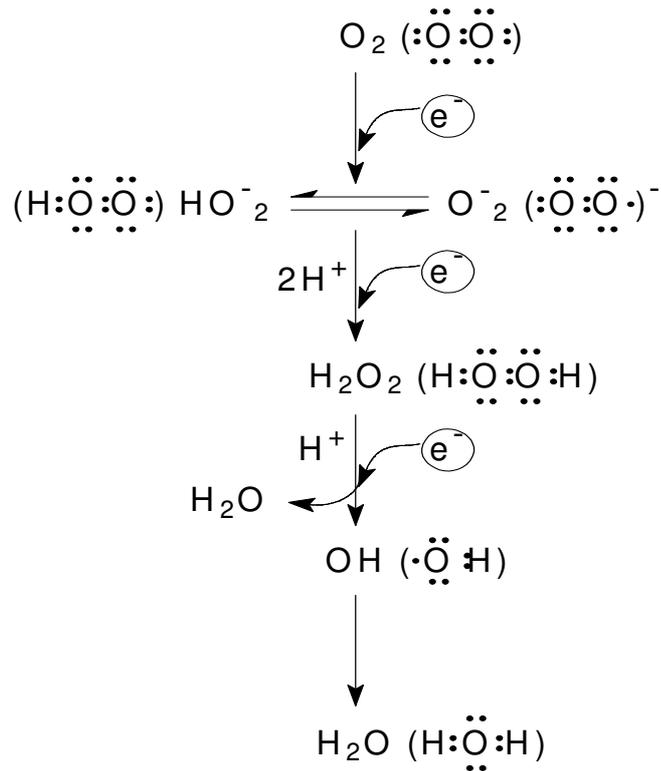


Figura 1 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). (Fonte: FERREIRA ; MATSUBARA, 1997).

Essas espécies desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis as ROS são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microrganismos (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007; ROBERTS ; SINDHU, 2009).

Além das ROS serem geradas por processos fisiológicos internos, também são geradas por patologias e por fontes externas como prática de exercícios físicos extenuantes, lesões isquêmicas, oxidação de LDL – colesterol, reações inflamatórias, radiações (UV, raios-X), e xenobióticos diversos como fumaça do cigarro, ingestão de bebidas alcoólicas, medicamentos como morfina e alucinógenos (cocaína), contaminação por metais como chumbo, alumínio, mercúrio e ferro. (PIETTA, 2000; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo, também referido na literatura como um desequilíbrio antioxidante dos radicais livres, ocorre quando o valor líquido destas moléculas excede a capacidade antioxidante, que resulta na indução de danos celulares pelos

radicais livres. Este pode ocorrer como consequência de um aumento geral na geração de ROS, uma diminuição do sistema antioxidante, ou ambos (BIANCHI ; ANTUNES, 1999;).

2.1.1.1 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Considerado como pouco reativo em soluções aquosas, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é formado após a primeira redução do O_2 pela adição de um elétron, podendo reagir como oxidante ou como redutor dando origem a outras espécies reativas. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio. Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO^{\bullet}), é mais reativo (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Apesar dos efeitos danosos, o radical $O_2^{\bullet-}$, tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Sua formação ocorre de forma espontânea, por exemplo, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Além disso, também pode ser produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

2.1.1.2 Radical hidroxil (HO^{\bullet})

O radical hidroxil, teoricamente, é o mais reativo das ROS, com um curto tempo de meia-vida, de aproximadamente 10^{-9} s. Ele pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, quando produzido, *in vivo*, o radical HO^{\bullet} reage no próprio sítio onde

foi gerado (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

As principais vias de formação do radical HO^\bullet são pela reação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Para se estabilizar, o radical HO^\bullet promove, principalmente, a abstração de hidrogênio e/ou a adição a insaturações de moléculas próximas. Assim, este radical pode modificar bases purínicas e pirimidínicas, inativar várias proteínas e iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

2.1.1.3 Radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet})

O radical HO_2^{\bullet} representa a forma protonada do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Evidências indicam que é mais reativo que o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

2.1.1.4 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser considerado um radical livre verdadeiro, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical HO^\bullet (Figura 1).

Formado pela conversão espontânea e enzimática de dois radicais superóxido, o H_2O_2 é mais estável do que o radical HO^\bullet e tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas. Estas propriedades possibilitam que o H_2O_2 , reaja com alvos biológicos distantes do seu local de formação e provoque danos, por

exemplo, na molécula do DNA por meio de reações enzimáticas (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; BIANCHI ; ANTUNES, 1999; RIBEIRO et al., 2005).

2.1.2 Defesas antioxidantes

A exposição aos radicais livres tem levado o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa. Os mecanismos de defesa contra os radicais livres, induzidos pelo estresse oxidativo envolvem: mecanismos preventivos, mecanismos de reparo, defesas físicas, e as defesas antioxidantes (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

O termo antioxidante era aplicado inicialmente para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais reagem com radicais peroxil. Atualmente, este termo é frequentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres (DENISOV, 2005).

Existem três tipos de compostos, os quais podem diretamente suprimir a formação de radicais livres, que são: os antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), os “varredores” de radicais livres e os quelantes. Os antioxidantes promovem a supressão da formação de radicais livres, através de reação direta com estes (Figura 2) para formar novos radicais inativos ou quelar metais de transição, cataliticamente ativos para formar complexos inativos (DENISOV, 2005):

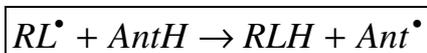


Figura 2 – Reação direta dos antioxidantes (Ant) com os radicais livres (RL) (adaptado de DENISOV, 2005).

Antioxidantes enzimáticos incluem, principalmente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H₂O₂ e O₂, na presença de próton H⁺. A GPx

catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus correspondentes álcoois pela conversão da glutathione reduzida (GSH) para glutathione oxidada (GSSG), enquanto que a CAT, uma hemoproteína citoplasmática, catalisa a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos são representados, principalmente, pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), flavonoides e outros.

A glutathione, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH), é um importante antioxidante não enzimático que desempenha várias funções no organismo, como por exemplo, no metabolismo, transporte, catálise, manutenção de proteínas, etc. Como composto redox, a glutathione atua como um “varredor” de radicais livres e como um doador de elétrons no ciclo redox da glutathione peroxidase e da glutathione redutase que catalisa a redução de peróxidos. (FERREIRA ; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007; DENISOV, 2005).

O ácido ascórbico e GSH são os mais importantes antioxidantes solúveis em meio aquoso encontrados nos organismos vivos. A atividade antioxidante da glutathione é especialmente importante no cérebro, que contém níveis relativamente baixos de SOD, catalase e glutathione peroxidase. Neste caso, a alteração do metabolismo de GSH pode contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DENISOV, 2005).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre os níveis de radicais livres e os de espécies antioxidantes. Este equilíbrio é essencial para a sobrevivência e saúde dos organismos (VALKO et al., 2007).

Na Tabela 1 estão relacionadas as ROS com os respectivos antioxidantes e na Figura 3 é mostrado um esquema de interrelação entre os radicais livres e as defesas antioxidantes.

Tabela 1 – ROS e os antioxidantes.

ERO	Antioxidantes	
	Endógenos	Exógenos
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Superóxido dismutase (SOD): a) citoplasmática: Zinco-Cobre b) mitocondrial: Manganês	Vitaminas, zinco, cobre, manganês, picnogenol, EDTA
Radical peroxil (ROO^{\cdot})	Glutaciona peroxidase, selênio, cisteína	Vitamina E, selênio
Radical hidroxila (HO^{\cdot})	Não relatado na literatura	Vitamina C, picnogenol, dimetil sulfóxido, EDTA, ácido dimercapto succínico e manitol
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Catalase Fe^{2+}	Não relatado na literatura

Fonte: VALKO et al., 2007.

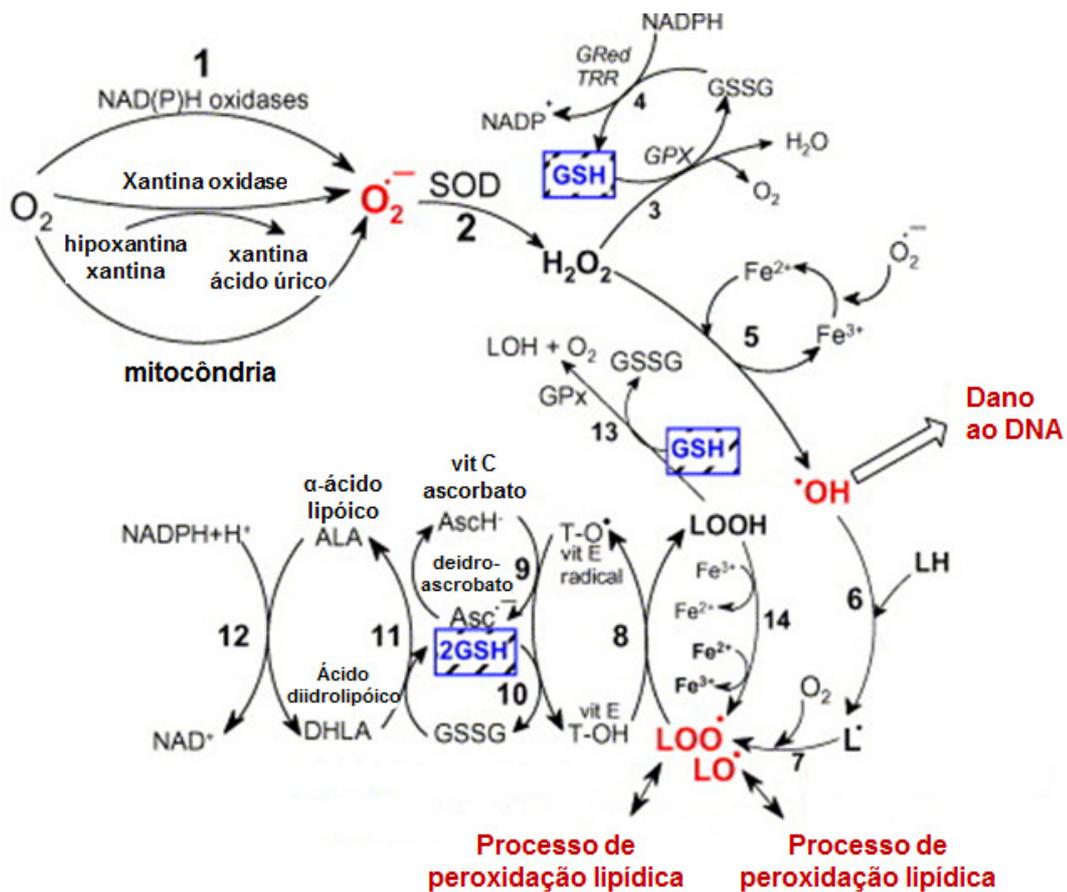


Figura 3 – Percursos de formação de ROS, o processo de peroxidação lipídica e do papel da glutaciona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico) na gestão do estresse oxidativo (equações não estão balanceadas). (VALKO et al., 2007).

Podemos observar as reações na Figura 3, conforme VALKO e colaboradores (2007):

(1) mostra que o radical ânion superóxido é formado pelo processo de redução do oxigênio molecular, mediada por NAD(P)H oxidase e xantina oxidase ou não-enzimaticamente por reações redox de compostos reativos como o composto semi-ubiquinona da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons.

(2), o radical superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio.

(3), o peróxido de hidrogênio é oxidado pela enzima glutathione peroxidase (GPx), que requer GSH como doador de elétrons.

(4), a glutathione oxidada (GSSG) é reduzida de volta para GSH pela enzima glutathione reductase (Gred), que utiliza NADPH como doador de elétrons.

(5), alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem reagir com o peróxido de hidrogênio, pela reação de Fenton, e formar radical hidroxil.

(6), o radical hidroxila pode abstrair um elétron de ácidos graxos poliinsaturados (LH) para dar lugar a um radical lipídico (L).

(7), o radical lipídico L pode continuar a interagir com o oxigênio molecular para formar um radical peroxil lipídico (LOO). Se o LOO não for reduzido em antioxidante, ocorre o processo de peroxidação lipídica.

(8), o LOO é reduzido dentro da membrana pela forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical da vitamina E (TO).

(9), ocorre a regeneração da vitamina E pela vitamina C.

(10), a regeneração da vitamina E por GSH.

(11), a glutathione oxidada (GSSG) e do radical ascorbil (Asc^-) são reduzidos de volta para GSH e ascorbato monoânion, Asch^- , respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHHLA), que é convertido ao ácido α -lipóico (ALA).

(12), ocorre a regeneração da DHHLA da ALA usando NADPH.

(13), os hidroperóxidos lipídicos são reduzidos a álcoois e dioxigênio pela GPx usando GSH como doador de elétrons.

(14), radicais hidroperóxidos lipídicos podem reagir rapidamente com Fe^{2+} para formar os radicais lipídicos alcóxil (LO), ou muito mais lento com Fe^{3+} para formar os radicais lipídicos peroxil, ocorrendo, por fim, o processo de peroxidação lipídica.

2.2 Compostos fenólicos como captadores radicalares

Os compostos fenólicos são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgicas, antivirais, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e antioxidantes (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; DENISOV, 2005).

O termo “fenólico” ou “polifenólico” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros) (SIMÕES et al., 2004).

Os ácidos fenólicos existem em todas as plantas e alimentos vegetais. Eles são, em sua maioria, derivados dos ácidos cinâmico e benzoico. Porém, apenas uma pequena fração deles está na forma de ácido livre (CHEN ; HO, 1997). A fração majoritária destes está ligada a ésteres, éteres, acetais ou proteínas, ligninas, flavonoides, glicoses e terpenos. Isso torna a determinação dos ácidos fenólicos complexa. Já os flavonoides ocorrem geralmente como derivados glicosilados em plantas (DENISOV, 2005).

Além de vários vegetais, os compostos fenólicos são encontrados em sementes, frutos secos, grãos e especiarias, bem como nas bebidas, como vinho, chá, e cevada (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV, 2005).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos. O primeiro grupo é derivado ácido benzoico, que possui sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Sua fórmula geral e denominação são representadas na Figura 4-A. O segundo grupo é derivado do ácido cinâmico, que possui nove átomos de carbono (C6-C3), conforme mostra a Figura 4-B (SOARES, 2002).

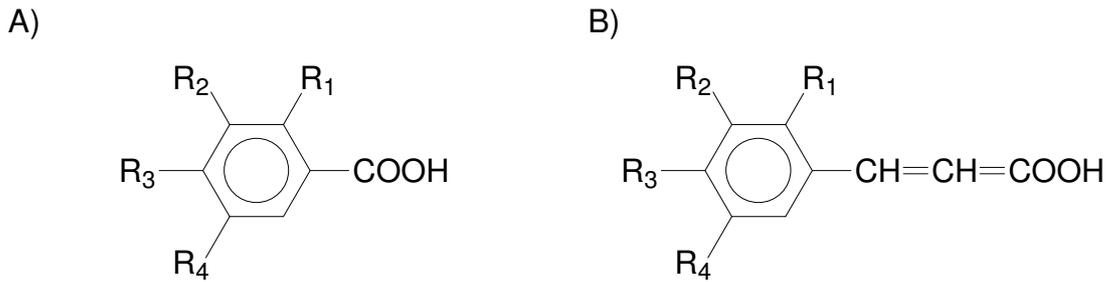


Figura 4 – Estrutura básica dos ácidos fenólicos. A) ácido benzoico e B) ácido cinâmico. (SOARES, 2002)

Os flavonoides tem como estrutura básica um núcleo que consiste de 15 átomos de carbono, composto do tipo C6-C3-C6, dispostos em dois anéis aromáticos, que são denominados A e B, conectados por uma ponte de três carbonos, que contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 5) (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; REN et al., 2003; SIMÕES et al., 2004).

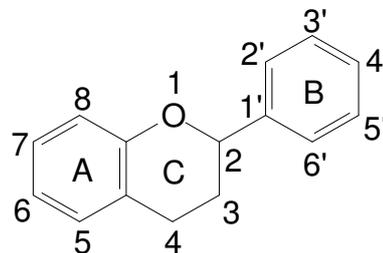


Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides (DENISOV, 2005).

De modo geral, os flavonoides apresentam:

- 1) diferenças na estrutura do anel C e no seu estado de oxi-redução;
- 2) diferenças no grau de hidroxilação e nas posições dos grupos hidroxila;
- 3) diferenças na derivatização dos grupos hidroxila, por exemplo, com grupos metila, hidratos de carbono, ou isoprenoides (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; SIMÕES et al., 2004; DENISOV ; AFANAS'EV, 2005).

Os flavonoides são classificados em grupos pelo nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C. Enquanto os compostos individuais, dentro de um

mesmo grupo, são diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B. (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; HEIM, TAGLIAFERRO ; BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Os flavonoides são, geralmente, hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizada na posição 3. Os glicosídeos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucorhamnose, galactose, ou arabinose (HAVSTEEN, 2002).

Os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos podem ser explicados por sua prevenção a peroxidação lipídica através da estabilização de radicais livres de iniciação lipídica (Figura 2), tais como, superóxido, hidroxil e hidroperóxil (HAVSTEEN, 2002; DENISOV ; AFANAS'EV, 2005).

Outro efeito, muito importante, é a quelação de íons metálicos, por exemplo, a complexação com íons ferro, suprimindo a reação de Fenton (ACKER et al., 1996; DENISOV ; AFANAS'EV, 2005).

Muitos autores tem tentado elucidar a relação estrutura-atividade dos compostos fenólicos quanto ao poder antioxidante. No entanto, isso é uma tarefa difícil, já que o potencial antioxidante pode ser determinado por vários fatores, dos quais a lipofilicidade, a quelação de ferro, e a limpeza de radicais livres são os mais importantes (PIETTA, 2000; HAVSTEEN, 2002; HEIM, TAGLIAFERRO ; BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

As principais aplicações dos compostos fenólicos são na indústria como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Além disso, o interesse pela indústria farmacêutica é crescente, e justifica-se pelo fato destes compostos apresentarem uma série de vantagens em relação a outros fármacos, principalmente em termos de não apresentar efeitos colaterais, como ulcerogenicidade (HAVSTEEN, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Assim, parece claro que os antioxidantes naturais são indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. Entretanto, estudos mais aprofundados e rigorosos devem ser conduzidos para determinar a concentração destas espécies em diferentes tipos de plantas medicinais e o seu real poder

antioxidante frente a sistemas radicalares (HAVSTEEN, 2002; HEIM, TAGLIAFERRO ; BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004).

Portanto, os compostos fenólicos possuem estrutura química ideal para a atividade de eliminação de radicais livres, já que possuem não somente grupos hidroxila fenólicos que são propensos a doar um átomo de hidrogênio ou um elétron para um radical livre, mas também um sistema aromático conjugado estendido para deslocalizar um elétron não emparelhado (HEIM, TAGLIAFERRO ; BOBILYA, 2002; YAO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

2.3 Plantas medicinais

Os medicamentos à base de plantas são considerados uma das primeiras formas de cuidado com a saúde usada pelo homem e estão relacionados aos primórdios da medicina, sendo empregados para o tratamento de uma série de doenças (CALIXTO, 2000; FABRICANT ; FARNSWORTH, 2001; BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; BRASIL, 2012).

Segundo a legislação sanitária brasileira, fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Além de ser caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Essa caracterização é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações científicas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012).

A preferência dos consumidores por terapias naturais, a preocupação em relação aos efeitos colaterais indesejáveis dos medicamentos modernos e a crença de que medicamentos à base de plantas são isentos de efeitos colaterais, juntamente com o grande interesse em medicinas alternativas, são fatores importantes que contribuíram para o aumento da comercialização de fitoterápicos (CALIXTO, 2000; FABRICANT ; FARNSWORTH, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Além disso, a preferência da população pela medicina preventiva, devido ao aumento da idade da população e a crença de que os medicamentos herbais podem ser eficazes no tratamento de determinadas doenças, também colaboraram para

este crescimento (CALIXTO, 2000; FABRICANT ; FARNSWORTH, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

No Brasil o registro de medicamentos fitoterápicos possui normas específicas desde 1967 (BRASIL, 1967). Essas normas foram sendo ajustadas ao desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos e vem sendo republicadas, de acordo com as modificações implementadas no país pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMP) e a Política de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), ambas publicadas em 2006 (BRASIL, 2006). Na tabela 2 estão listados os medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.

Tabela 2 – Relação de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Aesculus Hippocastanum</i> L.	Castanha da Índia	Sementes	Escina	Extratos/ tintura	Fragilidade capilar, insuficiência venosa	32 a 120 mg de escina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Allium sativum</i> L.	Alho	Bulbo	Alicina	Extratos/ tintura/ óleo	Coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial leve, auxiliar na prevenção da aterosclerose	2,7 a 4,1 mg de alicina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm f.	Babosa ou áloe	Gel mucilaginoso das folhas	Polissacarídeos totais	Extrato obtido do gel	Cicatrizante nas lesões provocadas por queimaduras térmicas (1º e 2º graus) e radiação	0,03 a 0,2 mg de polissacarídeos totais por 100 mg	Tópica	Venda sem prescrição médica
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> Spreng	Uva-ursi	Folha	Derivados de Hidroquinonas expressos em arbutina	Extratos/ tintura	Infecções do trato urinário	400 a 840 mg de derivados de hidroquinonas expressos em arbutina	Oral	Venda sob prescrição médica. Não utilizar continuamente por mais de uma semana nem por mais de cinco semanas/ano. Não usar em crianças com menos de 12 anos

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Arnica montana</i> L.	Arnica	Captulo floral	Lactonas sesquiterpênicas totais expressas em helenalina	Extratos/ tintura	Equimoses, hematomas e contusões	0,16 a 0,20 mg de lactonas sesquiterpênicas totais expressas em helenalina por grama ou 0,08 mg de lactonas sesquiterpênicas totais expressas em helenalina por ml	Tópica	Venda sem prescrição médica. Não usar em ferimentos abertos
<i>Calendula officinalis</i> L.	Calêndula	Flores	Flavonóides totais expressos em hiperosídeos	Extratos/ tintura	Cicatrizante, anti-inflamatório	1,6 a 5,0 mg de flavonóides totais expressos em hiperosídeos por 100 g ou 0,8 a 1,0 mg de flavonóides totais expressos em hiperosídeos por ml	Tópica	Venda sem prescrição médica
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	Centela, Centela-asiática	Partes aéreas	Derivados triterpênicos totais expressos em asiaticosídeo	Extratos	Insuficiência venosa dos membros inferiores	6,6 a 13,6 mg de derivados triterpênicos totais expressos em asiaticosídeo	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) Nutt.	Cimicífuga	Raiz ou rizoma	Glicosídeos triterpênicos expressos em 26-deoxiacteína	Extratos	Sintomas do climatério	2 a 7 mg de glicosídeos triterpênicos expressos em 26-deoxiacteína	Oral	Venda sem prescrição médica

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra	Folhas	Derivados do ácido cafeoilquínico expressos em ácido clorogênico	Extratos/tintura	Colerético, colagogo	7,5 a 12,5 mg de derivados do ácido cafeoilquínico expressos em ácido clorogênico	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Echinacea purpurea</i> Moench	Equinácea	Partes aéreas floridas	Fenóis totais expressos em ácido caftárico, ácido chicórico, ácido clorogênico e equinacosídeo	Extratos	Preventivo e coadjuvante na terapia de resfriados e infecções do trato respiratório e urinário	13 a 36 mg de fenóis totais expressos em ácido caftárico, ácido chicórico, ácido clorogênico e equinacosídeo	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto	Folhas	Cineol	Óleo essencial/extratos/tintura	Anti-séptico e antibacteriano das vias aéreas superiores, expectorante	14 a 42,5 mg de cineol	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo	Folhas	Ginggoflavonóides (22 a 27%), determinados como quercetina, kaempferol e isorhamnetina; e terpenolactonas (5 a 7%), determinadas como ginkgolídeos A, B, C, J e bilobalídeos	Extratos	Vertigens e zumbidos (tinidos) resultantes de distúrbios circulatórios; distúrbios circulatórios periféricos (claudicação intermitente), insuficiência vascular cerebral	26,4 a 64,8 mg de ginggoflavonóides e 6 a 16,8 mg de terpenolactonas	Oral	Venda sem prescrição médica

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Alcaçuz	Raízes	Ácido glicirrizínico	Extratos/ tintura	Expectorante, coadjuvante no tratamento de úlceras gástricas e duodenais	60 a 200 mg de ácido glicirrizínico (expectorante); 200 a 600 mg de ácido glicirrizínico (úlceras gástricas e duodenais)	Oral	Venda sem prescrição médica. Não utilizar continuamente por mais de seis semanas sem acompanhamento médico.
<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamélis	Folhas	Taninos	Extrato/ tintura	Uso interno: hemorroidas. Uso tópico: hemorróidas externas, equimoses	0,35 a 1,0 mg de taninos por 100 mg ou 3,5 a 10 mg de taninos por ml	Tópica e interna	Venda sem prescrição médica
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hipérico	Partes aéreas	Hipericinas totais expressas em hipericina	Extratos/ tintura	Estados depressivos leves a moderados	0,9 a 2,7 mg hipericinas totais expressas em hipericina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Matricaria recutita</i> L.	Camomila	Capítulos florais	Apigenina -7- glicosídeo	Extratos/ tintura	Uso oral: antiespasmódico intestinal, dispepsias funcionais. Uso tópico: antiinflamatório	Uso oral: 4 a 24 mg de apigenina -7- glicosídeo Uso tópico: 0,009 a 0,03 mg de apigenina 7- glicosídeo por 100 mg ou 0,015 mg de apigenina 7- glicosídeo por ml	Oral e tópica, tintura apenas tópica	Venda sem prescrição médica

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.	Espinheira-Santa	Folhas	Taninos totais	Extratos/tintura	Dispepsias, coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal	60 a 90 mg taninos totais	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Melissa officinalis</i> L.	Melissa, Erva-cidreira	Folhas	Ácidos hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico	Extratos/tintura	Carminativo, antiespasmódico, ansiolítico leve	60 a 180 mg de ácidos hidroxicinâmicos expressos em ácido rosmarínico	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	Folhas	30% a 55% de mentol e 14% a 32% de mentona	Óleo essencial	Carminativo, antiespasmódico intestinal, expectorante	60 a 440 mg de mentol e 28 a 256 mg de mentona.	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Mikania glomerata</i> Sprengl.	Guaco	Folhas	Cumarina	Extrato/tintura	Expectorante, broncodilatador	0,5 a 5 mg de cumarina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	Ginseng	Raiz	Ginsenosídeos totais (Rb1, Rg1)	Extratos, tintura	Estado de fadiga física e mental, adaptógeno	5 a 30 mg de ginsenosídeos totais (Rb1, Rg1)	Oral	Venda sem prescrição médica. Utilizar por no máximo três meses.
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Maracujá, Passiflora	Partes aéreas	Flavonóides totais expressos em vitexina	Extratos/tintura	Ansiolítico leve	20 a 64 mg de flavonóides totais expressos em vitexina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Paullinia cupana</i> H.B.;K.	Guaraná	Sementes	Trimetilxantinas (cafeína)	Extratos/tintura	Psicoestimulante/astenia	15 a 70 mg de trimetilxantinas (cafeína)	Oral	Venda sem prescrição médica

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Peumus boldus</i> Molina	Boldo, Boldo-do-Chile	Folhas	Alcalóides totais expressos em boldina	Extratos/tintura	Colagogo, colerético, dispepsias funcionais, distúrbios gastrointestinais espásticos	2 a 5 mg alcalóides totais expressos em boldina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Erva-doce, Anis	Frutos	Trans-anetol	Extratos/tintura	Expectorante, antiespasmódico, carminativo, dispepsias funcionais	0-1 ano: 16 a 45 mg de trans-anetol; 1-4 anos: 32 a 90 mg de trans-anetol; adultos: 80 a 225 mg de trans-anetol	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Piper methysticum</i> G. Forst.	Kava-kava	Rizoma	Kavapironas	Extratos/tintura	Ansiolítico/ansiedade e insônia	60 a 210 mg de kavapironas	Oral	Venda sob prescrição médica. Utilizar no máximo por dois meses.
<i>Polygala senega</i> L.	Polígala	Raízes	Saponinas triterpênicas	Extratos/tintura	Bronquite crônica, faringite	18 a 33 mg de saponinas triterpênicas	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Rhamnus purshiana</i> DC.	Cáscara Sagrada	Casca	Cascarosídeo A	Extratos/tintura	Constipação ocasional	20 a 30 mg de cascarosídeo A	Oral	Venda sem prescrição médica. Não utilizar continuamente por mais de uma semana

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Salix alba</i> L.	Salgueiro branco	Casca	Salicina	Extratos	Antitérmico, antiinflamatório, analgésico	60 a 120 mg de salicina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Sambucus nigra</i> L.	Sabugueiro	Flores	Flavonóides totais expressos em isoquercitrina	Extratos/ tintura	Mucolítico/ expectorante, tratamento sintomático de gripe e resfriado	80 a 120 mg de flavonóides totais expressos em isoquercitrina	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Senna alexandrina</i> Mill., <i>Cassia angustifolia</i> Vahl ou <i>Cassia senna</i> L.	Sene	Folhas e frutos	Derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B	Extratos/ tintura	Laxativo	10 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Serenoa repens</i> (Bartram) J.K. Small	Saw palmetto	Frutos	Ácidos graxos	Extrato	Hiperplasia benigna de próstata e sintomas associados	272 a 304 mg de ácidos graxos	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Symphytum officinale</i> L.	Confrei	Raízes	Alantoína	Extrato	Cicatrizante, equimoses, hematomas e contusões	0,03 a 0,16 mg de alantoína por 100 mg.	Tópica	Venda sem prescrição médica. Utilizar por no máximo 4-6 semanas/ano. Utilizar somente em lesões localizadas, quando abertas

Nomenclatura botânica	Nome popular	Parte usada	Padronização/ Marcador	Derivado de droga vegetal	Indicações/ Ações terapêuticas	Dose Diária	Via de Administração	Restrição de uso
<i>Tanacetum parthenium</i> Sch. Bip.	Tanaceto	Folhas	Partenolídeos	Extratos/ tintura	Profilaxia da enxaqueca	0,2 a 0,6 mg de partenolídeos	Oral	Venda sob prescrição médica. Não usar de forma contínua.
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valeriana	Raízes	Ácidos sesquiterpênicos expressos em ácido valerênico	Extratos/ tintura	Sedativo moderado, hipnótico e no tratamento de distúrbios do sono associados à ansiedade	1,0 a 7,5 mg de ácidos sesquiterpênicos expressos em ácido valerênico	Oral	Venda sem prescrição médica
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Gengibre	Rizomas	Gingeróis (6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol)	Extratos	Profilaxia de náuseas causada por movimento (cinetose) e pós-cirúrgicas	Crianças acima de 6 anos: 4 a 16mg de gingeróis; adulto: 16 a 32mg de gingeróis	Oral	Venda sem prescrição médica

Fonte: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/IN_N_5_2008_anvisa.pdf. Acesso em 25 de set 2013.

Os fitoterápicos são normalmente comercializados como preparações padronizadas, na forma de (extrato em pó) sólido, líquido, ou preparações viscosas. Eles são preparados por maceração, percolação ou destilação, em que são utilizados principalmente etanol, água, ou misturas de etanol e água na produção dos extratos (CALIXTO, 2000; FABRICANT ; FARNSWORTH, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Os medicamentos fitoterápicos apresentam algumas diferenças consideráveis com relação às drogas sintéticas, já que o princípio ativo é frequentemente desconhecido; a disponibilidade, padronização, estabilidade e controle de qualidade são complexos; os estudos clínicos e toxicológicos que comprovem eficácia e segurança são raros, porém a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis parece ser menos frequente; e o custo dos mesmos é geralmente menor do que de drogas sintéticas (CALIXTO, 2000; FABRICANT ; FARNSWORTH, 2001; BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al., 2009; BRASIL, 2012).

Apesar de possuírem constituintes ativos naturais, os fitoterápicos devem ser avaliados como medicamentos, empregando procedimentos rígidos de controle de qualidade, tanto no desenvolvimento quanto na obtenção do mesmo.

2.4 Interações antioxidantes

Interações entre as substâncias presentes nas plantas medicinais são comuns quando se utiliza um fitoterápico. Dessa forma, as respostas farmacológicas são alteradas pelos efeitos de um ou mais antioxidantes na presença de outros componentes da planta (OLIVEIRA, 1986; MA et al., 2009).

As respostas decorrentes desta interação podem acarretar na potencialização do efeito antioxidante, redução da eficácia, aparecimento de reações pró-oxidantes ou ainda, não causar nenhuma modificação no efeito desejado. Assim, a interação entre compostos fenólicos pode ser benéfica ou causar respostas adversas (OLIVEIRA, 1986; MA et al., 2009).

As interações benéficas são fundamentais na ação de defesa antioxidante. Em contrapartida as interações adversas podem acentuar os efeitos indesejados, acarretar ineficácia e/ou potencializar o estresse oxidativo. Desta forma, a interação

entre antioxidantes é uma das variáveis que afeta o resultado fitoterápico (OLIVEIRA, 1986; MA et al., 2009).

A ação antioxidante depende de várias interações no organismo, entre elas a interação farmacocinética e a farmacodinâmica. O perfil farmacocinético do antioxidante está relacionado à absorção, distribuição, metabolização e excreção. Já a interação farmacodinâmica considera os efeitos bioquímicos e fisiológicos no organismo, seus mecanismos de ação e a relação entre concentração e efeito. A ação farmacodinâmica, geralmente, ocorre no sítio ativo do antioxidante ou através de mecanismos bioquímicos específicos, sendo capaz de causar efeitos sinérgicos ou antagônicos (OLIVEIRA, 1986; MA et al., 2009).

Além disso, é importante considerar que a distribuição dos compostos antioxidantes em sistemas biológicos vai depender, entre outros fatores, da sua hidrofiliabilidade/hidrofobicidade e em suas interações com macromoléculas, por exemplo, fosfolípidios presentes nas camadas celulares, importantes na absorção dos compostos fenólicos (ERLEJMAN, VERSTRAETEN ; FRAGA, 2004; SERRA et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009; MA et al., 2009).

Entre os sistemas *in vitro* utilizados para estudo de absorção de compostos, existem dois principais modelos aplicados: Caco-2 (em inglês, *Caucasian colon adenocarcinoma*) e PAMPA (em inglês, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). No modelo Caco-2, a permeabilidade é testada através de uma monocamada de células, enquanto que no método de PAMPA, uma membrana fosfolípídica artificial é utilizada para o mesmo fim (ERLEJMAN, VERSTRAETEN ; FRAGA, 2004; SERRA, 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009).

Embora os modelos celulares *in vivo* forneçam mais informações em termos de transporte ativo, fluxo e metabolismo, estes são mais demorados do que os modelos de membranas artificiais em células *ex vivo*, como PAMPA, que, contudo, fornece apenas correlação de transporte passivo (ERLEJMAN, VERSTRAETEN ; FRAGA, 2004; SERRA, 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009).

2.5 Métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante

Diversas metodologias para medição da atividade antioxidante são descritas na literatura, principalmente, para amostras de fluidos biológicos, extratos de alimentos e plantas, e compostos puros. Cada método varia quanto ao tipo de radical gerado, ao indicador de oxidação empregado e ao método de detecção e quantificação usado. (RE et al., 1999; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999; HUANG, OU, PRIOR et al., 2005).

Os ensaios antioxidantes podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos (RE et al., 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Os radicais livres podem ser gerados por processos físicos, químicos ou enzimáticos. Os métodos físico envolvem técnicas como fotólise ou oxidação fotodinâmica. Já os métodos químicos utilizam sistemas, por exemplo, de Fenton, que contêm um agente redutor e um íon metálico. E, por fim, os métodos enzimáticos empregam as reações com enzimas, principalmente as reações da xantina oxidase e da NAD(P) oxidase na geração de radicais livres (RE et al., 1999; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HUANG, OU, PRIOR, 2005).

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

A seguir serão descritos os métodos empregados neste estudo para avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos frente a diferentes radicais livres.

2.5.1 Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Com isso, pode ser facilmente detectado por métodos espectroscópicos devido a sua intensa absorção na região visível (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004; OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2010).

O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio (Figura 6). Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H^+ sendo então reduzido. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH à amostra, então a capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, de evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Com isso, a porcentagem de DPPH restante é proporcional à concentração de antioxidante (AH) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOLYNEUX, 2004; OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2010).

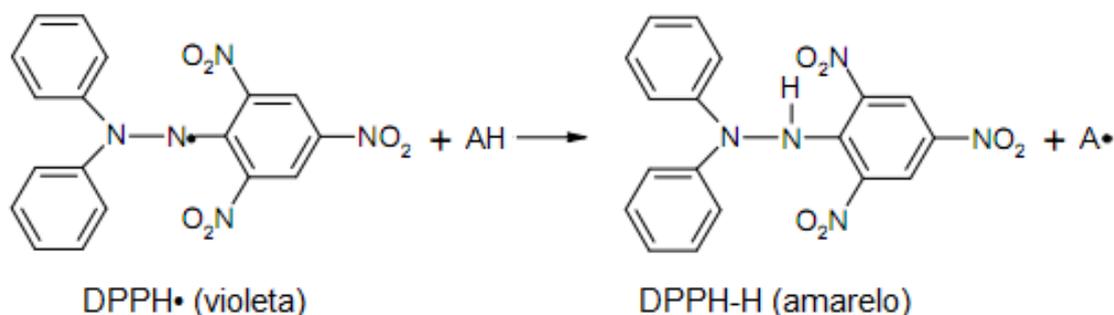


Figura 6 – Reação do DPPH com espécies antioxidantes (MOLYNEUX, 2004).

2.5.2 Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD

O radical $O_2^{\cdot-}$, neste método, é produzido pela oxidação da hipoxantina à xantina, que é oxidada a ácido úrico (Figura 7). E a produção do radical superóxido

ocorre juntamente com a formação ácido úrico (OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2010).

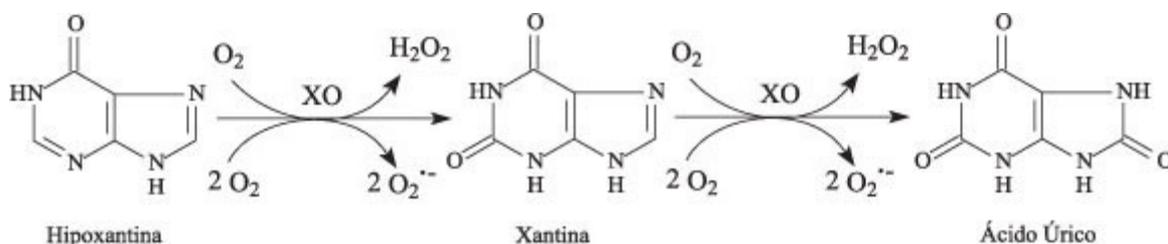


Figura 7 – Reação química de conversão de hipoxantina a ácido úrico no sistema hipoxantina-xantina oxidase (ALVES et al., 2010).

O radical superóxido reduz o nitroazul de tetrazólio (em inglês, *nitro-blue tetrazolium* ou NBT) ao composto formazan, em pH 7,4 e temperatura ambiente (Figura 8). O formazan gerado é medido por espectrofotometria, no comprimento de onda de 560 nm, já que há uma mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazan (OLIVEIRA et al., 2009; ALVES et al., 2010).

O poder antioxidante dos compostos fenólicos é avaliado pela inibição da produção do formazan, uma vez que os compostos reagem com $O_2^{\bullet -}$ presente no meio antes do radical reduzir o NBT. Uma menor formação de formazan corresponde a uma maior ação antirradicalar.

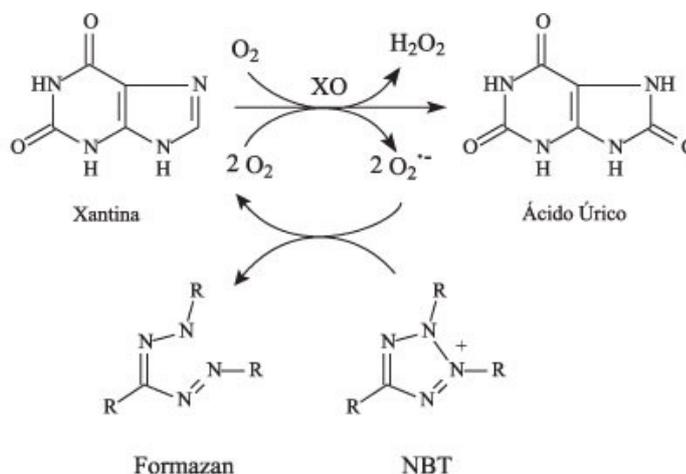


Figura 8 – Reação química de formação do formazan a partir do NBT no sistema hipoxantina-xantina oxidase (ALVES et al., 2010).

2.5.3 Radical Peroxil – Método ANCOMROS

O método ANCOMROS (do inglês, *Antioxidant Competence is Measured by ROS*), desenvolvido por AMADO e colaboradores (2009), com modificações apresentadas por CARVALHO e colaboradores (2013), baseia-se na determinação da capacidade antioxidante total baseada na interação do antioxidante com ROS por fluorescência e emprega o composto DCFH₂-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) como substrato.

Neste ensaio, o antioxidante é exposto ao radical peróxido gerado pela decomposição térmica do ABAP (dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)) na temperatura de 37°C. Ao sistema é adicionado o reagente DCFH₂-DA, após ter sido desacetilado empregando-se o método de Takanashi et al. (1997), gerando o composto DCFH₂. Assim, o composto não fluorescente DCFH₂ é oxidado pelo radical peróxido, gerando a molécula fluorescente DCF•, o qual é detectado por emissão de fluorescência no comprimento de onda de 525 nm, quando excitado em 488 nm (Figura 9) (TAKANASHI et al., 1997; AMADO et al., 2009; CARVALHO et al., 2013).

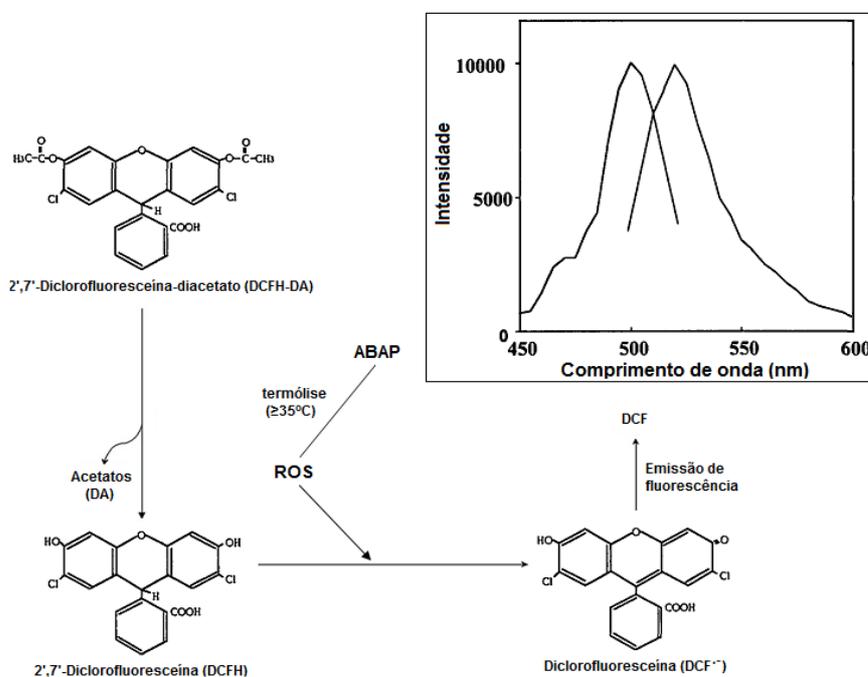


Figura 9 – Fluxograma do método ANCOMROS (TAKANASHI et al., 1997; AMADO et al., 2009).

2.5.4 Radical hidroxil gerado por fotólise do H₂O₂

Recentemente Carvalho e colaboradores (2013) apresentaram um método que emprega um sistema de irradiação para fotodecomposição (fotólise) do H₂O₂ em radicais hidroxilas (Figura 10). Após o processo de fotólise, os compostos fenólicos restantes são determinados por HPLC com detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

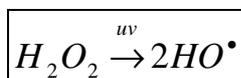


Figura 10 – Reação de fotodecomposição do H₂O₂.

Neste ensaio, a atividade antirradicalar dos compostos polifenólicos é determinada sem a interferência dos subprodutos formados durante a ação antioxidante, com isso há uma melhora na seletividade do medido.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para a determinação simultânea de compostos fenólicos antioxidantes empregando métodos cromatográficos (HPLC) e eletroforéticos (CE) e estudar o comportamento antirradicalar de antioxidantes presentes em extratos de plantas. Além disso, aplicar metodologias para determinação do poder antioxidante *ex vivo* dos compostos fenólicos e, com isso, classificar quantitativamente os antioxidantes quanto a sua contribuição na atividade antirradicalar, bem como avaliar a bioatividade das espécies em de células de córtex e da permeação em biomembranas celulares artificiais lipídicas.

3.1 Objetivos específicos

- Otimizar a separação de diferentes compostos antioxidantes isolados (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, canferol, (+)-catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol, rutina) empregando HPLC e CZE;
- Otimizar a extração dos antioxidantes de plantas medicinais;
- Otimizar o isolamento dos antioxidantes presentes em plantas medicinais empregando extração em fase sólida;
- Aplicar as metodologias desenvolvidas na caracterização química de plantas medicinais com relação à presença de antioxidantes e as suas concentrações percentuais;
- Empregar a espectrometria de massas (MS/MS) na confirmação dos antioxidantes naturais presentes nas plantas medicinais;
- Empregar as metodologias analíticas desenvolvidas (HPLC e CZE) no estudo do decaimento quantitativo dos antioxidantes isolados (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, canferol, (+)-catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina) e naturais frente ao radical HO[•], em diferentes concentrações;

- Avaliar as propriedades antirradicalares, em diferentes concentrações, dos antioxidantes isolados (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido gálico, canferol, (+)-catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol, rutina) e naturais presentes nas plantas medicinais em estudo frente aos radicais $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e ROO^{\cdot} pelo método ANCOMROS, em diferentes concentrações;
- Avaliar as propriedades antirradicalares, em diferentes concentrações, dos antioxidantes isolados (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido gálico, canferol, (+)-catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol, rutina) e naturais presentes nas plantas medicinais em estudo frente aos radicais DPPH;
- Determinar os teores de compostos fenólicos totais nas plantas medicinais em estudo;
- Classificar quantitativamente os compostos antioxidantes quanto a sua contribuição real para a atividade antioxidante total de amostras biológicas pelo estudo *ex vivo*;
- Avaliar a bioatividade das espécies antioxidantes isolados e naturais, a partir de células de córtex;
- Analisar a permeação por biomembranas celulares artificiais lipídicas das espécies antioxidantes isolados e naturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais, reagentes e soluções

Os padrões ácido gálico, (+)-catequina, crisina, fisetina, flavona, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemanha). Ácido cafeico, ácido ferúlico e canferol foram adquiridos de Fluka (Suíça). Todos os padrões de grau analítico, com pureza mínima de 95%, foram usados sem purificação adicional.

Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q UV Synergy (Millipore SA, Molsheim, França). Os solventes, em grau HPLC, metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano e etanol anidro foram obtidos de Tedia Company (EUA).

Os reagentes ácido ortofosfórico (85%, v/v) e carbonato de sódio foram adquiridos de Merck (Alemanha). Éter etílico foi adquirido de F. Maia (Brasil) e ácido clorídrico, fosfato mono e dibásico, de Vetec (Brasil). O reagente Folin-Ciocalteu foi obtido de Próton Química (Brasil). Tetraborato de sódio, hidróxido de sódio, HEPES, ABAP (dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida), DFCH₂-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína), xantina oxidase (XOD) 25UN, hipoxantina, cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT), ácido tiobarbitúrico (TBA), L-a-fosfatidilcolina, dodecano e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foram obtidos de Sigma-Aldrich. DMSO (Dimetilsulfóxido), cloreto de potássio e cloreto de magnésio foram adquiridos de Isofar (Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções estoque dos padrões (1000 mg·L⁻¹) foram preparadas dissolvendo-se quantidade apropriada das substâncias em metanol (grau HPLC) e foram armazenadas em tubos Falcon a -30 °C até a análise. As soluções de trabalho dos compostos fenólicos foram preparadas pela diluição, em metanol, das soluções estoque.

4.2 Amostras

Foram selecionadas 22 plantas medicinais de uso popular no Brasil, sendo que as de procedência da Amazônia foram fornecidas pela Embrapa Amazônia Oriental (Belém/PA). Na Tabela 3 são listadas as amostras estudadas.

Tabela 3 – Relação de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.

Nomenclatura botânica	Nome popular	Estado de procedência
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja	Rio Grande do Sul
<i>Achirocline satureioides</i>	Macela	Rio Grande do Sul
<i>Solidago microglossa D. C.</i>	Arnica	Rio de Janeiro
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Rio de Janeiro
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Rio de Janeiro
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra-pedra	Rio de Janeiro
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	Rio de Janeiro
<i>Mikania glomerata</i>	Guaco	Rio de Janeiro
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	Rio de Janeiro
<i>Laurus nobilis</i>	Louro	Rio de Janeiro
<i>Cyperus rotundus</i>	Tiririca	Rio de Janeiro
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	Rio de Janeiro
<i>Coronopus didymus</i>	Mastruz	Rio de Janeiro
<i>Annona muricata L.</i>	Graviola	Rio de Janeiro
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	Rio de Janeiro
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Terramicina	Rio de Janeiro
<i>Mansoa alliaceae</i> (registro IAN 184394)	Cipó-d'alho	Amazônia
<i>Conarus perrottetii var. angustifolius Radlk.</i> (registro IAN 184393)	Barbatimão	Amazônia
<i>Cecrópia palmata Willd.</i> (registro IAN 185556)	Embaúba-vermelha	Amazônia
<i>Cecrópia obtusa</i> (registro IAN 185555)	Embaúba-branca	Amazônia
<i>Bauhinia variegata</i> (registro IAN 185932)	Pata-de-vaca	Amazônia
<i>Bauhinia var. alboflava Wit</i> (registro IAN 185831)	Pata-de-vaca	Amazônia

As amostras foram secas a 40°C, por 12 horas, em estufa 305 Biomatic (Rio Grande do Sul, Brasil) e, trituradas em micro-moinho MA-630/I (Marconi

Equipamentos para Laboratório, São Paulo, Brasil), em rotação de 27.000 rpm, por 40 segundos. As amostras em pó (tamanho de partícula <1 mm) foram armazenadas em freezer até o momento da análise. Já as amostras da Embrapa Amazônia Oriental foram fornecidas como matéria seca pronta para elaboração dos extratos.

4.3 Instrumentação

As separações cromatográficas foram realizadas em um sistema HPLC Knauer (Berlim, Alemanha), que consiste em um módulo Smartline Pump 1000 acoplado a um Smartline Manager 5000, e em um espectrofotômetro UV baseado na tecnologia de arranjos de diodos, modelo Detector UV Smartline 2600, equipado com um software ChromGate® (Knauer), versão 3.3.1. As corridas cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) usando uma coluna em fase reversa Eurospher® 100-5, do tipo C₁₈, de dimensões 4,6 mm × 250 mm, tamanho de partícula de 5 µm (Knauer) com uma coluna de guarda Acclaim® 120, do tipo C₁₈, de dimensões 4,3 mm × 10 mm, tamanho de partícula de 5 µm (Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA). O injetor de amostras era dotado de uma alça de amostragem com volume de 10 µL.

Para as medidas de absorvância, um espectrofotômetro UV-Visível 8453 Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com detector arranjo de diodos, foi usado com uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

Para medições de fluorescência, um fluorímetro Vitor 2 (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) foi utilizado.

4.4 Procedimentos analíticos

Para o desenvolvimento do processo de extração das plantas medicinais, exceto as procedentes da Amazônia, foram utilizadas duas espécies vegetais (*Baccharis trimera* e *Achyrocline satureioides*).

Para a extração dos compostos antioxidantes presentes nas plantas medicinais em estudo foram testadas três metodologias baseadas no esgotamento vegetal à quente (extração 1), no esgotamento vegetal à frio (extração 2) e na hidrólise ácida (extração 3) dos compostos.

No esgotamento vegetal à quente (extração 1) foi empregada a extração do tipo Soxhlet e extração líquido-líquido com diferentes solventes e polaridades, conforme Figura 11.

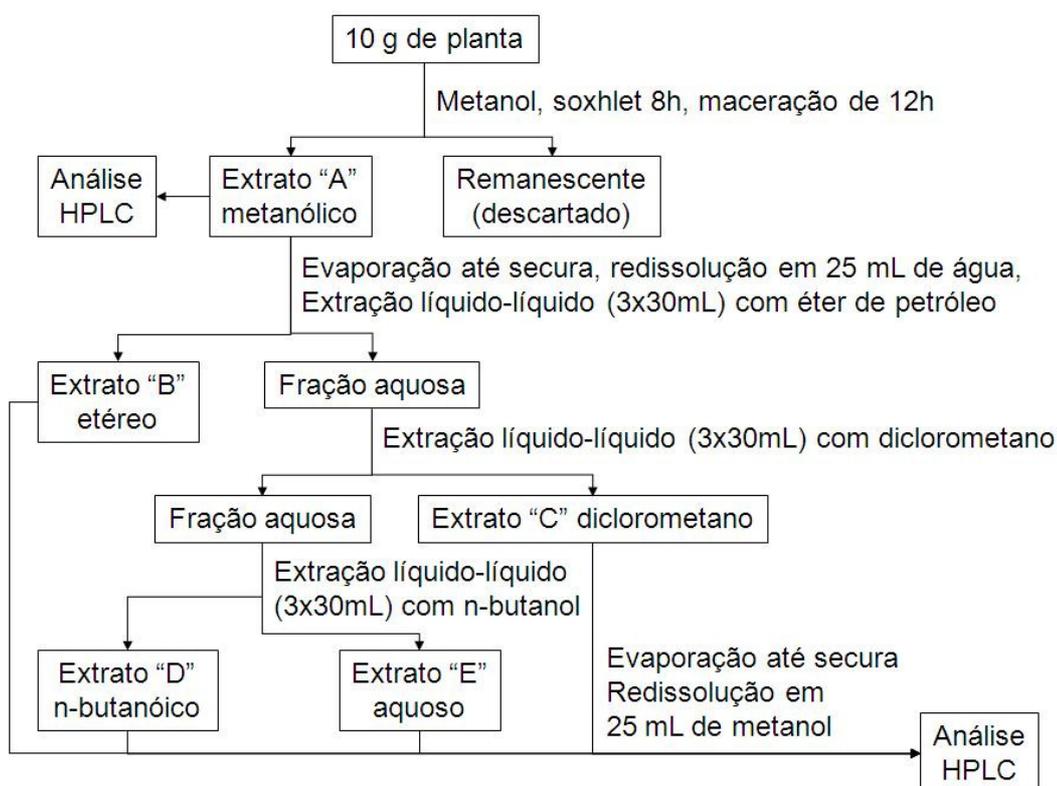


Figura 11 – Esgotamento vegetal à quente (extração 1).

O esgotamento vegetal à frio (extração 2) empregou a extração sólido-líquido com diferentes solventes/polaridades, conforme esquema mostrado na Figura 12.

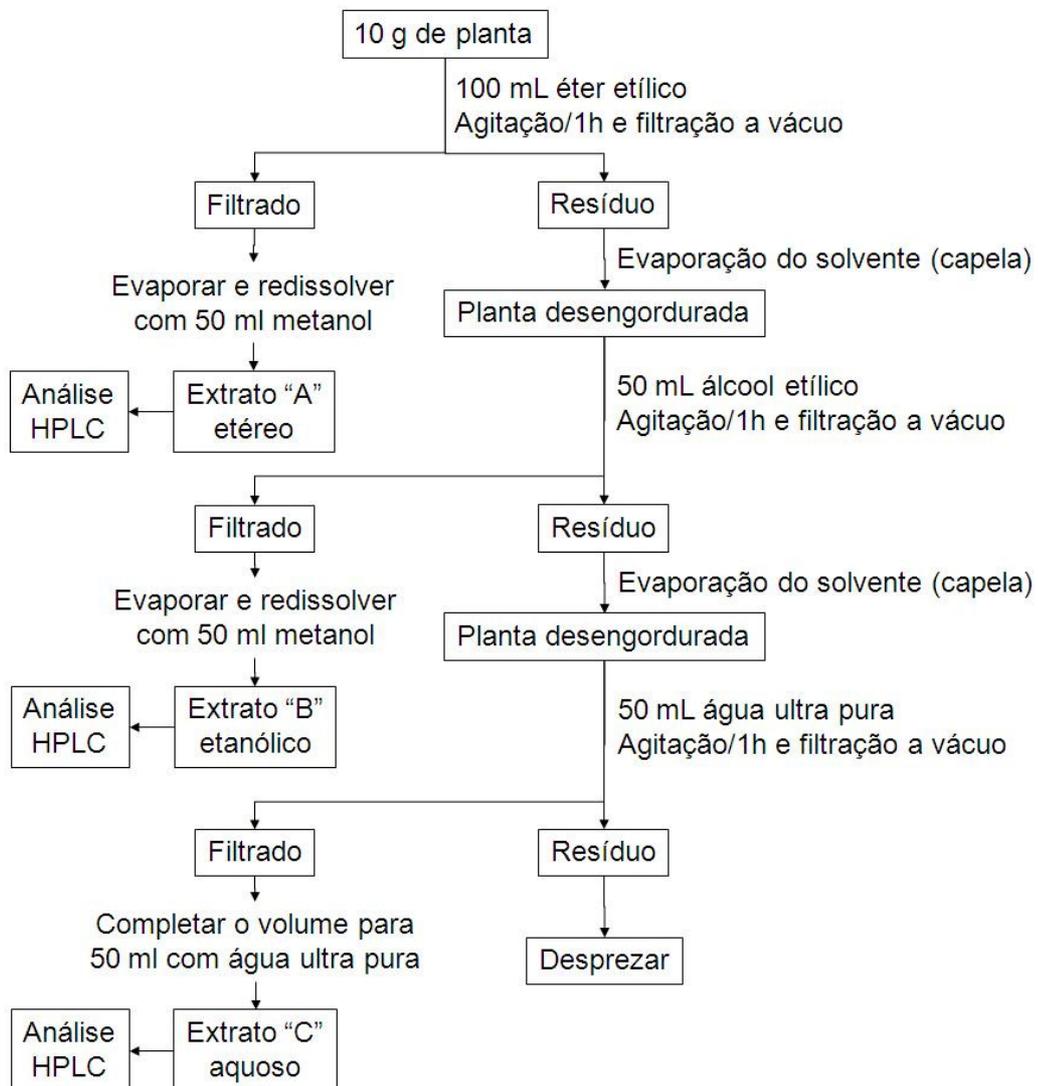


Figura 12 – Esgotamento vegetal à frio (extração 2).

A extração por hidrólise ácida (extração 3), do tipo sólido-líquido, foi realizada na amostra com metanol acidificado a 0,01% de ácido clorídrico, conforme esquema da Figura 13.

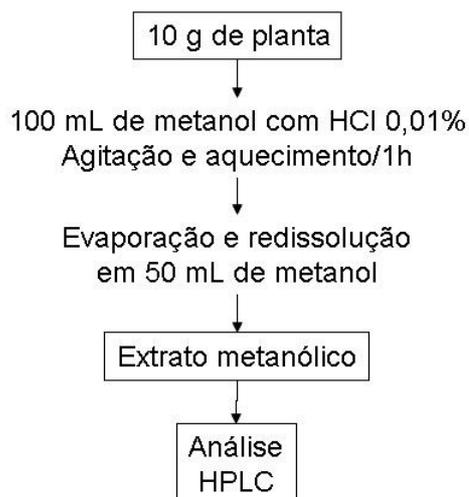


Figura 13 – Hidrólise ácida (extração 3) realizada nas plantas medicinais.

Assim, das metodologias extrativas avaliadas neste estudo, a extração por esgotamento vegetal à quente em extrator Soxhlet foi a que apresentou os melhores resultados cromatográficos, quando comparados com as outras extrações e, por esse motivo, foi selecionada para dar continuidade aos estudos de caracterização dos extratos de plantas medicinais por HPLC. Todos os extratos foram filtrados em membrana de acetato de celulose Sartorius® (Goettingen, Alemanha) com 0,45 µm de diâmetro de poro. O filtrado foi armazenado (no máximo por 1 mês) a -30°C em tubos Falcon até o momento da análise.

As plantas medicinais procedentes da Amazônia foram extraídas pelo método, já estabelecido conforme Brum et al. (2013) e Zadra et al. (2012). Em que uma porção de 450 gramas de planta seca foi macerada e deixada em repouso à temperatura ambiente com etanol a 70%, v/v, (hidroetanólico) durante 7 dias, com agitação diária. O solvente foi renovado a cada semana durante quatro semanas. Depois de filtrado, o extrato hidroalcóolico foi evaporado sob pressão reduzida abaixo de 40 °C a fim de obter o extrato concentrado. Parte do extrato concentrado foi evaporado até à secura, para fornecer um extrato bruto.

O extrato remanescente foi submetido a sucessivas extrações líquido-líquido com n-butanol e acetato de etila, sendo que as frações resultantes foram secas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida abaixo de 40 °C. Para as medidas, as frações foram ressuspensas em metanol a uma concentração de 2% (m/v), onde pesou-se 0,1 g de cada fração para cada 5 mL de metanol. A fração extraída com

clorofórmio não foi analisada, porque os métodos de análise desenvolvidos neste estudo caracterizam os compostos polares.

4.4.1 Isolamento dos antioxidantes naturais por extração em fase sólida

Os extratos de plantas foram submetidos a um processo de *clean-up* (eliminação de interferentes) por extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). Para tal procedimento utilizou-se cartuchos Strata Phenomenex C18-E, os quais foram condicionados com 6,0 mL de metanol:água (1:1, v/v, pH 2,0) e, em seguida, equilibrados utilizando-se 6,0 mL de água ultrapura (pH 2,0). Na sequência, um volume de 2,0 mL dos extratos diluídos em metanol/água (1:4, v/v, pH 2,0) foi percolado em cada cartucho a uma vazão de $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, seguido da adição de 3,0 mL de água ultrapura (pH 2,0) para enxágue. Os cartuchos foram então secos pela passagem de ar atmosférico, forçada com auxílio de uma bomba de vácuo, por 20 minutos.

Os analitos retidos foram, posteriormente, eluídos com 2,0 mL de metanol. O eluato foi injetado diretamente no sistema HPLC. Em todas as etapas citadas, o pH das soluções foi ajustado utilizando-se ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e pHmetro de bancada modelo 827 (Metrohm, Herisau, Suíça).

4.4.2 Identificação e quantificação dos antioxidantes naturais

4.4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Um método cromatográfico foi desenvolvido para identificação e quantificação dos antioxidantes. Neste um método cromatográfico, empregou-se um gradiente de eluição com ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) como solvente A e acetonitrila como

solvente B. As condições de eluição foram: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). As condições de vazão foram: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min.). Foi aplicado um período de reequilíbrio de 10 min entre as injeções.

A detecção foi realizada simultaneamente nos comprimentos de onda de 206, 254, 320 e 360 nm. A identificação e quantificação dos antioxidantes presentes nos extratos das plantas medicinais em estudo foram em triplicata, baseadas na comparação entre os sinais cromatográficos dos extratos e dos padrões autênticos, através dos tempos de retenção, dos dados espectrais no UV-Vis e de adição das soluções-padrão nos extratos. Os compostos em estudo foram quantificados pelo método de adição de padrão e as curvas de calibração foram construídas plotando-se área do pico *versus* concentração do padrão adicionado, em mg·L⁻¹.

4.4.2.2 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

As medidas eletroforéticas foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar HP^{3D} (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) controlado por um software ChemStation 3D-CE, versão 10.02. Todas as separações foram desenvolvidas utilizando-se um capilar de sílica fundida de 66 cm de comprimento total (60 cm de comprimento efetivo) × 50 µm de diâmetro interno (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado por lavagem com NaOH (1 mol·L⁻¹) por 3 min, NaOH (0,1 mol·L⁻¹) por 3 min e tampão de corrida por 5 min. Entre as corridas, as seguintes etapas de lavagem foram realizadas: 3 min com água ultrapurificada, 2 min com NaOH (0,1 mol·L⁻¹), 2 min com ultrapurificada, e 5 min com o eletrólito de corrida. O método eletroforético de análise empregado teve como eletrólito de trabalho o tetraborato de borato de potássio 15 mmol·L⁻¹ com pH 9,2, acrescido de uma concentração final de metanol de 10% (v/v) e potencial de separação de 20 kV. A detecção foi realizada simultaneamente nos mesmos comprimentos de onda empregados em HPLC.

4.4.2.3 Confirmação dos compostos antioxidantes por ESI-MS/MS

As análises para confirmação da presença/ausência dos antioxidantes nas plantas medicinais estudadas foram realizadas por espectrometria de massa tandem (MS/MS) em um Micromass Quattro Micro API instrumento Waters (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) com uma fonte de electrospray (ESI). Argônio ultra puro (Ar) foi utilizado como gás de colisão e azoto (N₂) de elevada pureza como gás de nebulização.

As condições otimizadas de análise para espectrometria de massa foram como se segue: voltagem capilar da fonte iônica foi 0,5 e 5,0 kV para cada antioxidante, a voltagem do cone foi de 10 a 50 V, temperatura da fonte a 120 °C e a temperatura de dessolvatação a 400 °C. Para a análise de verificação completa do MS, espectros de íons negativos da eluição da coluna foram registrados na gama de m/z 100-700. A energia de colisão de dissociação induzida por colisão (CID) foi entre 10 e 50 eV. O fluxo da infusão, o gás de dessolvatação e gás cone foram, respectivamente, de 50, 800 e 100 L min⁻¹. Os dados foram analisados usando o software MassLynx V4.1.

4.4.3 Validação dos métodos de separação

Os métodos de separação para caracterização dos antioxidantes foram validados. Os parâmetros analíticos empregados foram: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade foi realizada através da avaliação com detector de arranjo de diodos, que compara o espectro do pico obtido na separação com o do padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

A linearidade foi analisada pela correlação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração do analito a ser quantificado. Essa relação matemática foi expressa como uma equação de reta (curva analítica), com sete pontos, não

incluindo o ponto zero na curva. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir do conjunto de medições experimentais foi efetuada pelo método matemático de regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também foi calculado o coeficiente de correlação r.

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão absoluto (s), expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) e avaliada através do Teste F. Em que, a repetitividade foi efetuada sob a mesma condição de medição (procedimento, analista, instrumento e local), com seis determinações de uma mesma concentração similar ao valor esperado. Já a precisão intermediária foi determinada pela análise da medição de uma concentração conhecida em diferentes dias.

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, em que quantidades conhecidas de padrão do antioxidante em estudo foi adicionada à amostra, e então recuperada, e avaliada a partir do teste t de Student.

O limite de detecção foi baseado nos parâmetros da curva analítica construída para cada analito, utilizando a relação 3:1,. Expresso como na equação 1:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão branco e S é o coeficiente angular da curva analítica.

Já para calcular o limite de quantificação foi utilizado o mesmo critério do limite de detecção, utilizando a relação 10:1, em que o desvio padrão da resposta (s) do branco e o coeficiente angular da curva analítica (S), a partir da equação 2:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

4.4.4 Quantificação dos compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu

O conteúdo de compostos fenólicos totais nos extratos foi medido pelo método de Folin-Ciocalteu (MARINOVA, RIBAROVA ; ATANASSOVA, 2005; ATANASSOVA, GEORGIEVA ; IVANCHEVA, 2011; LIN ; TANG, 2007; HUO et al., 2011; JANOVIK et al., 2011). Este método é baseado na medição da mudança de cor causada pela redução do reagente Folin-Ciocalteu por fenolatos na presença de carbonato de sódio.

Uma alíquota de 100 μL do extrato da planta foi adicionada a 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e, após cinco minutos, 2 mL de Na_2CO_3 7,5% (m/v), também foram adicionados. Depois de 60 minutos na ausência de luz, a absorvância foi medida em 740 nm. O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado em miligramas de equivalentes de ácido gálico ($\text{mg GAE}\cdot\text{L}^{-1}$), usando uma curva padrão preparada em diferentes concentrações de ácido gálico ($0,075 - 0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e foi relatado em termos de mg/g (GAE/planta).

Para efeitos de comparação, após identificação e quantificação dos antioxidantes majoritários nas plantas por HPLC, a concentração destes, na planta, foi reportada em termos de mg/g (GAE/planta) (C_{GAE}). Isto pode ser expresso como:

$$C_{\text{GAE}} = [(C_A/M_A) \times M_{\text{GA}}]/1000 \quad (3)$$

Onde C_A é a concentração de antioxidantes na planta ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), M_A é a massa molar do antioxidante determinado ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e M_{GA} é a massa molar de ácido gálico ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), igual a 170,12.

4.4.5 Avaliação da atividade antirradicalar *in vitro*

Os ensaios de avaliação da atividade antirradicalar dos antioxidantes isolados e naturais foram classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, também denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, também denominados de métodos indiretos (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BERSET, 1997; RE et al., 1999; SILVA, BORGES ; FERREIRA, 1999; HUANG, OU, PRIOR, 2005; SOUSA et al., 2007).

Os experimentos foram realizados em diferentes concentrações, tanto para os antioxidantes isolados (em concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), quanto para os naturais (em concentrações de 1, 10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), os quais são extraídos das plantas medicinais. O solvente utilizado para solubilizar os antioxidantes foi metanol, exceto para a análise da atividade antirradicalar frente ao ROO^{\bullet} , em que foi utilizado DMSO.

4.4.5.1 Radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BERSET, 1997; RE et al., 1999; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999; HUANG, OU, PRIOR, 2005; SOUSA et al., 2007). Monitorou-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras através da medida do decréscimo dos valores de absorvância das soluções em função do tempo.

As amostras foram monitoradas frente a uma concentração inicial de DPPH igual a 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As medidas de absorvância foram realizadas em triplicata, no comprimento de onda (λ) 515 nm e a atividade antirradicalar (AA_{DPPH}) foi expressa como:

$$AA_{\text{DPPH}} = \{[A_{\text{DPPH}} - (A_A - A_B)] \times 100\} / A_{\text{DPPH}} \quad (4)$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância inicial do DPPH, A_A é a absorvância da amostra e A_B é a absorvância inicial da amostra.

4.4.5.2 Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD

O poder da ação antirradicalar dos antioxidantes frente ao radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi determinada pelo sistema enzimático HPX/XOD (ZHAO et al., 2008), em que adicionou-se 100 μL de EDTA ($30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 100 μL de HPX ($3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 200 μL de NBT ($1,42 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) a 100 μL de amostra. Esperou-se 3 minutos e adicionou-se 100 μL da enzima XOD ($0,75 \text{ unit}\cdot\text{mL}^{-1}$, diluída com tampão fosfato). O volume foi completado a 3 mL com tampão fosfato ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4), composto de fosfato mono e dibásico. O branco das amostras continha todos os reagentes exceto o NBT. Concomitantemente, conduziu-se um controle contendo todos os reagentes com o solvente utilizado nas amostras, e um branco do controle sem NBT. Após o tempo reacional de 40 minutos, a leitura espectrofotométrica foi realizada a 560 nm. A atividade antirradicalar ($AA_{\text{O}_2^{\cdot-}}$) foi calculada conforme equação 3,

$$AA_{\text{O}_2^{\cdot-}} = \{1 - [(A - A_B)/(C - C_B)]\} \times 100 \quad (5)$$

Onde A é a absorvância da amostra, A_B é a absorvância do branco da amostra, C é a absorvância do controle e C_B é a absorvância do branco do controle.

4.4.5.3 Radical Peroxil – Método ANCOMROS

A avaliação da capacidade antirradicalar dos antioxidantes isolados e naturais frente ao ROO[•], foi realizada pelo método fluorimétrico, o qual emprega o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) como substrato (AMADO et al., 2009).

Para a montagem da placa de análise (Figura 14) contendo 96 poças divide-se a mesma em duas regiões, sendo que a região 1 (branco das medidas) corresponde às linhas A, B, C e D, e a região 2 corresponde às linhas E, F, G e H. As 3 primeiras poças, tanto na região 1 quanto na 2, são reservadas para o solvente, em que adiciona-se 10 µL do solvente utilizado nas amostras. No restante da placa, adiciona-se 10 µL de amostra (antioxidante sintético ou natural) em triplicata (3 poças) na região 1 e na região 2. Após, adiciona-se o tampão de reação (127,5 µL), em todas as poças da placa. Por fim, adiciona-se 7,5 µL de água ultrapura na região 1 e 7,5 µL da solução de ABAP (4 mmol·L⁻¹) na região 2. Imediatamente antes da análise da placa, no fluorímetro, é adicionado 10 µL de DCFH₂-DA (16 µmol·L⁻¹), previamente desacetilado. O fluorímetro foi programado para manter a temperatura a 37°C e medir a fluorescência nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) a cada 5 minutos, num intervalo total de 30 minutos.

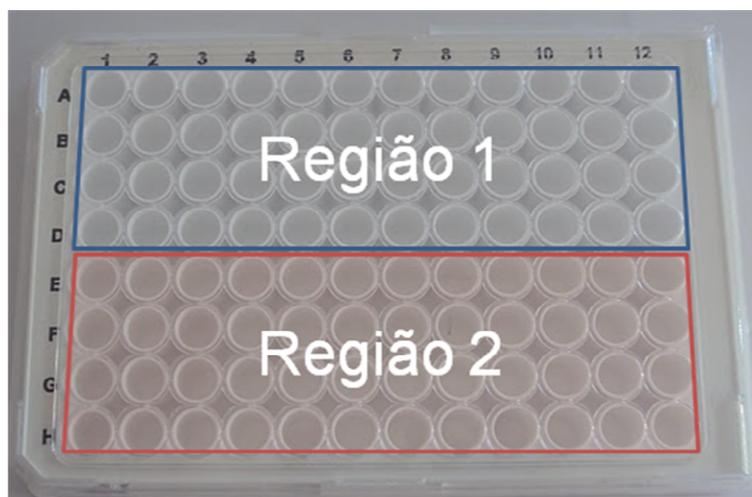


Figura 14 – Placa de análise do método ANCOMROS.

O tampão de reação utilizado nesta determinação foi composto de HEPES ($30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), KCl ($200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e MgCl_2 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). A desacetilação química do $\text{DCFH}_2\text{-DA}$, gerando o composto DCFH_2 , foi realizada com a adição de 2,0 mL de NaOH ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em uma solução etanólica de ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de $\text{DCFH}_2\text{-DA}$, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 30 minutos, adicionou-se 10 mL de tampão fosfato 25 mmol L^{-1} (pH 7,4), composto de fosfato mono e dibásico, armazenando-se a solução em gelo até o momento do uso.

A atividade antirradicalar contra o radical peroxil ($\text{AA}_{\text{ROO}\cdot}$) dos antioxidantes isolados e naturais foi determinada com base na medida referente ao tempo de 30 minutos de reação, e calculada conforme equação 6,

$$\text{AA}_{\text{ROO}\cdot} = \left\{ 1 - \left[\frac{(F_A - F_{AB})}{(F_S - F_{SB})} \right] \right\} \times 100 \quad (6)$$

Onde F_A é a fluorescência da amostra, com ABAP, F_{AB} é a fluorescência do branco da amostra, sem ABAP, F_S é a fluorescência do solvente utilizado nas amostras, com ABAP, e F_{SB} é a fluorescência do branco do solvente, sem ABAP.

4.4.5.4 Radical Hidroxil gerado pela fotólise do H_2O_2

Para a determinação da capacidade antirradicalar dos antioxidantes isolados e naturais frente ao $\text{OH}\cdot$, gerado pela fotólise do H_2O_2 , seguiu-se a metodologia descrita por LIMA (2010). Nesta, foi utilizado um reator fotoquímico e as análises foram realizadas por HPLC, empregando o método cromatográfico (descrito na seção 4.4.2.1), nos comprimentos de onda específicos de cada composto estudado (ANEXO B).

No reator fotoquímico (Figura 15), uma lâmpada de mercúrio de alta pressão com potência nominal de 80 W (a), foi empregada como fonte de radiação (marca General electric). A lâmpada com o bulbo exposto foi afixada na parte central do

sistema onde está posicionado o soquete da lâmpada. A caixa de madeira forrada com papel alumínio (b) que envolve o sistema é na forma de cubo e apresenta 21,5 cm de aresta.

O sistema de resfriamento é constituído de um *cooler* (c) (marca Ruilian Science Technology), igual a ventiladores usados em computadores, posicionado na parte superior do sistema, o qual foi acionado durante todo o funcionamento da lâmpada. A temperatura máxima de operação do sistema foi de 25 ± 2 °C. A avaliação foi realizada após estabilização do sistema (30 min). O suporte para 12 tubos de quartzo (d) foi construído em madeira, com dimensões precisas, de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema circundando o bulbo da lâmpada.

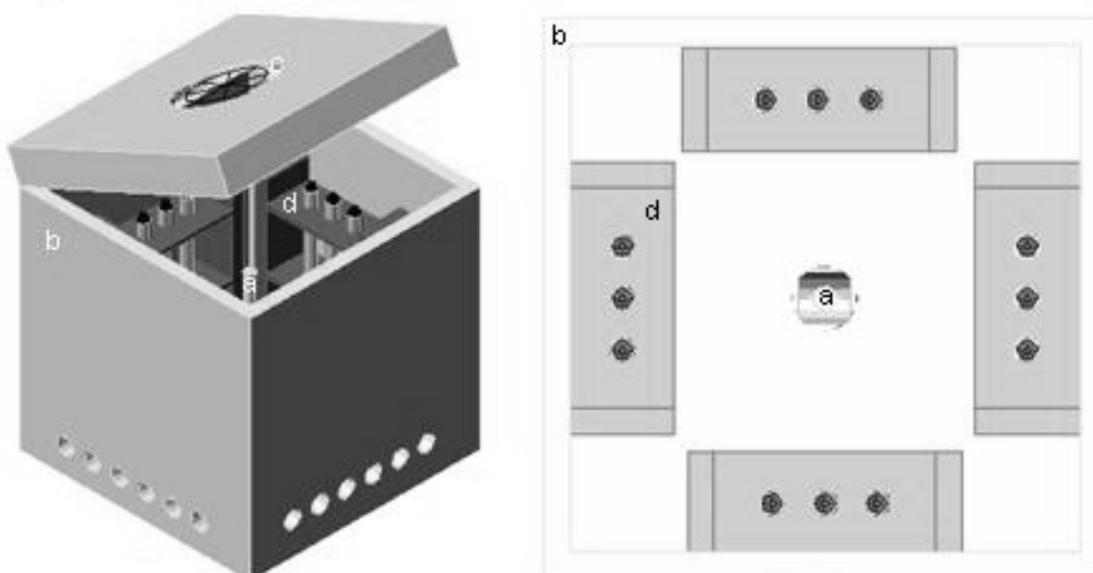


Figura 15 – Representação esquemática do sistema de irradiação UV com fonte de radiação de Hg: (a) lâmpada de Hg (80 W); (b) caixa de madeira forrada com papel alumínio; (c) *cooler*; (d) suporte para os tubos de quartzo; (e) tubos de quartzo.

Os ensaios foram realizados em triplicata, com a adição de 10 μL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v, $0,29 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 10 mL de cada amostra de antioxidante sintético e natural. Os mesmos ensaios foram realizados na ausência do peróxido de hidrogênio. Para expressar a capacidade antirradicalar ($\text{AA}_{\text{OH}\cdot}$) foi utilizada a seguinte equação 7:

$$AA_{OH\cdot} = \{1 - [(A_{UV} - A_{UV+H_2O_2})/A_{UV}]\} \times 100 \quad (7)$$

Onde, A_{UV} é a área do pico do antioxidante sem H_2O_2 e A_{UV+OH} é a área do pico do antioxidante com H_2O_2 .

4.4.6 Avaliação da atividade antirradicalar *ex vivo*

4.4.6.1 Animais

Foram utilizados quarenta ratos machos Wistar (250-300 g) de nossa própria colônia de reprodução. Os animais foram colocados em grupos de cinco animais em caixas feitas de Plexiglas com medidas de 42 x 34 x 16 cm, com o piso coberto com serradura. Eles foram mantidos em uma sala com ciclo claro-escuro de 12 h com as luzes acesas entre 07:00 e 19:00 horas e temperatura (20-25 °C) controlada recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Cuidados e Uso de Animais Experimentais Recursos da Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

4.4.6.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle, apenas manipulados para a manutenção necessária de suas gaiolas em bom estado de saúde, e do grupo de estresse, que recebeu um tratamento de estresse por contenção repetido por um período de 40 dias. No dia 14 deste período experimental, cada grupo inicial foi subdividido em dois grupos distintos:

- 1) Grupo controle: controle (C) e controle com o antioxidante em estudo (CC).
- 2) Grupo de estresse: estresse (S) e estresse com o antioxidante em estudo (SC).

4.4.6.3 Modelo de estresse repetido por contenção

Condição de estresse foi realizada de acordo com o modelo de estresse repetido por contenção, como descrito por Ely et al. (1997). Os animais foram imobilizados em tubos de plásticos de 25 x 7 centímetros de diâmetro, que foram adaptadas ao tamanho do animal. O comportamento dos animais foi realizado uma hora por dia, 5 dias por semana, durante 40 dias no período da manhã entre 08:00 e 10:00 horas. O grupo controle foi tratado apenas e, portanto, não sujeito à situação de estresse repetido.

4.4.6.4 Tratamento

Os animais dos grupos CC e SC receberam os antioxidantes isolados (30 mg/kg) durante 27 dias consecutivos, de acordo com Calegari (2007), na água de beber ao fim de 14 dias após o início do período de teste. Os ratos não tratados com a droga (grupos C e S) receberam água regular. Os antioxidantes foram colocados em frascos escuros, devido à sua fotossensibilidade. O consumo de água foi analisado por animais diariamente, a fim de ajustar a dose a ser administrada.

4.4.6.5 Preparação do tecido

No final do período de tratamento, os ratos foram mortos por decapitação. O cérebro foi removido e o córtex cerebral foi rapidamente dissecado, colocado em gelo e, imediatamente, homogeneizado a frio com 50 mmol·L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,4. O homogenato foi centrifugado em 4,000 x g durante 10 min para se obter a fração de sobrenadante de baixa velocidade, que foram utilizados para os diferentes ensaios bioquímicos em todos os ensaios.

4.4.6.6 Determinação dos níveis de Diclorofluoresceína Oxidado (DCFH-DA)

Níveis de diacetato 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) foram determinados como um indicador da produção de peróxido pelos componentes celulares. Este método experimental de análise baseia-se na desacetilação da sonda de DCFH-DA, e a sua oxidação subsequente por espécies reativas de DCFH-DA, um composto altamente fluorescente (HALLIWELL, 2007). A fração sobrenadante do córtex cerebral foram adicionados a um meio contendo tampão Tris-HCl (10 mmol·L⁻¹, pH 7,4) e DCFH-DA (1 mmol·L⁻¹). Após a adição DCFH-DA, o meio foi incubado no escuro durante 1 h até a medição da fluorescência (comprimentos de onda de excitação e emissão a 488 e 525 nm, respectivamente, com larguras de fenda de 1,5 nm). Níveis de DCFH-DA foram determinadas utilizando uma curva padrão de DCF e os resultados foram corrigidos pelo teor de proteína (BALK et al.,2010).

4.4.6.7 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A medição da atividade de CAT foi determinada de acordo com o método proposto por Aebi (1984). A fração sobrenadante do córtex cerebral (40 µl) foi

adicionado a um meio contendo K^+ -tampão fosfato ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4) e H_2O_2 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). A análise cinética da catalase foi iniciada após adição de H_2O_2 e a taxa de decomposição do H_2O_2 foi medida por espectrofotometria de absorção molecular no comprimento de onda de 240 nm durante 120 segundos. Uma unidade da enzima foi considerada como a quantidade de enzima que decompõe H_2O_2 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 7,0 (BALK et al.,2010).

4.4.6.8 Determinação da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi determinada no córtex cerebral de acordo com o método proposto por Misra e Fridovich (1972). Este método baseia-se na capacidade de inibição da SOD em autooxidação da adrenalina para adrenocromo. Resumidamente, a fração do sobrenadante (20-60 μl) foi adicionado a um meio contendo tampão de glicina ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 10,5) e adrenalina ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). A análise cinética de SOD foi iniciada depois da adição da adrenalina, e a reação de cor foi medida no comprimento de onda de 480 nm (BALK et al.,2010).

4.4.7 Avaliação da permeabilidade celular dos antioxidantes estudados

A avaliação da permeabilidade celular – PAMPA – foi realizada de acordo com o protocolo da Millipore® (nº PC040EN00). Este ensaio consistiu numa placa de microtitulação de 96 poças, que serve como câmara de doador e uma placa de filtro de 96 poços (MultiScreen IP, Millipore, Bedford, MA, EUA), que serve como o compartimento aceitador. A placa doadora é colocada diretamente sobre a placa aceitadora, conforme Figura 16. A placa doadora contém discos de microfiltro hidrofóbico (Immobilion-P de membrana de $0,45 \mu\text{m}$), que foram impregnados com uma solução de fosfolípido, conforme Figura 17 (CHEN et al., 2008).

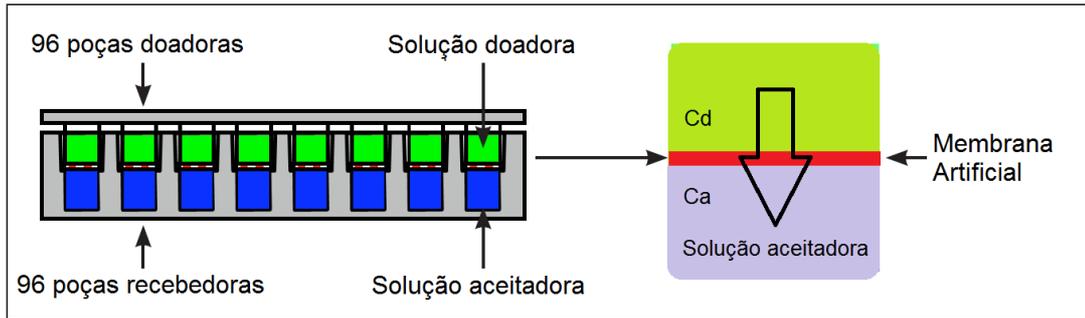


Figura 16 – Esquema de montagem da placa de análise do método PAMPA (adaptado de CHEN et al., 2008).

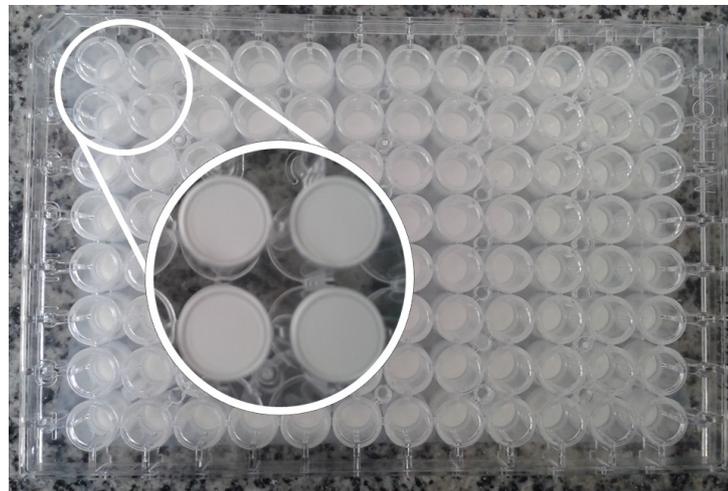


Figura 17 – Placa de análise do método PAMPA, com imagem de aproximação dos discos de microfiltro hidrofóbicos.

Nestes testes, 5 μL de uma solução de L-a-fosfatidilcolina em dodecano 2% (m/v) foi adicionado a cada poça, formando uma membrana fosfolipídica. O tampão fosfato salino (PBS, em inglês *phosphate buffered saline*) de pH 6,45 foi preparados com a mistura de NaCl $1,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl $26,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2HPO_4 $120,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e KH_2HPO_4 $17,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os ensaios para cada amostra foram realizados sem gradiente de pH entre os reservatórios aceitador e doador.

Nos ensaios, a concentração dos antioxidantes isolados e naturais foi de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que as plantas estudadas foram as que apresentaram um marcador analítico. As soluções foram preparadas no tampão PBS. Após 60 min, as duas

placas foram separadas, e as soluções receptoras foram analisadas utilizando por HPLC-DAD. O cálculo do coeficiente de permeabilidade efetiva ($\text{Log } P_e$, cm/s) foi realizado conforme descrito por Chen e colaboradores (2008), através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Log } P_e = \text{Log} \left[C_X - \ln \left(\frac{1 - C_A}{C_{\text{equilibrium}}} \right) \right]$$

Onde:

$$C_X = \frac{(V_D \times V_A)}{[(V_D + V_A) \times A \times \text{porosidade} \times t]}$$

$$C_{\text{equilibrium}} = \frac{[C_D \times V_D + C_A \times V_A]}{V_D + V_A}$$

Onde:

C_A (t): concentração do antioxidante no compartimento aceitador no tempo t;

C_D (t): concentração do antioxidante no compartimento doador no tempo t;

V_D : volume do compartimento doador;

V_A : volume do compartimento aceitador;

A: área do filtro (cm²);

Porosidade: porosidade do filtro

t: tempo de incubação (segundos).

4.4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan e Tuckey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados são expressos como média (erro padrão da média).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de compostos fenólicos em plantas medicinais

Para a extração dos compostos antioxidantes presentes nas plantas medicinais, provenientes do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro, em estudo foram testadas três metodologias baseadas no esgotamento vegetal à quente (extração 1), no esgotamento vegetal à frio (extração 2) e na hidrólise ácida (extração 3) dos compostos. Segundo Naczk ; Shahidi (2004), a extração de compostos fenólicos em plantas é influenciada pela natureza química das espécies, pelo método de extração empregado, pelo tamanho de partícula de amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como pela presença de substâncias interferentes, o que justifica as diferentes metodologias avaliadas.

No esgotamento vegetal à quente (extração 1) foi empregada a extração do tipo Soxhlet, método usado frequentemente para isolar flavonoides e ácidos fenólicos (CASTRO ; GARCÍA-AYUSO, 1998; WANG ; HUANG, 2004; MOLNÁR-PERL ; FÜZFAI, 2005; BIMAKR et al, 2011; ROSA, ALVAREZ-PARRILLA, GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010), e extração líquido-líquido com diferentes solventes e polaridades, conforme Figura 11.

As análises cromatográficas dos extratos “A” (metanólico), “B” (etéreo), “C” (diclorometano), “D” (n-butanólico) e “E” (aquoso), gerados na extração 1, são apresentadas na Figura 18.

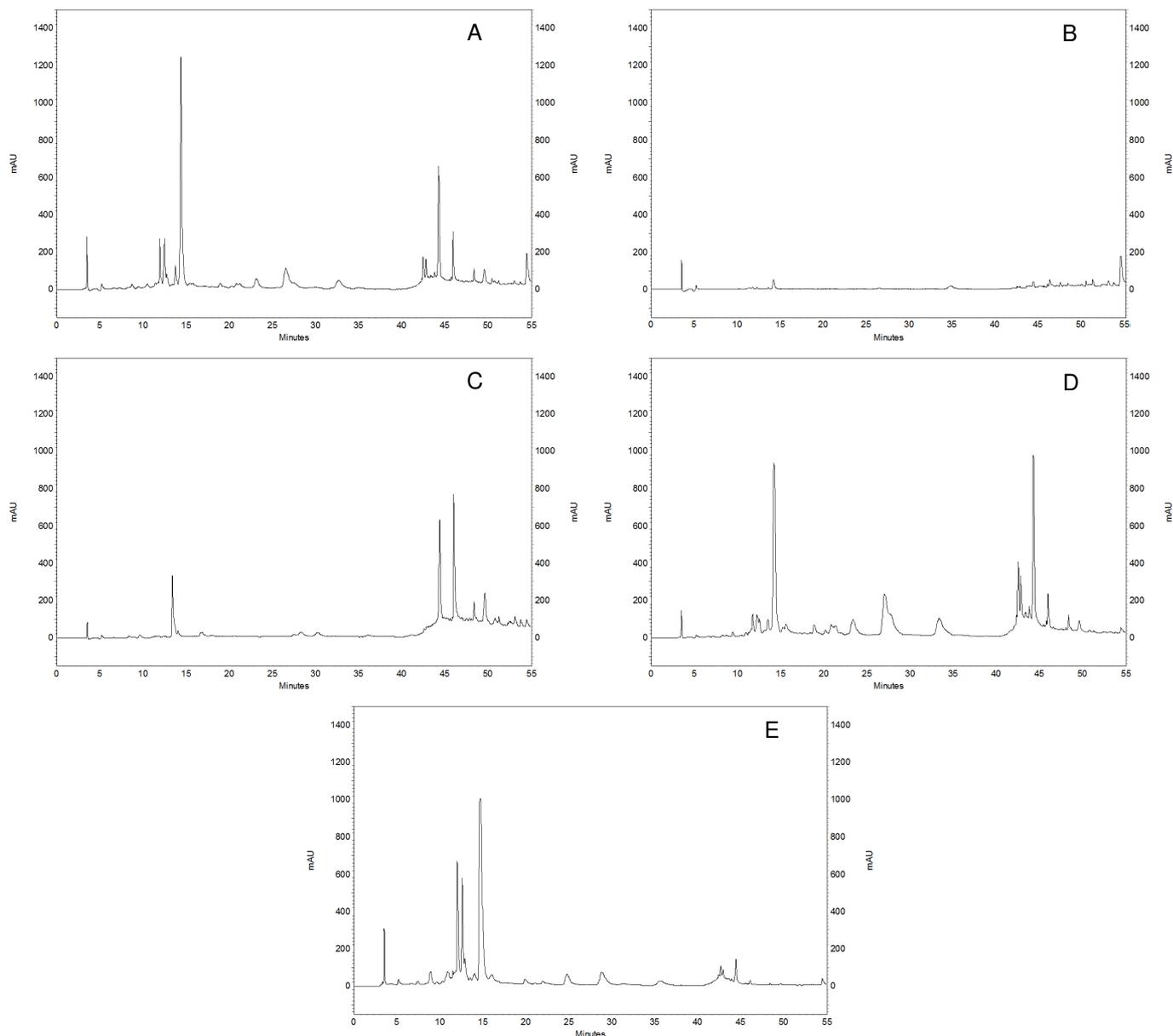


Figura 18 – Esgotamento vegetal à quente (extração 1), amostra de carqueja (*Baccharis trimera*): (A) extrato metanólico, (B) extrato etéreo, (C) extrato diclorometânico, (D) extrato n-butanólico e (E) extrato aquoso. Condições cromatográficas – eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

Observou-se, nos extratos “B” e “C”, com base na intensidade de picos, uma baixa eficiência de extração, pois o éter e o diclorometano são solventes menos polares e adequados somente para a extração de ceras, óleos, esteróis e clorofila a partir da matriz vegetal (NACZK ; SHAHIDI, 2004).

Já nos extratos “A”, “D” e “E” observou-se uma maior eficiência na obtenção de compostos fenólicos, com perfil cromatográfico muito semelhante. O processo de obtenção do extrato “A” foi suficiente para extrair os compostos de interesse no estudo, sem a necessidade de dar continuidade com o processo líquido-líquido aplicado nos extratos “D” e “E”.

O esgotamento vegetal à frio (extração 2) empregou a extração sólido-líquido com diferentes solventes/polaridades, conforme esquema mostrado na Figura 12.

Os cromatogramas obtidos na extração 2 (Figura 19), demonstraram que o procedimento foi eficiente na extração de compostos antioxidantes, assim como na extração 1, porém com menor intensidade de sinal nos picos cromatográficos. Observou-se que o extrato “C” obtido foi o mais eficiente na extração de compostos na amostra.

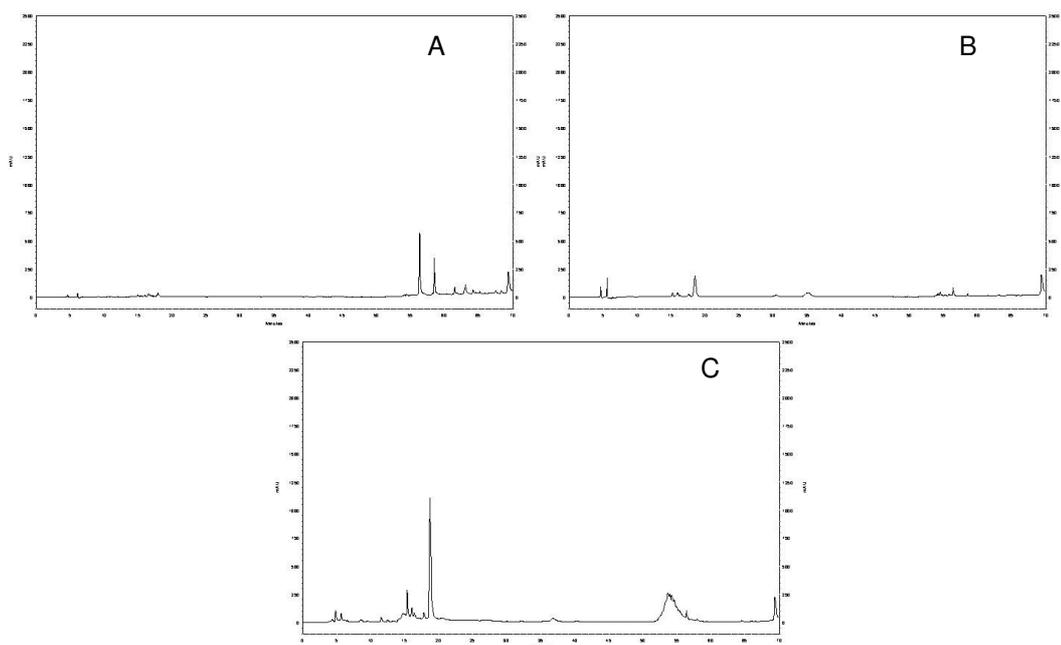


Figura 19 – Esgotamento vegetal à frio (extração 2), amostra de carqueja (*Baccharis trimera*) : (A) extrato etéreo, (B) extrato etanólico e (C) extrato aquoso. Condições cromatográficas – eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ (0-35 min); $0,8-1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (35-55 min).

A extração por hidrólise ácida (extração 3), do tipo sólido-líquido, foi realizada na amostra com metanol acidificado a 0,01% de ácido clorídrico, conforme esquema da Figura 13.

Como muitos polifenóis ocorrem na forma de ligações com glicosídeos ou ésteres, a preparação da amostra deve incluir hidrólise alcalina ou ácida para liberar ligações fenólicas, antes ou após a etapa de extração com solventes. Embora a hidrólise de glicosídeos, para liberar agliconas, seja um método prático para determinação dos flavonoides, pode ocorrer degradação ou mesmo hidrólise incompleta do glicosídeo, dependendo das condições aplicadas (ROSA, ALVAREZ-PARRILLA, GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010).

O cromatograma dos antioxidantes por hidrólise ácida (Figura 20) apresentou uma intensidade de sinais semelhante à extração 1, porém com coeluição de picos entre os tempos de 40 e 50 minutos de análise.

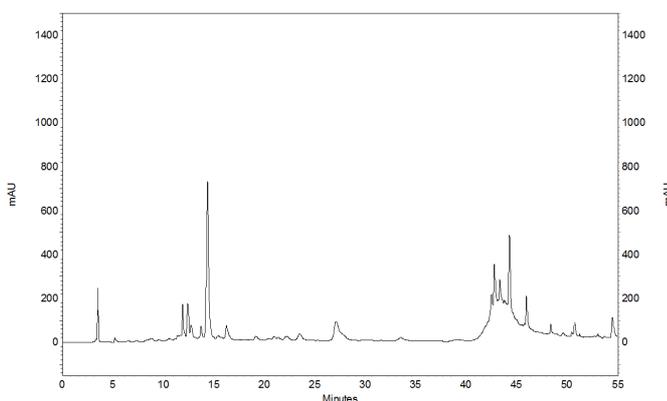


Figura 20 – Hidrólise ácida (extração 3), amostra de carqueja (*Baccharis trimera*): extrato metanólico. Condições cromatográficas – eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

Apesar de não existir um procedimento uniforme ou completamente satisfatório para extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica de substâncias fenólicas em materiais vegetais, observa-se que a solubilidade dos compostos fenólicos é amplamente influenciada pela polaridade (solvente) do meio extrator utilizado, pelo grau de polimerização de compostos fenólicos, bem como pela interação com outras substâncias presentes e pela formação de complexos (NACZK ; SHAHIDI, 2004)

Assim, das metodologias extrativas avaliadas neste estudo, a extração por esgotamento vegetal à quente em extrator Soxhlet foi a que apresentou os melhores resultados cromatográficos, quando comparados com as outras extrações e, por esse motivo, foi selecionada para dar continuidade aos estudos de caracterização dos extratos de plantas medicinais por HPLC.

Para a extração dos compostos antioxidantes, presentes nas plantas provenientes da Amazônia, foi realizada extração hidroetanólica a 70%, v/v, (extrato bruto), onde a partir do extrato remanescente foram feitas sucessivas extrações líquido-líquido com n-butanol e acetato de etila. Os extratos foram secos e ressuspensos em metanol a uma concentração de 2% (m/v).

Na Figura 21 pode ser observado o perfil cromatográfico da *Cecrópia palmata* nas diferentes extrações. O extrato bruto (Figura 21 – A) apresentou uma maior extração de compostos, observado pela maior quantidade de picos cromatográficos em relação aos extratos, butanólico (Figura 21 – B) e acetato de etila (Figura 21–C).

No cromatograma do extrato realizado com acetato de etila, pode-se observar mais picos de polaridade intermediária no tempo de retenção entre 25 e 35 min, bem como uma co-eluição no tempo de 45 min, evidenciando uma maior extração de compostos menos polares.

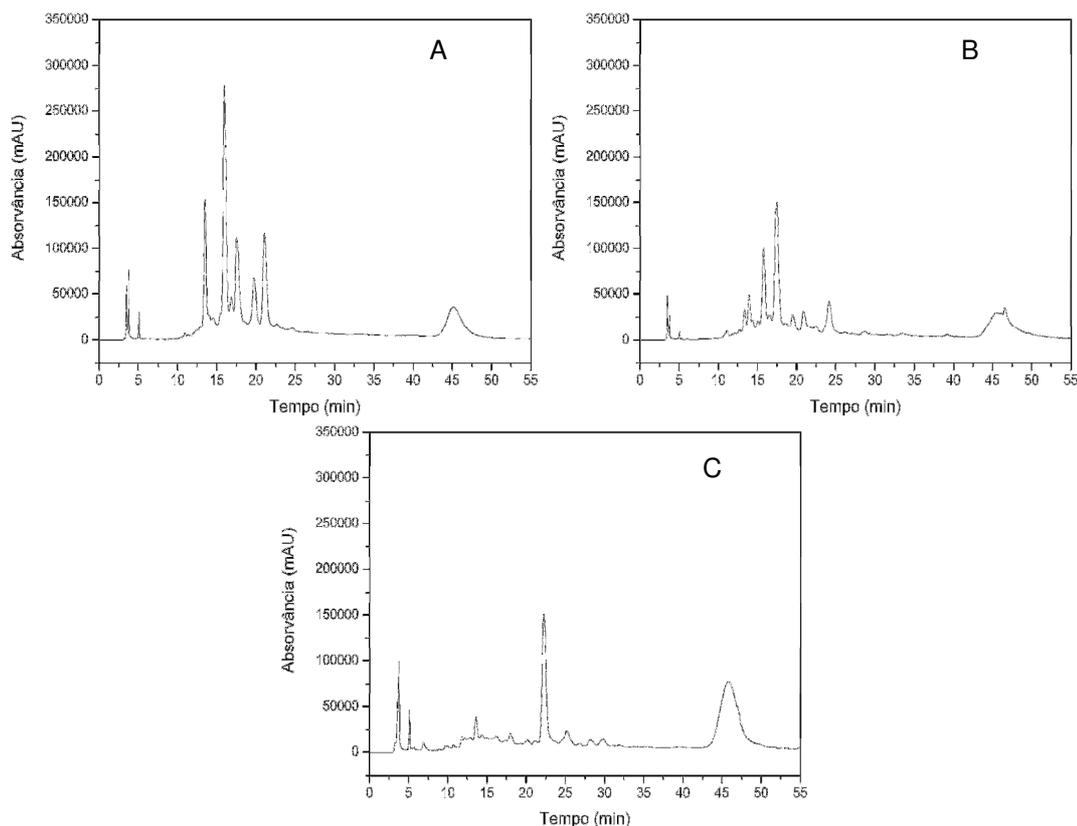


Figura 21 – Perfil cromatográfico do extrato de *Cecropia palmata*: A) bruto, B) butanólico e C) acetato por extração por maceração a frio. Condições cromatográficas – eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

5.2 Isolamento dos compostos fenólicos por extração em fase sólida

A extração em fase sólida (do inglês, *Solid-Phase Extraction* (SPE)) é um dos melhores procedimentos de limpeza/isolamento de extratos vegetais brutos, tanto por ser um procedimento rápido e reprodutível, como pelos extratos obtidos serem frequentemente isentos de interferentes, além do pequeno volume de amostra necessário (NACZK ; SHAHIDI, 2004; WANG ; HUANG, 2004).

Nesta técnica, o sorvente mais empregado para isolar os ácidos fenólicos e flavonoides é a sílica com grupamentos C₁₈ quimicamente ligados a ela. Geralmente, a amostra e os solventes utilizados são acidificados para evitar a ionização dos compostos fenólicos, o que pode reduzir consideravelmente a retenção dos

mesmos, já que o pKa (constante de dissociação ácida) dos compostos estudados variam de 4,3 a 9,5, conforme anexo A (BIMAKR et al., 2011).

Os compostos antioxidantes estudados apresentaram percentual de recuperação (Figura 22) entre 80 e 120%, exceto para o ácido gálico (GAL) e a catequina (CATE), com valores médios de 3,4 e 48,4%, respectivamente. Isso pode ser explicado pela hidrofiliicidade do ácido gálico e catequina, uma vez que a fase estacionária C_{18} é mais adequada para análise de compostos orgânicos hidrofóbicos.

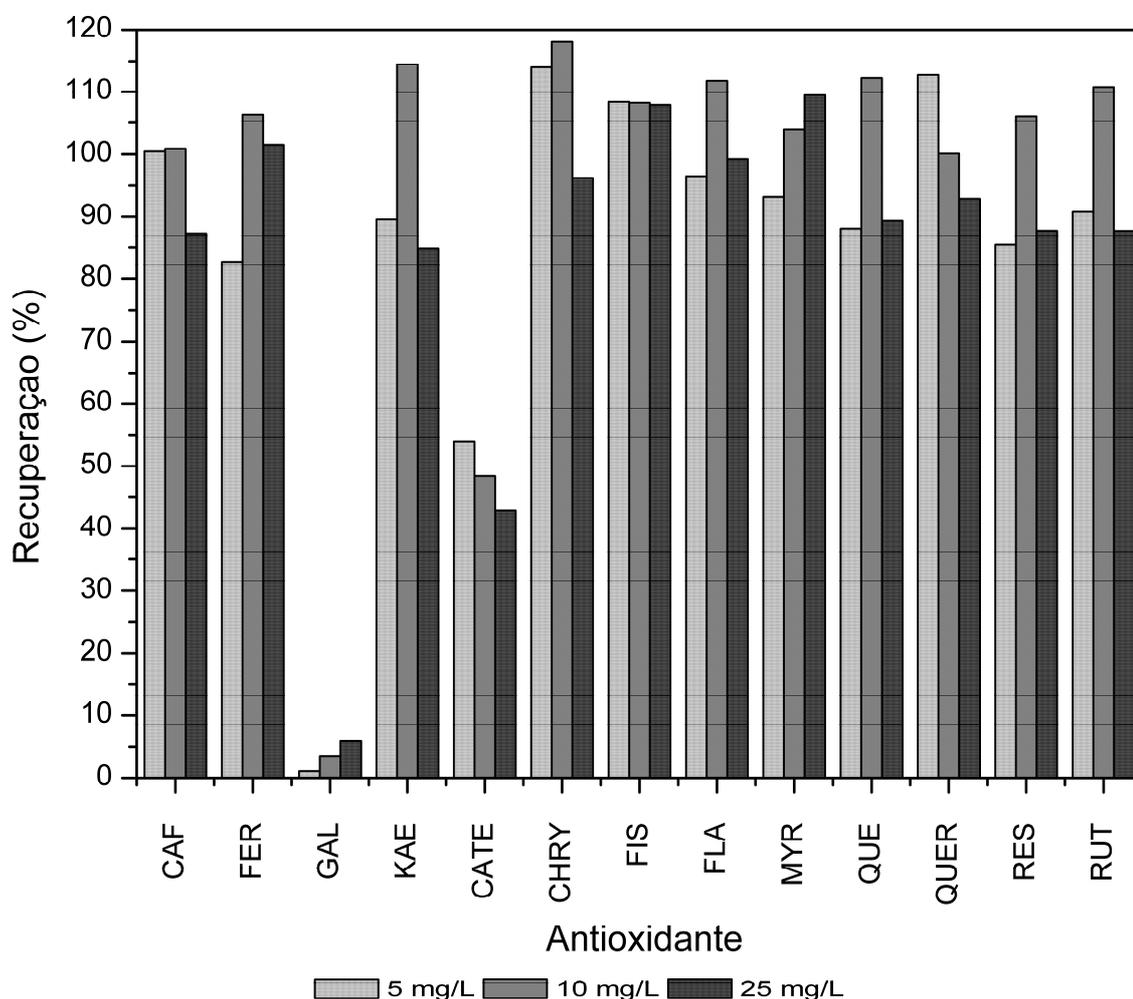


Figura 22 – Recuperações para compostos fenólicos após extração em fase sólida (SPE) e determinação por HPLC. Ácido gálico (GAL), catequina (CATE), ácido cafeico (CAF), rutina (RUT), ácido ferúlico (FER), quercitrina (QUER), miricetina (MIR), fisetina (FIS), resveratrol (RES), quercetina (QUE), canferol (KAE), crisina (CHRY) e flavona (FLA).

5.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por métodos de separação

5.3.1 Separações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Inicialmente, foram estudados diversos sistemas binários e ternários de solventes no modo eluição isocrático, utilizando acetonitrila, metanol, tetraidrofurano e água, com modificadores adicionais, tais como ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético e ácido fosfórico.

Os sistemas binários testados foram: mistura acetonitrila 30%/água 70%; metanol 40%/água 60%; tetraidrofurano 32%/água 68%. Já os ternários foram: acetonitrila 15%/metanol 20%/água 65%; acetonitrila 15%/tetraidrofurano 16%/água 69%; metanol 20%/tetraidrofurano 16%/água 64%.

Dos sistemas testados, a melhor separação isocrática ocorreu com a utilização de acetonitrila 30% e água 70% em pH 4,0 (ajustado com ácido fosfórico), com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, o que permitiu a separação de oito compostos antioxidantes fenólicos (CAF, FER, CAN, MIR, QUE, QUER, RES e RUT), em 35 minutos de análise, conforme Figura 23. A adição de ácidos como modificadores de fase móvel promoveu uma melhor resolução e redução de picos com alargamento cauda na separação dos antioxidantes.

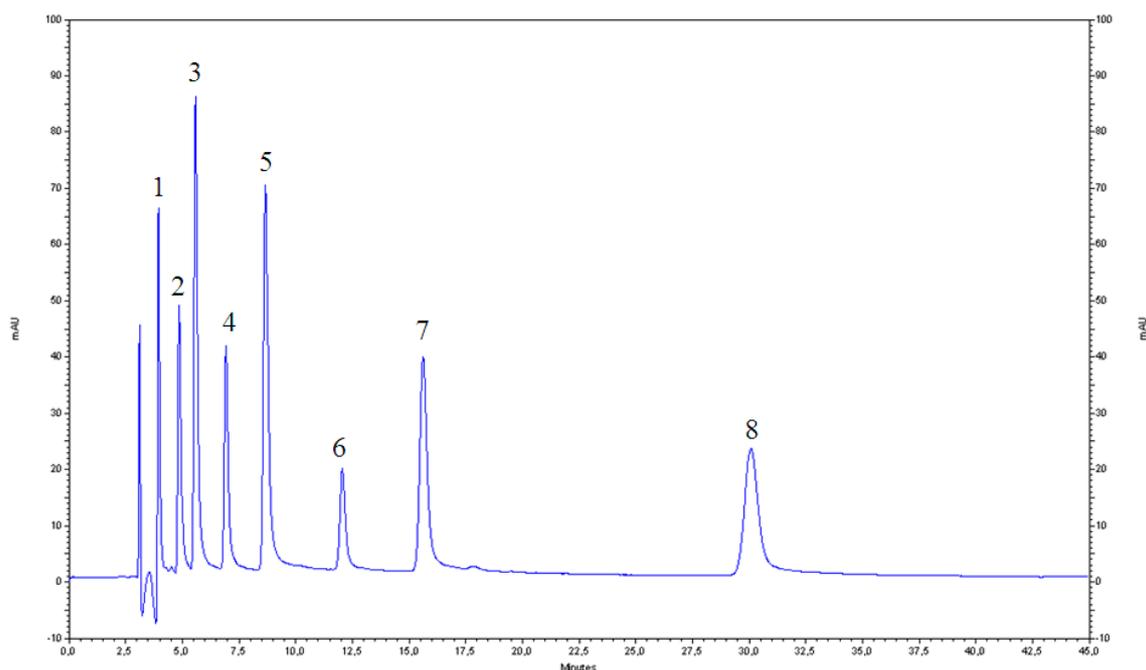


Figura 23 – Separação cromatográfica dos antioxidantes por eluição isocrática com 30% de acetonitrila e 70% de água em pH 4,00 (ajustado com ácido fosfórico). Vazão da fase móvel: 0,5 mL min⁻¹. Analitos: (1) RUT, (2) CAF, (3) QUER, (4) FER, (5) MIR, (6) RES, (7) QUE e (8) CAN. Detecção UV em 254 nm

Com o intuito de aumentar o número de compostos antioxidantes fenólicos detectados em única análise cromatográfica, um modo de separação por eluição com gradiente foi otimizado, a partir do método isocrático desenvolvido. Devido à inclusão de compostos mais polares, tais como o ácido gálico e catequina, foi necessário reduzir a percentagem inicial de acetonitrila.

Para a separação de compostos fenólicos menos polares, tais como quercetina, canferol, crisina e flavona, foi preciso aumentar o percentual de acetonitrila no final da análise, assim como a vazão de eluição.

Entre os flavonoides estudados, a miricetina e a fisetina são compostos bioativos de enorme potencial terapêutico pela ação antirradicalar contra os radicais livres, com fluorescência intrínseca, e são utilizados como sondas moleculares para explorar sítios de ligação relevantes de alvos biológicos, por exemplo, proteínas e biomembranas (ONG ; KHOO, 1997; SENGUPTA, BANERJEE, SENGUPTA, 2005). O método cromatográfico desenvolvido é o primeiro a determinar, em uma única análise, concomitantemente, estes dois compostos antioxidantes.

Os antioxidantes separados pertencem a diferentes classes de compostos fenólicos, por isso foram detectados em quatro comprimentos de onda simultâneos, durante a análise cromatográfica. Os comprimentos de onda de detecção foram selecionados de acordo com os espectros de absorção de cada molécula. Os flavonóis e seus glicosídeos têm duas bandas com um máximo de absorção em 330-370 nm e outro em 250-270 nm, devido ao anel B (estrutura cinamoil) e a estrutura do anel (benzoíla), respectivamente (YAO, 2004). Já os ácidos fenólicos apresentam um máximo de banda de absorção entre 246-262 nm com um ombro em 290-315 nm (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009).

A Tabela 4 apresenta o antioxidante, o tempo de retenção (tr) e o comprimento de onda (nm) utilizado para análise.

Tabela 4 – Dados do método cromatográfico desenvolvido.

Antioxidante	Abreviatura	tr (min)	Deteccção (nm)
1. Ácido gálico	GAL	5,78	254
2. Catequina	CATE	12,43	210
3. Ácido cafeico	CAF	15,03	370
4. Rutina	RUT	20,23	254
5. Ácido ferúlico	FER	23,33	370
6. Quercitrina	QUER	29,68	320
7. Miricetina	MIR	36,43	370
8. Fisetina	FIS	38,15	370
9. Resveratrol	RES	42,14	320
10. Quercetina	QUE	44,77	254
11. Canferol	CAN	46,98	370
12. Crisina	CRI	50,34	254
13. Flavona	FLA	53,14	320

As condições cromatográficas, descritas no item 3.4.3.1, permitiu a resolução satisfatória de todos os analitos estudados em 55 min. A Figura 24 ilustra um cromatograma representativo de uma mistura de 13 padrões de antioxidantes fenólicos analisados.

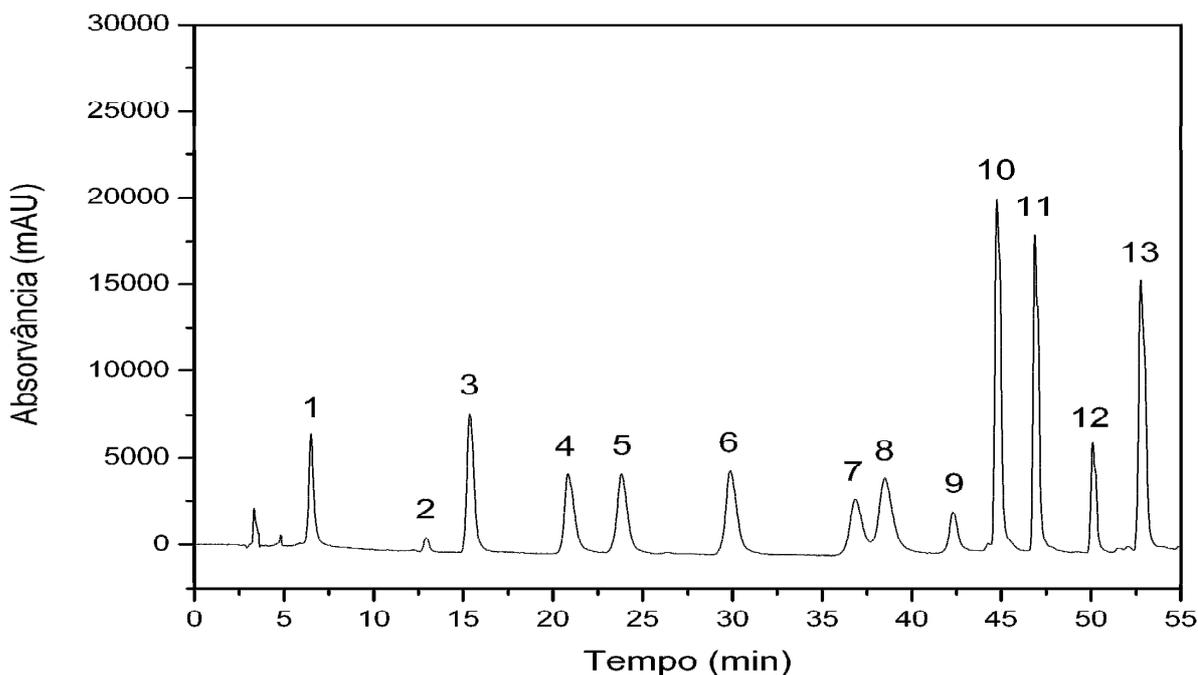


Figura 24 – Separação cromatográfica dos antioxidantes (17 mg.L^{-1}). Eluentes: Ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) como solvente A e acetonitrila como solvente B Condições da eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ (0-35 min); $0,8\text{-}1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (35-55 min.). Analitos: (1) GAL, (2) CATE, (3) CAF, (4) RUT, (5) FER, (6) QUER, (7) MIR, (8) FIS, (9) RES, (10) QUE, (11) CAN, (12) CRI e (13) FLA.

No desenvolvimento dos métodos, foi possível observar que o número de grupos hidroxilas presentes no anel B dos flavonóis aglicosilados é proporcional a polaridade dos mesmos, sendo que a miricetina (7) com três grupos OH no anel B é mais polar que a fisetina (8), quercetina (10), que possuem dois grupos OH, e canferol (11) que possui apenas um. Entre os flavonóis glicosilados, o aumento de grupos hidroxila, no glicosídeo da molécula, aumenta sua polaridade, como no caso da rutina (4) e quercitrina (6). Além disso, é possível constatar que a catequina (2) é muito mais polar que a quercetina (10), e a principal diferença destes flavonoides é a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3.

O método cromatográfico foi validado. A curva de calibração de cada antioxidante foi estabelecida pela injeção em triplicata de 7 diferentes concentrações da mistura dos 13 padrões de antioxidantes isolados. As figuras analíticas de mérito, tais como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear e coeficiente de correlação (r) estão listados na Tabela 5 a 7.

Tabela 5 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e canferol por HPLC-DAD.

Parâmetros	Ácido cafeico ^a	Ácido ferúlico ^a	Ácido gálico ^a	Canferol ^a
Faixa de concentração linear	1,0 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	1,0 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)
Inclinação ± desvio padrão	161258,37 ± 1238,71	144949,06 ± 1337,06	91231,05 ± 226,92	96466,42 ± 3183,71
Intercepto ± desvio padrão	23126,14 ± 573,20	-59643,28 ± 359,79	-98712,48 ± 279,44	119610,44 ± 2223,38
Coeficiente de Correlação (r)	0,9997	0,9997	0,9990	0,9997
Análise de variância				
Regressão linear ^b	128699,64 (4,6)	101034,76 (4,6)	14534,14 (4,6)	12125,52 (4,6)
Desvio da Linearidade ^b	2,87 (2,96)	0,76 (2,96)	2,94 (2,96)	2,18 (2,96)
Limites				
LOQ (mg·L ⁻¹)	0,11	0,12	0,10	0,08
LOD (mg·L ⁻¹)	0,03	0,04	0,03	0,02

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões

^b Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05

Tabela 6 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de catequina, crisina, fisetina e flavona por HPLC-DAD.

Parâmetros	Catequina ^a	Crisina ^a	Fisetina ^a	Flavona ^a
Faixa de concentração linear	2,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	2,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)
Inclinação ± desvio padrão	315977,89 ± 12861,24	115411,76 ± 3459,08	-103040,34 ± 1706,07	106018,25 ± 3932,34
Intercepto ± desvio padrão	815477,80 ± 5346,75	218079,95 ± 1358,58	-140426,51 ± 6719,77	64694,19 ± 781,66
Coeficiente de Correlação (r)	0,9997	0,9995	0,9932	0,9997
Análise de variância				
Regressão linear ^b	8444,59 (4,6)	13156,50 (4,6)	5797,92 (4,6)	9140,23 (4,6)
Desvio da Linearidade ^b	2,32 (2,96)	2,13 (2,96)	2,70 (2,96)	0,29 (2,96)
Limites				
LOQ (mg·L ⁻¹)	0,19	0,16	0,05	1,20
LOD (mg·L ⁻¹)	0,06	0,05	0,01	0,36

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões

^b Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05

Tabela 7 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina por HPLC-DAD.

Parâmetros	Miricetina ^a	Quercetina ^a	Quercitrina ^a	Resveratrol ^a	Rutina ^a
Faixa de concentração linear	2,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	1,0 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	1,0 – 100,0 (mg·L ⁻¹)	0,5 – 100,0 (mg·L ⁻¹)
Inclinação ± desvio padrão	76554,14 ± 1050,17	94735,71 ± 340,90	67507,79 ± 929,75	96456,65 ± 3903,60	43129,46 ± 914,46
Intercepto ± desvio padrão	-399475,08 ± 1825,01	-14070,81 ± 445,16	-232121,03 ± 7184,98	-7319,17 ± 362,55	71565,08 ± 2706,08
Coeficiente de Correlação (r)	0,9976	0,9997	0,9984	0,9996	0,9996
Análise de variância					
Regressão linear ^b	5414,74 (4,6)	99985,07 (4,6)	60919,38 (4,6)	8896,26 (4,6)	24900,86 (4,6)
Desvio da Linearidade ^b	0,14 (2,96)	2,50 (2,96)	2,78 (2,96)	0,08 (2,96)	2,34 (2,96)
Limites					
LOQ (mg·L ⁻¹)	0,09	0,14	0,08	0,10	0,16
LOD (mg·L ⁻¹)	0,03	0,04	0,02	0,03	0,05

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões

^b Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P = 0,05$

Os resultados mostraram que o LOD e o LOQ dos antioxidantes são baixos, o que indica que este método tem um alto grau de detectabilidade. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99.

A precisão do método foi estudada através da precisão intra-dia e inter-dia, conforme Tabela 8. O método apresentou desvio padrão relativo inferior a 5%, indicando precisão, conforme Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi avaliada pela utilização de ensaios de recuperação, em que os resultados obtidos foram entre 83,8 e 119,9%.

O método cromatográfico desenvolvido é seletivo, devido à avaliação com detector como arranjo de diodos que possibilitou a comparação do espectro do composto separado com o do analito isolado, utilizado como uma indicação da presença do composto na amostra.

Tabela 8 – Resultados obtidos na análise da precisão e exatidão do HPLC-DAD desenvolvido para análise dos antioxidantes em estudo.

Antioxidante	Precisão Intra-dia (RSD%)	Precisão Inter-dia (CV%)	Exatidão (%)
Ácido cafeico	0,8	2,3	103,4
Ácido ferúlico	0,5	1,6	97,6
Ácido gálico	0,6	1,9	104,7
Canferol	0,8	2,5	100,0
Catequina	1,2	3,5	83,8
Crisina	1,0	3,1	93,0
Fisetina	1,1	3,2	119,9
Flavona	0,7	2,1	97,2
Miricetina	1,4	4,2	91,8
Quercetina	0,5	1,6	94,0
Quercitrina	1,2	3,7	94,6
Resveratrol	0,6	1,9	100,0
Rutina	0,9	2,8	88,2

*Cada valor é a média de três determinações

5.3.2 Separações por Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*) também foi desenvolvida como método de separação para a quantificação dos antioxidantes naturais presentes nas plantas medicinais de uso comum, em estudo. No entanto, nesta etapa apenas 6 antioxidantes foram estudados para fins comparativos por HPLC, sendo estes os encontrados em maior abundância nas plantas estudadas, como será discutido mais adiante.

O método CZE foi otimizado variando a concentração do eletrólito de trabalho tetraborato de potássio (entre 10 e 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), o pH (entre 9,0 e 10,0), o potencial aplicado (entre 15 e 30 kV) e a adição metanol como modificador. A melhor separação obtida foi com 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraborato de potássio, pH 9,20, 20 kV e 10% (v/v) metanol (Figura 25).

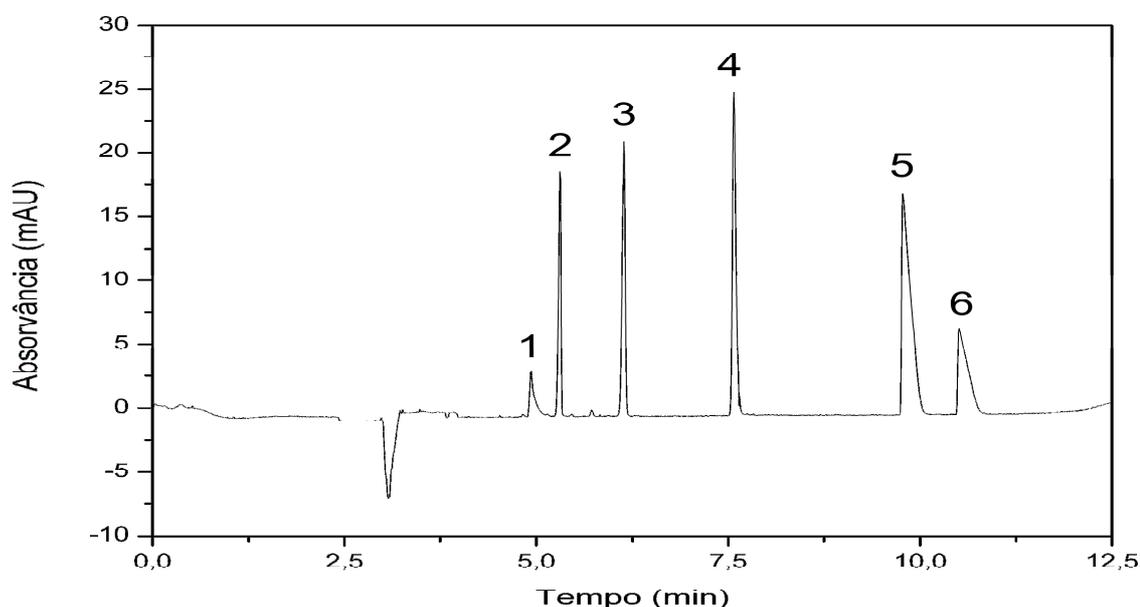


Figura 25 – Eletroferograma da separação dos antioxidantes isolados ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Condições de análise: 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraborato de potássio, pH 9,50, 20 kV, com 10% de metanol. (1) CATE, (2) RUT, (3) QUER, (4) QUE, (5) CAF e (6) GAL.

Os resultados mostraram que o LOD e o LOQ dos antioxidantes são baixos, o que indica que este método tem um alto grau de detectabilidade, conforme a Tabela 9. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99.

Tabela 9 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de catequina, rutina, quercitrina, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico por CZE-DAD.

Parâmetros	Catequina ^a	Rutina ^a	Quercitrina ^a	Quercetina ^a	Ácido cafeico ^a	Ácido gálico ^a
Faixa de concentração linear	0 – 80 (mg·L ⁻¹)					
Inclinação ± desvio padrão	5,0135 ± 0,1639	0,9534 ± 0,0337	1,3959 ± 0,0393	1,9944 ± 0,0564	6,2864 ± 0,1432	6,9992 ± 0,1615
Intercepto ± desvio padrão	3,1366 ± 0,6767	1,4397 ± 0,1391	1,0278 ± 0,1623	-0,8722 ± 0,0233	-0,9164 ± 0,0591	-4,6440 ± 0,6669
Coeficiente de Correlação (r)	0,9984	0,9981	0,9988	0,9988	0,9992	0,9992
Análise de variância						
Regressão linear ^b	223193,94 (4,96)	72655,68 (4,96)	32665,03 (4,96)	96855,86 (4,96)	50034,04 (4,96)	55554,34 (4,96)
Desvio da Linearidade ^b	2,39 (3,26)	90,70 (3,26)	25,90 (3,26)	77,52 (3,26)	25,95 (3,26)	2,96 (3,26)
Limites						
LOQ	0,0390 (mg·L ⁻¹)	0,2659 (mg·L ⁻¹)	0,1862 (mg·L ⁻¹)	0,0874 (mg·L ⁻¹)	0,3896 (mg·L ⁻¹)	0,0545 (mg·L ⁻¹)
LOD	0,0117 (mg·L ⁻¹)	0,0798 (mg·L ⁻¹)	0,0559 (mg·L ⁻¹)	0,0262 (mg·L ⁻¹)	0,1169 (mg·L ⁻¹)	0,0163 (mg·L ⁻¹)

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões

^b Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05

A precisão do método foi estudada através da precisão intra-dia e inter-dia,. O método apresentou desvio padrão relativo inferior a 5%, indicando precisão (ANVISA, 2003). A exatidão do método foi avaliada pela utilização de ensaios de recuperação, em que os resultados obtidos foram entre 91,7 e 102,4%. conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos na análise da precisão e exatidão do CZE-DAD desenvolvido para análise dos antioxidantes em estudo.

Antioxidante	Precisão Intra-dia (RSD%)	Precisão Inter-dia (CV%)	Exatidão (%)
Catequina	0,4	1,2	91,7
Rutina	0,6	1,8	100,8
Quercitrina	1,2	3,5	96,1
Quercetina	0,9	2,7	98,3
Ácido cafeico	0,7	2,1	102,4
Ácido gálico	0,3	1,0	100,1

*Cada valor é a média de três determinações

5.3.3 Confirmação dos compostos antioxidantes por ESI-MS/MS

Com o objetivo de confirmar a presença dos compostos fenólicos estudados nas plantas medicinais, a análise direta por ESI-MS/MS foi empregada. Mesmo na ausência da separação cromatográfica (como na LC-MS/MS), esta análise permite a confirmação dos polifenóis baseada no perfil da fragmentação obtida para as moléculas a partir de seus padrões sintéticos.

A ionização dos compostos fenólicos, em modo negativo, apresentou maior sensibilidade e seletividade e, portanto, os espectros de massa foram obtidos neste modo, produzindo uma molécula desprotonada $(M-H)^-$ (GUO et al., 2007). Os dados espectrais de massa obtidas para os compostos antioxidantes estudados encontram-se resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Dados espectrais de massa dos compostos antioxidantes estudados em modo negativo.

Antioxidante	[M-H] ⁻	Fragmentos principais (m/z)
Ácido cafeico	179	135 > 117 > 107 > 89 > 79
Ácido ferúlico	193	134 > 178 > 149 > 89
Acido gálico	169	125 > 79 > 69 > 51 > 53
Canferol	285	135 > 121 > 91 > 163 > 149 > 239
Catequina	289	109 > 123 > 125 > 245 > 203
Crisina	254	63 > 143 > 65 > 145 > 119 > 107
Fisetina	285	135 > 121 > 91 > 163 > 149 > 257
Miricetina	317	151 > 137 > 109 > 179 > 107 > 65
Quercetina	301	151 > 107 > 121 > 65 > 179
Quercitrina	447	300 > 271 > 255 > 243 > 227
Resveratrol	227	143 > 185 > 182 > 117 > 116
Rutina	609	300 > 271 > 255 > 179 > 151

O espectro de massa do ácido cafeico desprotonado (massa/carga (m/z) 179) produziu um pico com m/z 135, devido à perda de dióxido de carbono (CO₂), mas sem outros fragmentos abundantes. Da mesma forma, o ácido gálico (m/z 169), produziu o pico com m/z 125.

A molécula de ácido ferúlico (m/z 193) também eliminou o dióxido de carbono (m/z 44) para formar íons de m/z 149. O fragmento m/z 178 corresponde à perda de um grupo metila, mais abundante. O pico mais abundante deste ácido (m/z 134) foi formado por eliminação de dióxido de carbono e um grupo metila.

Já a catequina produziu a molécula desprotonada [M-H]⁻ (m/z 289) e perda de um grupo -CH₂CHOH- (m/z 245), tal como descrito por Pérez-Magarino et al. (1999).

Conforme Fabre et. al (2001) e observado neste estudo, as flavonas, flavona e crisina, exibem perdas neutras de monóxido de carbono (CO) e CO₂, que podem ser atribuídos ao anel C. É interessante notar que o espectro de massa da flavona foi difícil de se obter devido à falta de um grupo hidroxila na sua estrutura.

Para flavonóis O-glicosilados, tais como rutina e quercitrina, o espectro gerado mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ do glicosídeo e o íon correspondente à aglicona desprotonada $(a-H)^-$. No caso da rutina (quercetina-ramnosil-($\alpha 1 \rightarrow 6$)-glucósido) foi observada a perda da unidade de ramnose-glucose ($m/z 609 \rightarrow m/z 301$), e na quercitrina (quercetina-3-O-a-ramnopiranosídeo) perda da unidade ramnopiranosídeo ($m/z 447 \rightarrow m/z 301$) (MICHODJEHOUN-MESTRES et al., 2009).

Nas agliconas, o grau de hidroxilação no anel B tem um impacto sobre a fragmentação. Por exemplo, para flavonóis que contêm dois ou mais grupos hidroxila no anel B, como a quercetina, fisetina e miricetina. Por isso a identificação dos compostos com a mesma massa molecular, como a fisetina e o canferol ($m/z 285$) foi estabelecida com base no fragmento do anel B, em que a fisetina apresenta dois grupos OH ao contrário do canferol que apresenta somente um. Dessa forma a fragmentação do anel B da fisetina apresentou $m/z 121$ (CUYCKENS et al., 2001).

5.4 Compostos fenólicos em plantas medicinais

Na tabela 12, são apresentados os antioxidantes naturais presentes nas plantas medicinais de uso popular, procedentes do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro, e sua respectiva quantificação.

Foi observada a presença dos seguintes antioxidantes: ácido cafeico, ácido gálico, quercetina, quercitrina e rutina. O ácido cafeico foi encontrado apenas na camomila, o ácido gálico na quebra-pedra e na goiabeira e a rutina apenas na mastruz. As plantas ausentes na Tabela 12, não apresentaram nenhum dos compostos antioxidantes avaliados.

A presença de quercetina e quercitrina foi observada na maioria das plantas de uso popular estudadas. A macela e a goiabeira foram as que apresentaram maior e menor quantidade de quercetina, respectivamente, enquanto que a arnica e a goiabeira apresentaram maior e menor quantidade de quercitrina, respectivamente. O perfil cromatográfico e eletroforético das espécies analisadas podem ser observados nas Figuras 26 a 29.

Tabela 12 – Concentração de antioxidantes, determinadas por HPLC-DAD, CZE-DAD e confirmados por ESI-MS/MS, nas plantas medicinais de uso popular em estudo.

Planta medicinal	Método de separação	Concentração de antioxidantes (mg·kg ⁻¹)				
		Ácido cafeico	Ácido gálico	Quercetina	Quercitrina	Rutina
Macela (<i>Achyrocline satureioides</i>)	HPLC	-	-	6963,5 ± 262,2	-	-
	CZE	-	-	5469,8 ± 120,7	-	-
Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i>)	HPLC	-	-	184,7 ± 6,9	3968,9 ± 11,5	-
	CZE	-	-	178,1 ± 3,7	4120,1 ± 616,6	-
Mastrus (<i>Coronopus didymus</i>)	HPLC	-	-	-	-	108,40 ± 3,4
	CZE	-	-	-	-	89,0 ± 3,3
Louro (<i>Laurus nobilis</i>)	HPLC	-	-	-	1657,7 ± 76,6	-
	CZE	-	-	-	1040,3 ± 11,6	-
Camomila (<i>Matricaria recutita</i>)	HPLC	244,19 ± 22,8	-	-	-	-
	CZE	215,6 ± 7,0	-	-	-	-
Quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i>)	HPLC	-	37,13 ± 2,2	128,93 ± 2,7	-	-
	CZE	-	23,1 ± 0,9	121,0 ± 5,9	-	-
Goiabeira (<i>Psidium guajava</i>)	HPLC	-	26,10 ± 0,7	32,84 ± 1,1	46,57 ± 0,9	-
	CZE	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Arnica (<i>Solidago microglossa DC</i>)	HPLC	-	-	-	14365,13 ± 252,4	-
	CZE	-	-	-	12375,3 ± 250,8	-

(-): ausência. (n.d.): não detectado

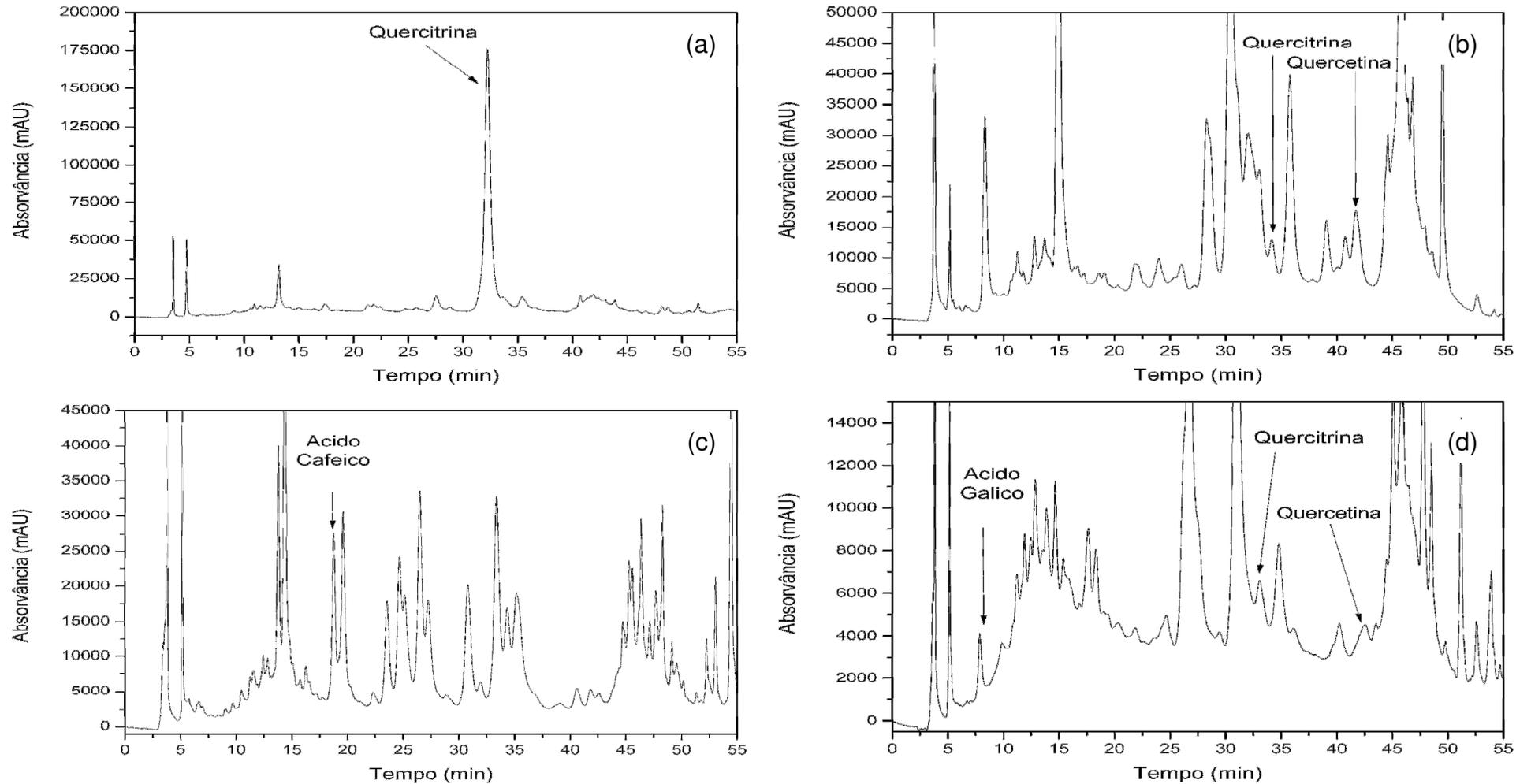


Figura 26 – Perfil cromatográfico: a) arnica (*Solidago microglossa* D. C.), b) cajueiro (*Anacardium occidentale*), c) camomila (*Matricaria recutita*), e d) goiabeira (*Psidium guajava*). Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

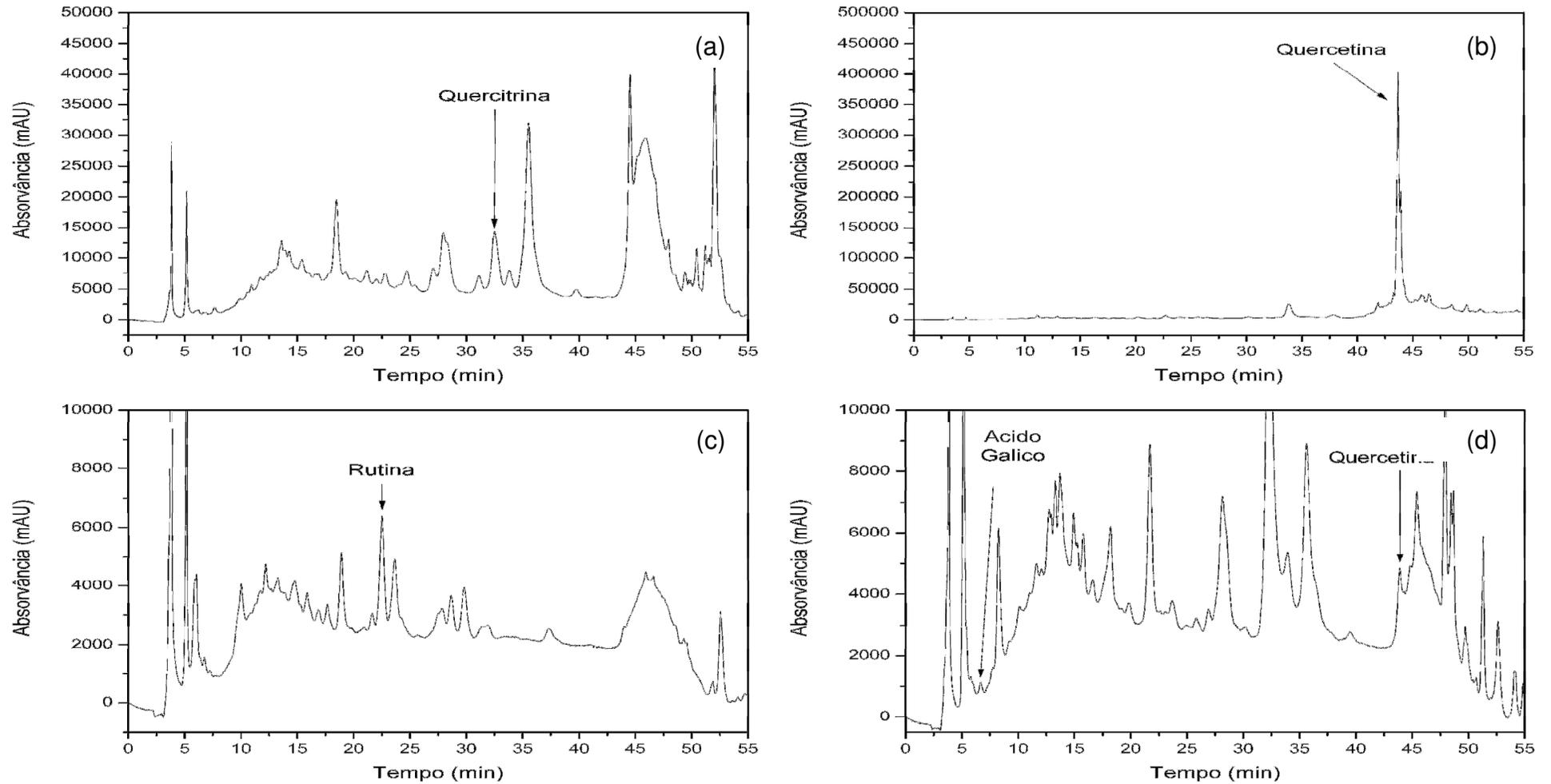


Figura 27 – Perfil cromatográfico: a) louro (*Laurus nobilis* L.), b) macela (*Achirocline saturoides*). c) mastruz (*Coronopus didymus* (L.) Smith.) e d) quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

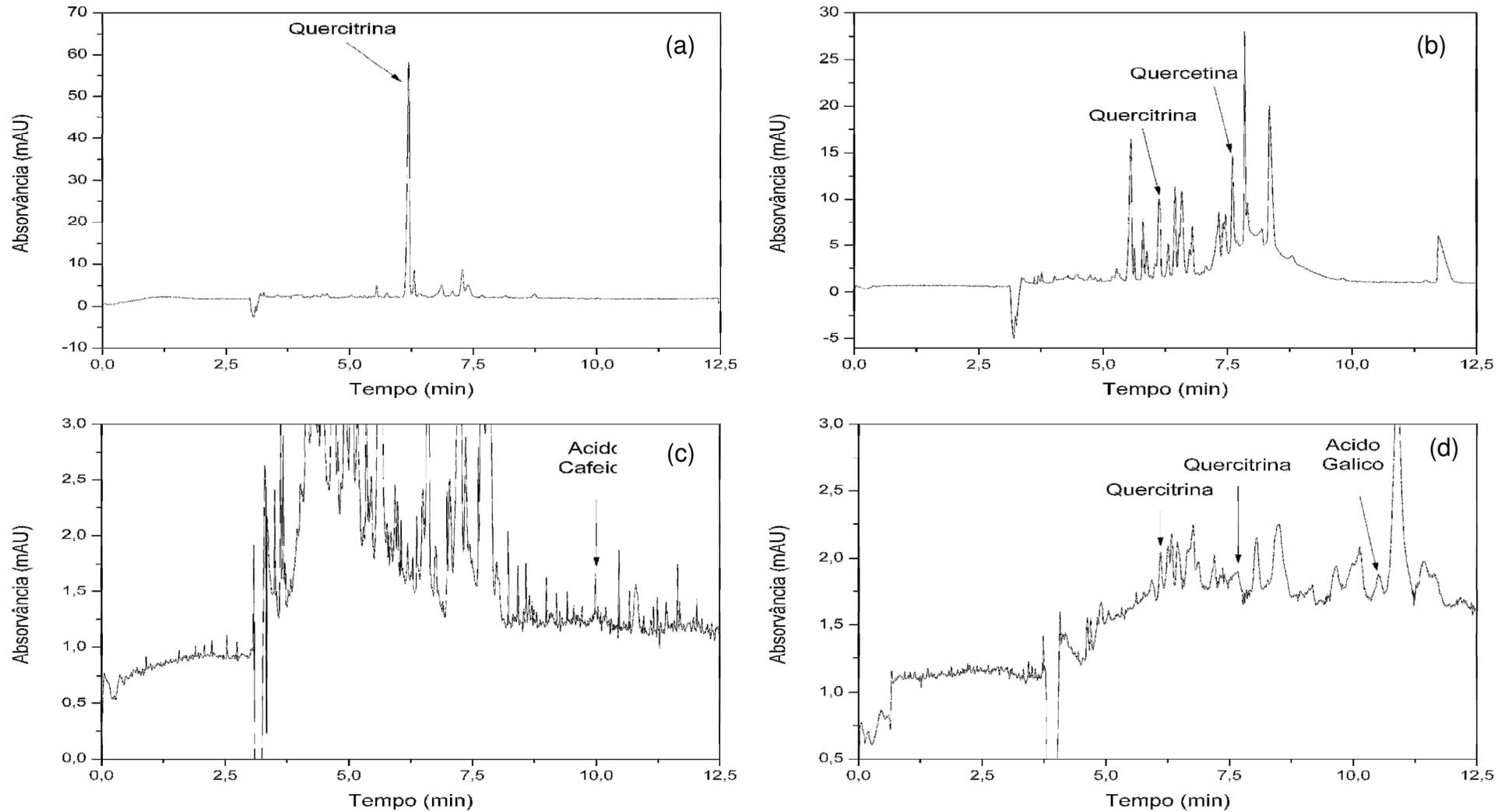


Figura 28 – Perfil eletroforético: a) arnica (*Solidago microglossa* D. C.), b) cajueiro (*Anacardium occidentale*), c) camomila (*Matricaria recutita*), e d) goiabeira (*Psidium guajava*). Condições de análise: 15 mmol·L⁻¹ de tetraborato de potássio, pH 9,50, 20 kV, com 10% de metanol.

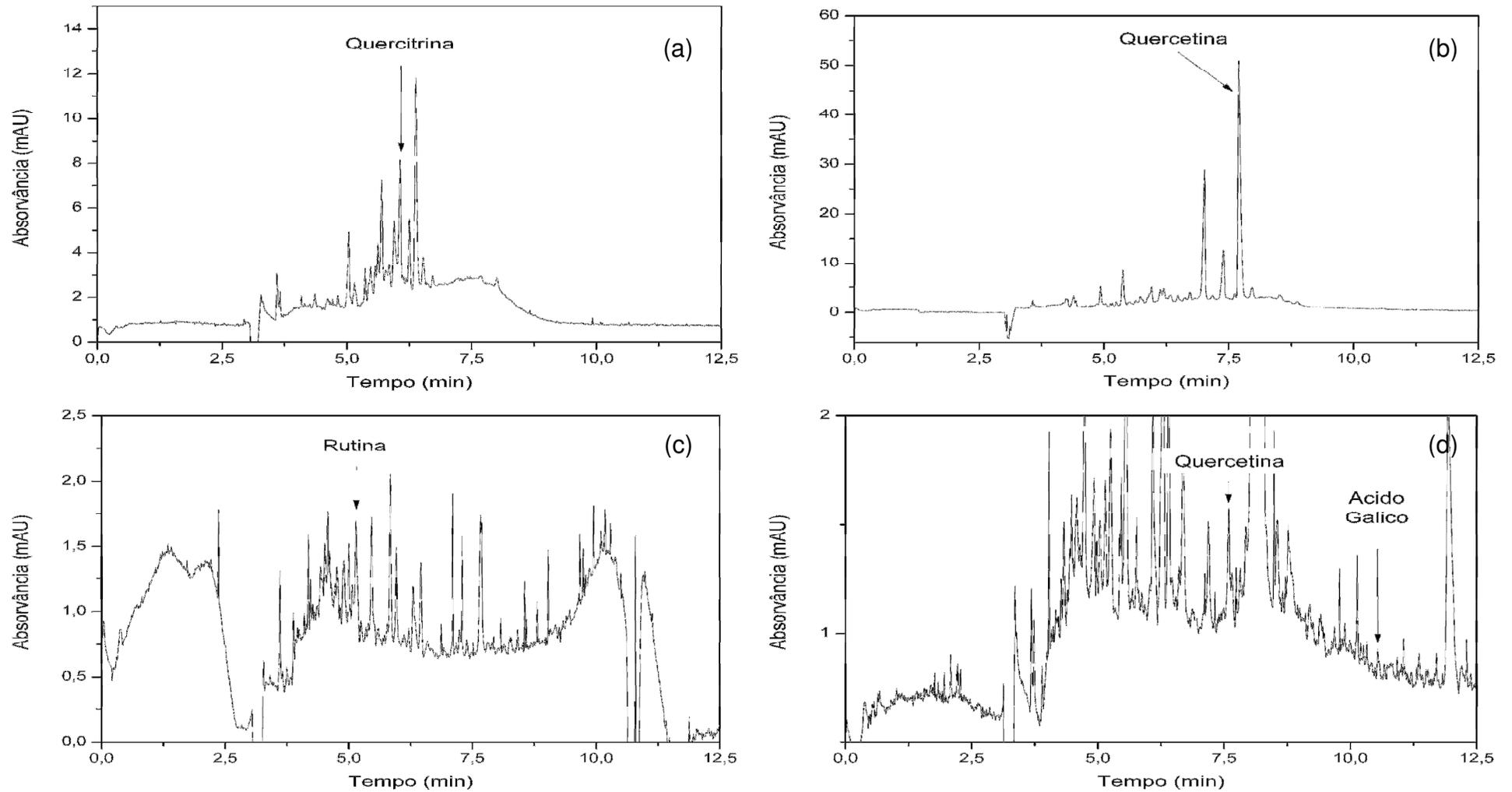


Figura 29 – Perfil eletroforético: a) louro (*Laurus nobilis L.*), b) macela (*Achirocline saturoides*). c) mastruz (*Coronopus didymus (L.) Smith.*) e d) quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). Condições de análise: 15 mmol·L⁻¹ de tetraborato de potássio, pH 9,50, 20 kV, com 10% de metanol.

Os métodos de quantificação (HPLC-DAD e CZE-DAD) apresentaram correlação entre si, com R de 0,9953, mostrado na Figura 30.

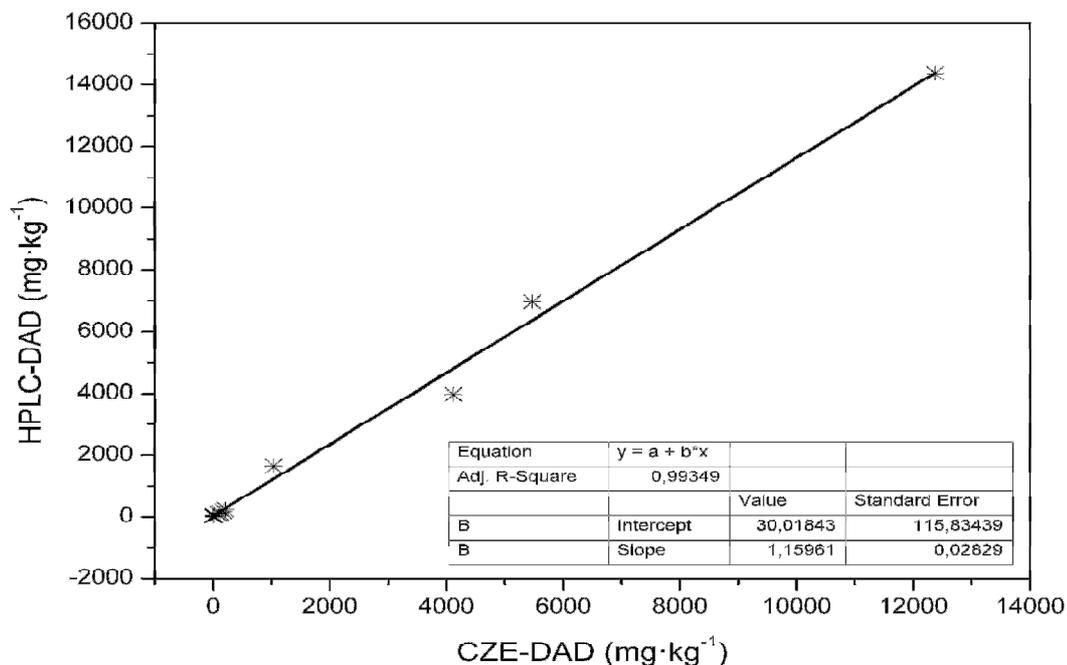


Figura 30 – Correlação entre os métodos de separação desenvolvidos, HPLC-DAD e CZE-DAD.

Com base nas análises cromatográficas foram selecionadas as espécies estudadas arnica, cajueiro, louro, boldo e macela que apresentaram um marcador intenso para a avaliação da atividade antioxidante com radical HO•. A atividade antirradicalar dos compostos isolados foi comparada com a atividade dos compostos naturais, possibilitando uma análise das interações entre os compostos presentes nas plantas, que será discutido no item 4.5.

Na tabela 13 são apresentados os antioxidantes naturais presentes nas plantas medicinais nativas da Amazônia e quantificações, sendo que as espécies ausentes na tabela, não apresentaram nenhum dos compostos avaliados.

Tabela 13 – Concentração de antioxidantes, determinados por HPLC-DAD, nas plantas medicinais da Amazônia.

Planta medicinal	Extrato	Concentração de antioxidantes (mg·kg ⁻¹)					
		Ácido gálico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Rutina	Quercitrina	Quercetina
<i>Cecrópia palmata</i> Willd. (registro IAN 18555)	Bruto	708,7 ± 2,4		2255,0 ± 15,8	11931,6 ± 107,5	-	-
	Butanol	-	17131,6 ± 32,7	72,5 ± 2,6	-	-	-
	Acetato de etila	-	5080,4 ± 66,5	2814,2 ± 21,7	-	-	-
<i>Cecrópia obtusa</i> (IAN 185555)	Bruto	-	2194,4 ± 2,0	15013,3 ± 692,6	-	-	1025,4 ± 30,9
	Butanol	-	237,8 ± 2,4	2785,0 ± 9,4	-	-	-
	Acetato de etila	-	1602,6 ± 3,9	12113,3 ± 83,8	-	2275,1 ± 59,8	2154,3 ± 1,9
<i>Bauhinia variegata</i> (registro IAN 185932)	Bruto	-	-	2536,1 ± 12,6	10849,4 ± 11,3	149,6 ± 1,4	-
	Butanol	-	-	437,8 ± 0,9	10765,9 ± 24,3	-	-
	Acetato de etila	-	827,0 ± 2,6	8581,2 ± 41,6	17449,4 ± 161,1	970,4 ± 0,7	-
<i>Bauhinia var. alboflava</i> Wit (registro IAN 185831)	Bruto	-	-	1726,0 ± 39,5	16383,5 ± 144,6	-	-
	Butanol	-	-	759,3 ± 1,4	27771,8 ± 472,8	-	-
	Acetato de etila	-	-	11206,1 ± 26,1	26076,4 ± 84,3	3521,9 ± 8,8	-
<i>Mansoa alliaceae</i> (registro IAN 184394)	Acetato de etila	-	-	365,8 ± 1,7	1500,7 ± 8,0	-	-

(-): ausência.

Foi observada a presença dos seguintes antioxidantes: ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina, quercitrina e quercetina. O ácido gálico foi encontrado apenas na *Cecrópia palmata Willd.* Esta amostra apresentou, também, uma maior quantificação de ácido cafeico no extrato butanólico.

A *Cecrópia obtusa* apresentou maior teor do ácido ferúlico no extrato bruto e menor teor de ácido cafeico no extrato butanólico. Somente nos seus extratos elaborados em butanol e acetato de etila, foram identificados a quercetina dentre todas as espécies nativas estudadas.

A maior quantidade de rutina e quercitrina foi quantificada nos extratos butanólico e acetato de etila, respectivamente, da espécie *Bauhinia var. alboflava wit*, enquanto que na *Mansoa alliaceae* foi observado um menor teor de rutina no extrato elaborado com acetato de etila. O menor teor de quercitrina foi quantificado no extrato bruto da *Bauhinia variegata*.

A quantidade de ácido ferúlico e cafeico na maioria das plantas medicinais da Amazônia, no extrato de acetato de etila, é superior a quantidade nos extratos hidroetanólico e butanólico, apesar de sua polaridade. Isso pode ser explicado pela maior parte desses compostos fenólicos estarem ligados a celulose, proteínas, ligninas, flavonóides, glicose, terpenos, estando presentes em uma pequena fração de ácidos fenólicos na forma de ácido livre (STALIKAS, 2007).

Considerando a presença de todos os compostos fenólicos identificados nas plantas da Amazônia e seus extratos obtidos, um somatório desta classe de antioxidantes pode ser obtido. A Tabela 14 mostra o somatório destes antioxidantes encontrados, os quais devem contribuir em grande parte para a atividade antirradicalar e a bioatividade dos extratos vegetais estudados. Além deste mecanismo de ação direta, o conjunto destes compostos pode atuar na atividade antioxidante dos extratos por outras vias de ação, como a ativação de enzimas e a complexação de alguns metais catalisadores do estresse oxidativo em nível celular.

Tabela 14 – Concentração de antioxidantes, determinados por HPLC-DAD, nas plantas medicinais da Amazônia.

Planta medicinal	Concentração total de antioxidantes (mg·kg⁻¹)
<i>Cecrópia palmata</i> Willd. (registro IAN 18555)	39993,9 ± 38,5
<i>Cecrópia obtusa</i> (IAN 185555)	39402,2 ± 224,7
<i>Bauhinia variegata</i> (registro IAN 185932)	52566,8 ± 51,5
<i>Bauhinia var. alboflava</i> Wit (registro IAN 185831)	11319,8 ± 777,5
<i>Mansoa alliaceae</i> (registro IAN 184394)	1866,6 ± 4,4

O perfil cromatográfico das espécies analisadas pode ser observado nas Figuras 31 a 35.

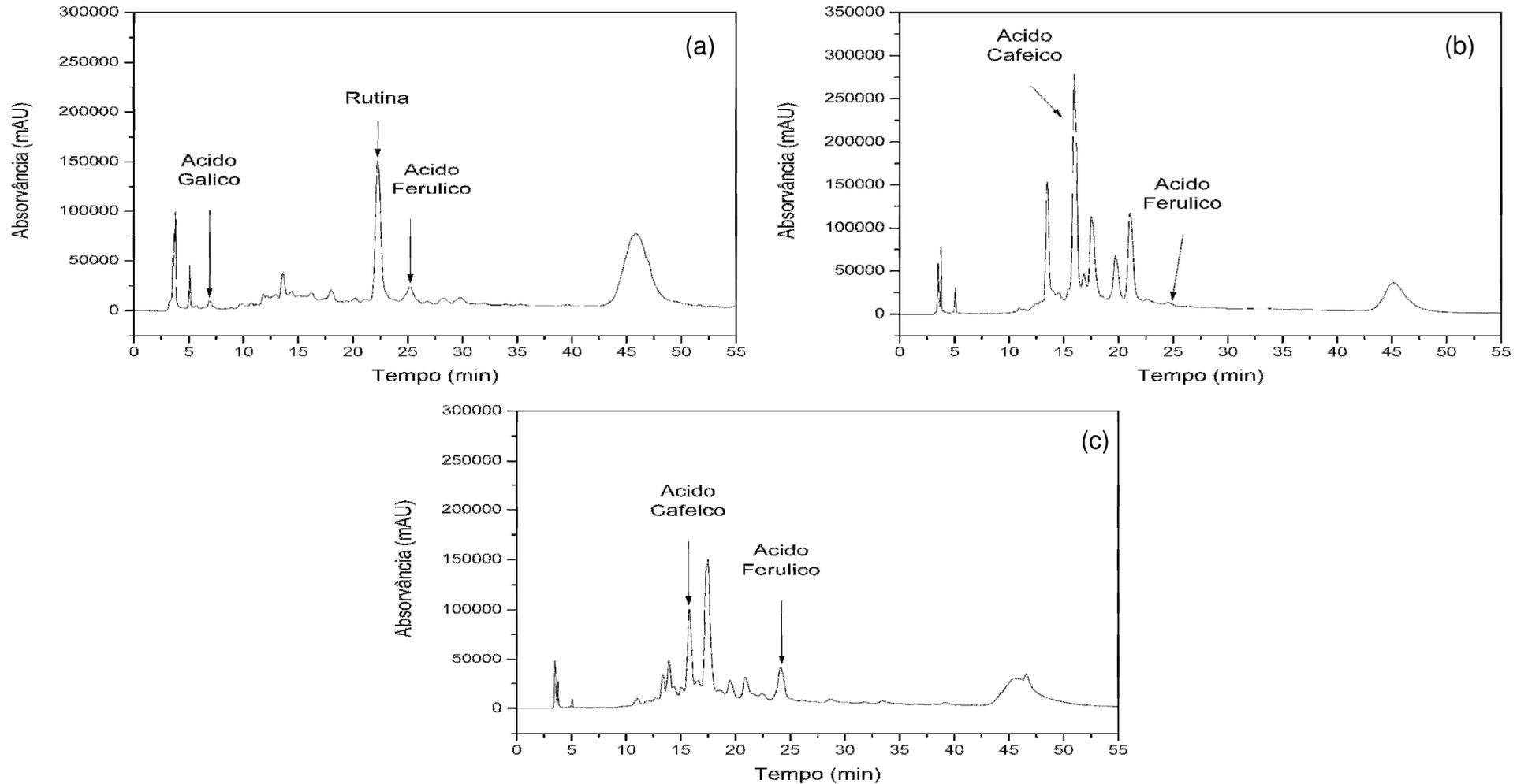


Figura 31 – Perfil cromatográfico da *Cecrópia palmata* Willd.(registro IAN 18555): a) extrato bruto, b) extrato butanol e d) extrato acetato. Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

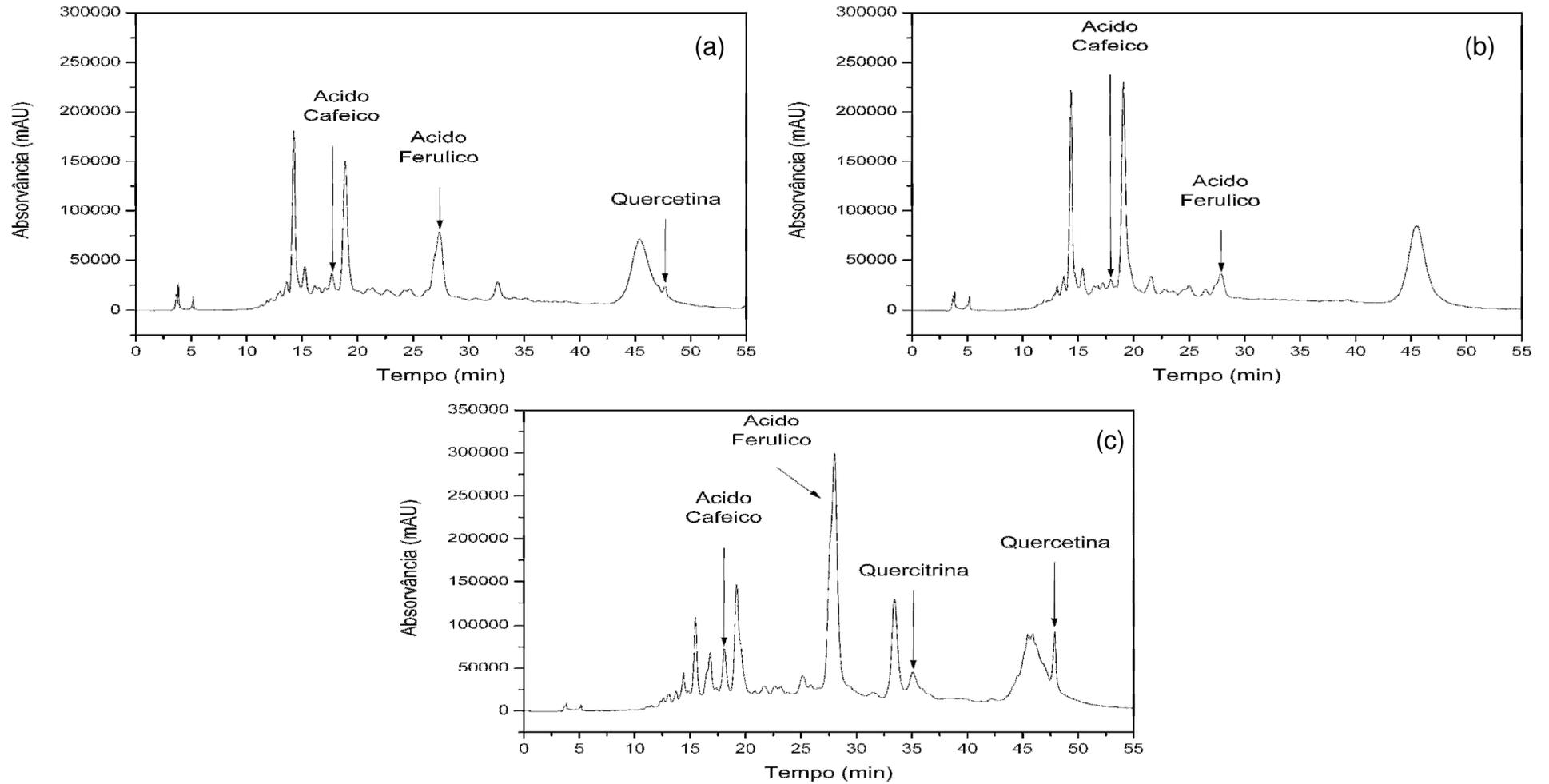


Figura 32 – Perfil cromatográfico da *Cecropia obtusa* (IAN 185555): a) extrato bruto, b) extrato butanol e d) extrato acetato. Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

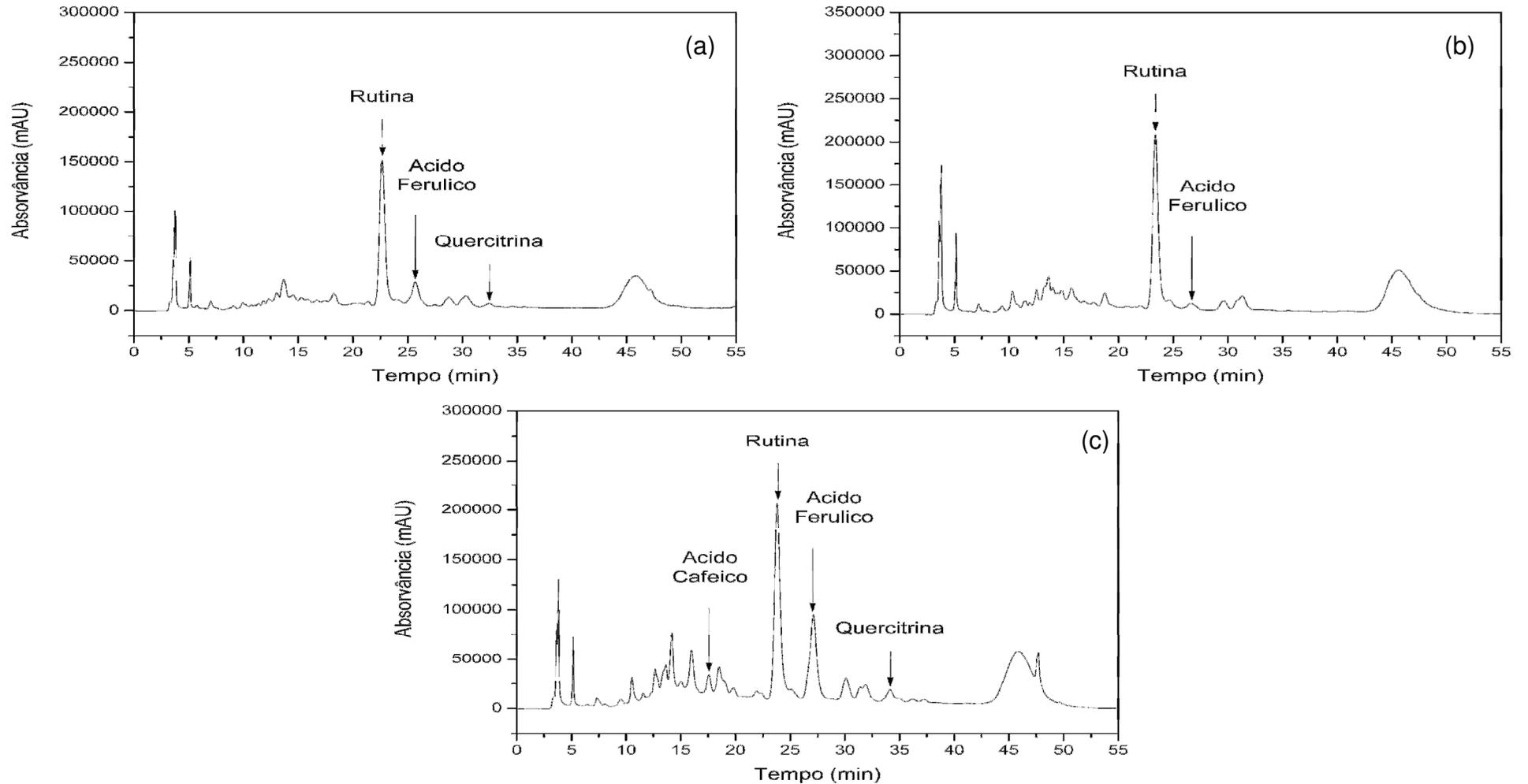


Figura 33 – Perfil cromatográfico da *Bauhinia variegata* (registro IAN 185932): a) extrato bruto, b) extrato butanol e d) extrato acetato. Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

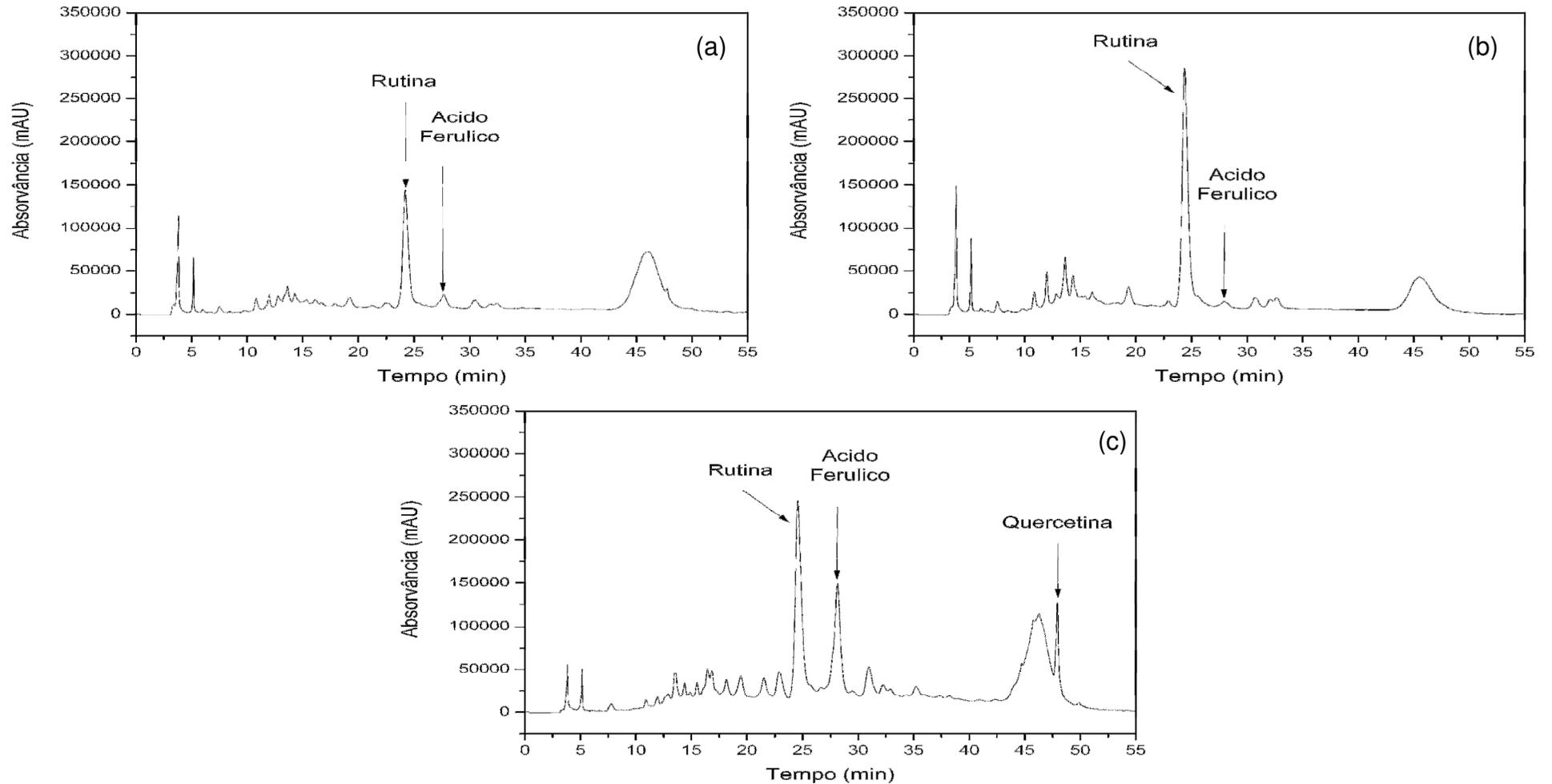


Figura 34 – Perfil cromatográfico da *Bauhinia var. alboflava* Wit (registro IAN 185831): a) extrato bruto, b) extrato butanol e d) extrato acetato. Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

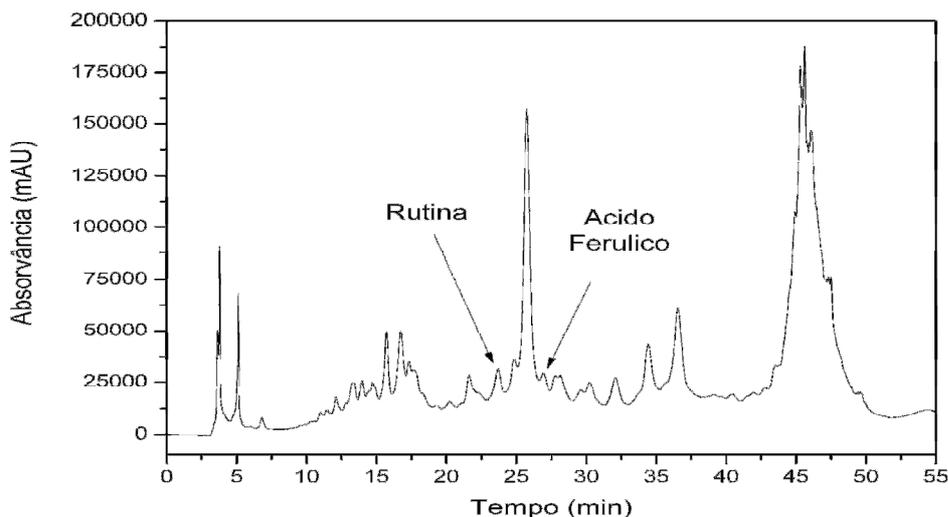


Figura 35 – Perfil cromatográfico da *Mansoa alliacea* (registro IAN 184394) do extrato bruto extrato acetato. Eluentes: ácido ortofosfórico (0,1%, m/m) solvente A e acetonitrila solvente B. Eluição por gradiente: 90-80% A e 10-20% B (0-5 min); 80-75% A e 20-25% B (5-35 min); 75-0% A e 25-100% B (35-55 min). Vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹ (0-35 min); 0,8-1,0 mL min⁻¹ (35-55 min).

5.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu

As amostras de plantas medicinais de uso popular procedentes o Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro apresentaram uma concentração variável de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Os teores médios dos compostos variaram de $2,41 \pm 0,02$ mg a $70,84 \pm 1,23$ mg GAE/g de planta, usando uma curva padrão de ácido gálico ($R = 0,9997$). Os valores médios dos compostos fenólicos totais estão discriminados na Figura 36.

Entre as amostras analisadas, o cajueiro e o boldo apresentaram os maiores teores médios de compostos fenólicos totais $64,20 \pm 0,81$ e $70,84 \pm 1,23$ mg GAE/g de planta, respectivamente.

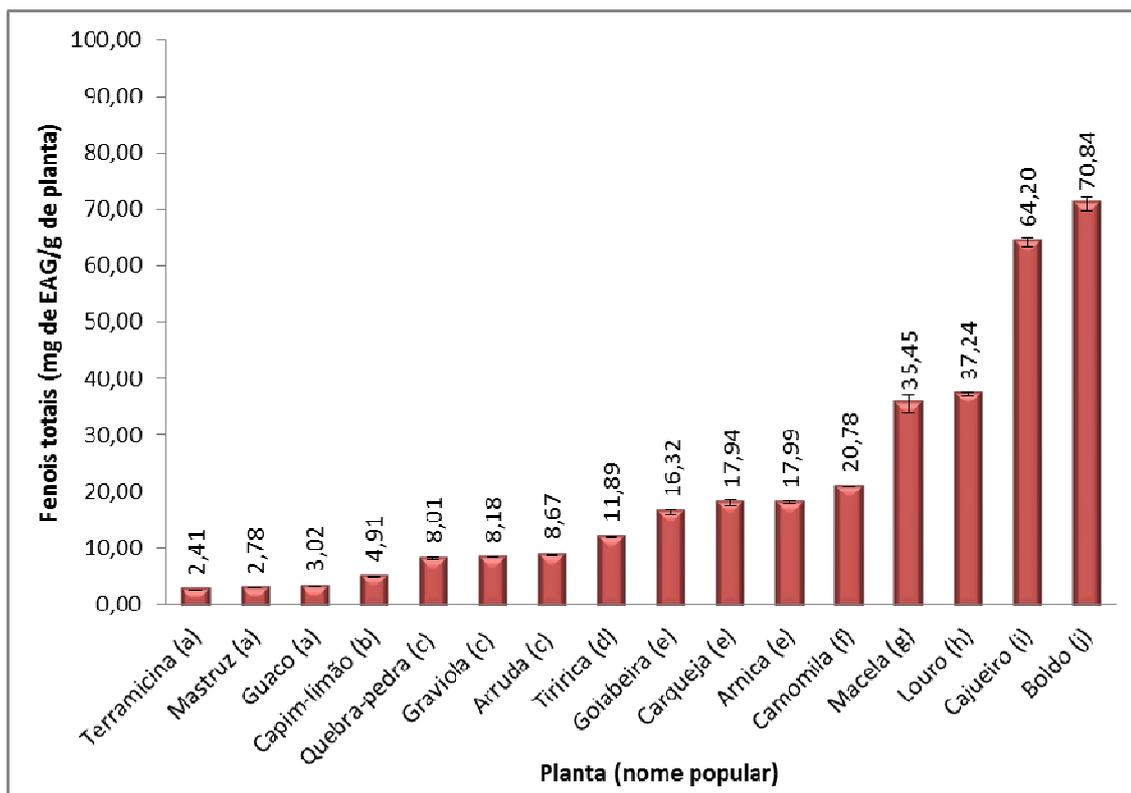


Figura 36 – Teor médio de compostos fenólicos totais nas plantas medicinais de uso popular. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.5 Atividade antirradicalar de compostos fenólicos por método *in vitro*

Os antioxidantes isolados e naturais, extraídos de plantas medicinais, foram avaliados quanto à capacidade de sequestrar radicais livres presentes no meio. A avaliação da atividade antirradicalar de compostos antioxidantes isolados e naturais permitiu a comparação, não apenas da relação estrutura-atividade, mas também da interação entre os compostos atuantes nos extratos vegetais.

5.5.1 Antioxidantes isolados (sintéticos)

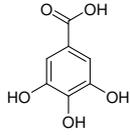
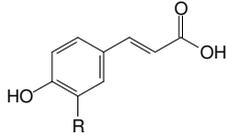
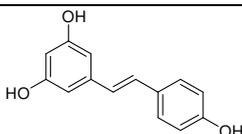
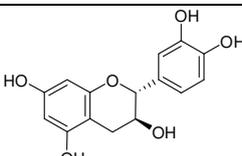
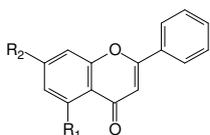
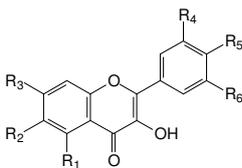
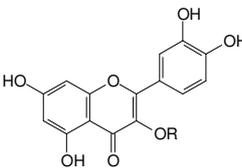
A Tabela 15 apresenta o *ranking* dos antioxidantes isolados em cada método de avaliação da atividade antirradicalar em concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, determinada estatisticamente por ANOVA ao nível de 5% de probabilidade. Para fins de comparação, os antioxidantes isolados estudados foram classificados em grupos, conforme a Tabela 16.

Tabela 15 – Classificação dos antioxidantes isolados pelos métodos *in vitro*.

Radical livre gerado	Concentração Antioxidante ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Ranking</i> da atividade antirradicalar dos compostos fenólicos
DPPH	10	GAL>MIR=FIS=RUT=CATE>CAN>QUE=FER=QUER=CAF=RES=FLA=CRI
	50	CAN=RUT=GAL=FIS=CAF=CATE=MIR=QUER>QUE>FER>RES>FLA=CRI
	100	RUT=FIS=CAF=CATE=CAN=GAL=QUER=MIR=QUE>FER>RES>FLA=CRI
ROO \cdot	10	MIR=GAL=CAF=CAN=QUE=FIS>RUT=CATE=QUER=FER>RES=FLA=CRI
	50	QUE>MIR>FIS=CAF=GAL=CAN>RUT=QUER>FER=CATE>RES=FLA=CRI
	100	QUE=MIR>FIS=CAF>CAN>GAL>RUT>QUER>FER=CATE>RES=FLA=CRI
O $_2$ \cdot^-	10	GAL>RUT=QUER>CAF=QUE>MIR=FIS=CATE=CAN=FER=CRI=FLA=RES
	50	GAL>RUT>QUER=CAF>CATE=QUE>MIR=FIS>CAN=FER=CRI=FLA=RES
	100	GAL>CAF>RUT>QUER=FIS=MIR=CATE=QUE>CAN=FER=CRI=FLA=RES
HO \cdot	10	CRI>QUER>RUT=CAN=FER>GAL=FLA=QUE=CAF=FIS=MIR=CATE=RES
	50	CRI>QUER=RUT=CAN=FER>GAL=FLA=QUE=CAF>FIS=MIR=CATE=RES
	100	CRI=QUER=RUT=CAN=FER=QUE>FLA>GAL=CAF=FIS=MIR>CATE>RES

Legenda: ácido gálico (GAL), catequina (CATE), ácido cafeico (CAF), rutina (RUT), ácido ferúlico (FER), quercitrina (QUER), miricetina (MIR), fisetina (FIS), resveratrol (RES), quercetina (QUE), canferol (CAN), crisina (CRI) e flavona (FLA).

Tabela 16 – Classificação e estrutura química dos antioxidantes em estudo.

Classificação / Antioxidante	Fórmula estrutural
<u>Ácido hidroxibenzóico</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido gálico (GAL) 	
<u>Ácido hidroxicinâmico</u> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido cafeico (CAF): R=OH • Ácido ferúlico (FER): R=OCH₃ 	
<u>Estilbeno</u> <ul style="list-style-type: none"> • Resveratrol (RES) 	
<u>Flavanol</u> <ul style="list-style-type: none"> • Catequina (CATE) 	
<u>Flavona</u> <ul style="list-style-type: none"> • Crisina (CRI): R₁ = R₂ = OH • Flavona (FLA): R₁ = R₂ = H 	
<u>Flavonol – aglicosilado</u> <ul style="list-style-type: none"> • Canferol (CAN): R_{1,3,5}=OH; R_{2,4,6}=H • Fisetina (FIS): R_{3,4,5}=OH; R_{1,2,6}=H • Miricetina (MIR): R_{1,3,4,5,6}=OH; R₂=H • Quercetina (QUE): R_{1,3,4,5}=OH; R_{2,6}=H 	
<u>Flavonol – glicosilado</u> <ul style="list-style-type: none"> • Quercitrina (QUER): R=raminose • Rutina (RUT): R=rutinose 	

Nas Figuras 37 são apresentados os percentuais médio da atividade antioxidante dos compostos fenólicos isolados entre os diferentes radicais livres estudados.

A atividade antirradicalar dos compostos fenólicos frente ao radical DPPH foi mais intensa do que entre os outros radicais estudados (Tabela 17). A atividade com o DPPH atingiu seu máximo, para a maioria dos antioxidantes, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, impossibilitando uma classificação hierárquica entre os mesmos. Já na concentração de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ é possível realizar uma classificação dos antioxidantes de maior e menor atividade antirradicalar.

Frente ao radical peróxido, os compostos fenólicos reagiram com menos intensidade, onde nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi observado atividade abaixo de 40% (Tabela 18). Para comparar o poder antioxidante e classificar os dos compostos fenólicos por este método foi levado em consideração a concentração de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Já na quantificação pelos métodos de avaliação *in vitro* dos radicais hidroxil (Tabela 19) e superóxido (Tabela 20), considerou-se a concentração de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para fins de classificação dos antioxidantes isolados. As diferenças de reatividade observadas nos ensaios *in vitro* podem ser explicadas pelos diferentes princípios dos métodos empregados. Métodos baseados no uso de um substrato (radicais O_2^{\bullet} e ROO^{\bullet}) e na interação direta dos antioxidantes com radicais livres (radicais HO^{\bullet} e DPPH $^{\bullet}$) podem apresentar respostas diferentes para os mesmos antioxidantes. Além disso, os radicais livres estudados apresentam reatividades diferentes se comparados seus potenciais padrão de redução (E^0), sendo +2,30 V para HO^{\bullet} , +0,94 V para O_2^{\bullet} e de +0,71 a +1,44 V para radicais ROO^{\bullet} . Com base nos resultados apresentados, este trabalho permite concluir que a avaliação da bioatividade de extratos vegetais a partir da capacidade dos produtos em sequestrar radicais livres pode levar a resultados contraditórios. Neste contexto, o uso de radicais livres mais reativos e danosos ao organismo, como HO^{\bullet} e ROO^{\bullet} parecem mais representativos do estresse oxidativo em nível celular. Além disso, a correlação de respostas *in vitro* com respostas *ex vivo* e *in vivo* deve ser avaliada para a validação de testes de bioatividade de extratos vegetais para fins terapêuticos.

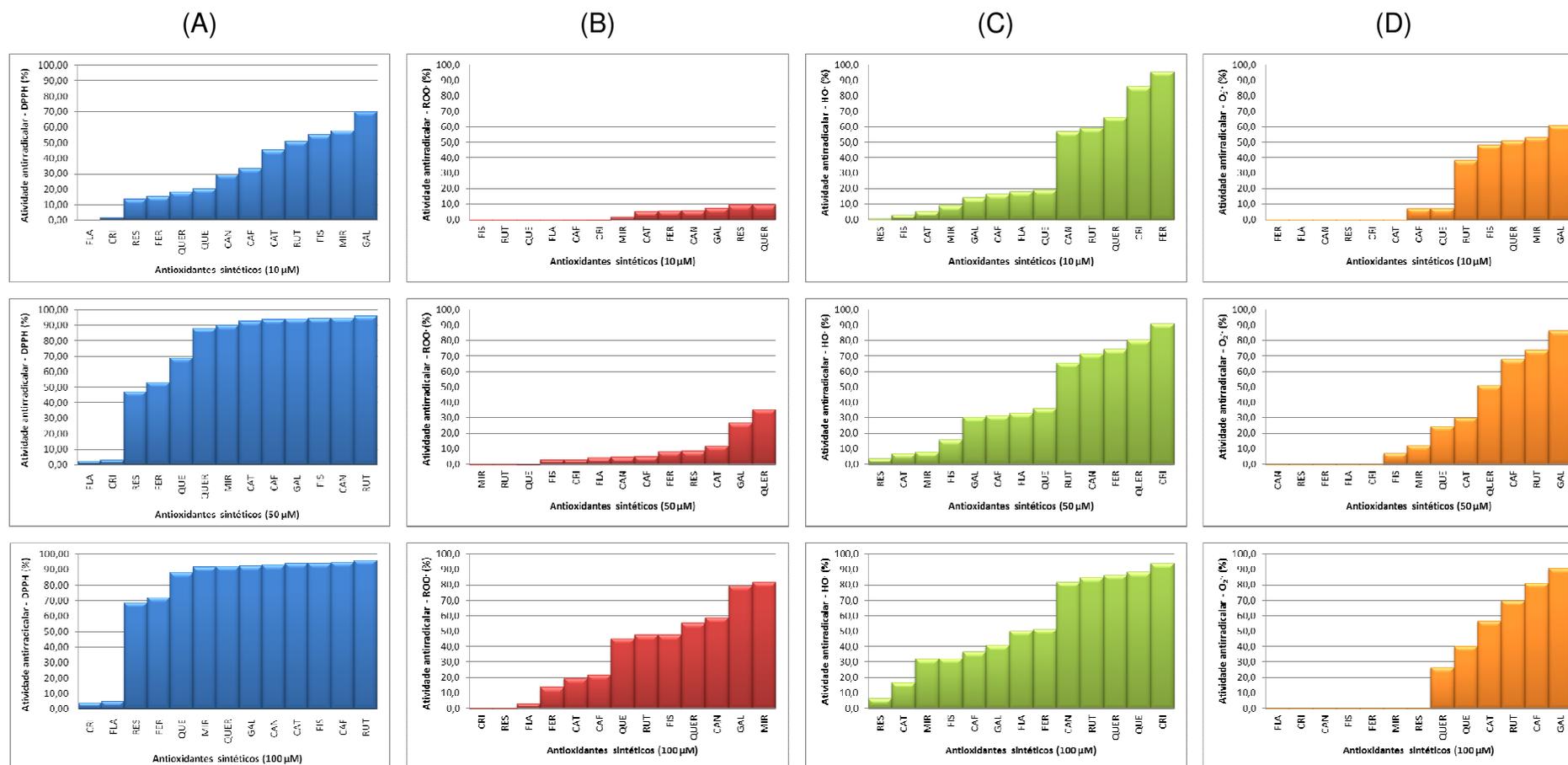


Figura 37 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes isolados, em diferentes concentrações, frente ao radical DPPH (A), peróxil (B), hidroxil (C) e superóxido (D). Legenda: ácido gálico (GAL), catequina (CAT), ácido cafeico (CAF), rutina (RUT), ácido ferúlico (FER), quercitrina (QUER), miricetina (MIR), fisetina (FIS), resveratrol (RES), quercetina (QUE), canferol (CAN), crisina (CRI) e flavona (FLA).

Tabela 17 – Atividade antirradicalar frente ao radical DPPH dos antioxidantes isolados.

Antioxidante	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ácido cafeico	14,95 \pm 1,11 ^{e,f}	94,49 \pm 0,67 ^{a,b}	95,32 \pm 0,28 ^{a,b}
Ácido ferúlico	19,09 \pm 2,21 ^e	53,90 \pm 0,23 ^f	73,04 \pm 1,35 ^e
Ácido gálico	70,44 \pm 4,32 ^a	95,53 \pm 0,56 ^{a,b}	93,80 \pm 1,19 ^{a,b,c}
Canferol	31,36 \pm 2,77 ^d	96,79 \pm 0,31 ^a	95,14 \pm 0,14 ^{a,b}
Catequina	46,20 \pm 0,77 ^c	92,97 \pm 0,29 ^{b,c}	95,18 \pm 1,18 ^{a,b}
Crisina	6,39 \pm 0,03 ^f	2,57 \pm 1,61 ^h	3,22 \pm 1,97 ^g
Fisetina	55,77 \pm 0,18 ^b	95,19 \pm 1,03 ^{a,b}	95,85 \pm 1,08 ^{a,b}
Flavona	7,305 \pm 0,47 ^f	3,75 \pm 1,05 ^h	5,89 \pm 0,48 ^g
Miricetina	58,38 \pm 6,37 ^b	90,72 \pm 0,03 ^{c,d}	90,51 \pm 0,20 ^{c,d}
Quercetina	20,34 \pm 0,19 ^e	70,05 \pm 0,31 ^e	88,71 \pm 0,14 ^d
Quercitrina	18,38 \pm 0,62 ^e	88,66 \pm 0,19 ^d	92,35 \pm 0,83 ^{b,c,d}
Resveratrol	13,63 \pm 0,20 ^{e,f}	47,48 \pm 1,17 ^g	68,79 \pm 1,63 ^f
Rutina	51,20 \pm 0,49 ^{b,c}	96,51 \pm 0,19 ^a	96,98 \pm 0,40 ^a

Análise (n=3). Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18 – Atividade antirradicalar frente ao radical peroxil dos antioxidantes isolados.

Antioxidante	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ácido cafeico	25,13 \pm 3,41 ^b	52,10 \pm 2,74 ^{c,d}	71,55 \pm 0,88 ^b
Ácido ferúlico	0,51 \pm 0,44 ^d	9,45 \pm 2,37 ^f	17,23 \pm 1,27 ^g
Ácido gálico	26,19 \pm 0,03 ^{a,b}	51,93 \pm 0,54 ^{c,d}	56,81 \pm 0,25 ^d
Canferol	22,38 \pm 5,95 ^{b,c}	50,60 \pm 0,61 ^d	63,76 \pm 2,18 ^c
Catequina	2,39 \pm 1,20 ^d	7,06 \pm 0,77 ^f	16,54 \pm 0,33 ^g
Crisina	*	*	*
Fisetina	13,79 \pm 1,29 ^c	57,23 \pm 0,23 ^c	77,33 \pm 1,65 ^b
Flavona	*	*	*
Miricetina	36,06 \pm 2,57 ^a	71,29 \pm 0,64 ^b	85,22 \pm 0,24 ^a
Quercetina	19,03 \pm 1,96 ^{b,c}	77,31 \pm 0,50 ^a	88,65 \pm 0,13 ^a
Quercitrina	2,14 \pm 0,96 ^d	15,73 \pm 0,01 ^e	24,20 \pm 1,95 ^f
Resveratrol	*	*	*
Rutina	2,84 \pm 1,56 ^d	19,47 \pm 1,95 ^e	37,58 \pm 3,30 ^e

Análise (n=3); * não apresentou atividade antirradicalar. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19 – Atividade antirradicalar frente ao radical hidroxil dos antioxidantes isolados.

Antioxidante	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ácido cafeico	20,7 \pm 3,1 ^e	48,6 \pm 1,6 ^e	48,5 \pm 1,3 ^{de}
Ácido ferúlico	92,9 \pm 2,7 ^a	80,2 \pm 0,7 ^{bc}	71,0 \pm 2,3 ^c
Ácido gálico	22,9 \pm 2,0 ^{ef}	55,4 \pm 3,3 ^e	61,6 \pm 0,2 ^d
Canferol	64,9 \pm 0,9 ^d	90,3 \pm 1,5 ^{cd}	93,3 \pm 1,3 ^b
Catequina	10,0 \pm 1,4 ^{gh}	19,2 \pm 3,0 ^g	28,7 \pm 3,5 ^f
Crisina	89,9 \pm 2,9 ^b	92,2 \pm 1,5 ^a	99,0 \pm 0,2 ^a
Fisetina	3,3 \pm 0,4 ^{gh}	56,8 \pm 2,1 ^f	73,3 \pm 0,9 ^e
Flavona	36,6 \pm 1,0 ^e	65,5 \pm 0,5 ^e	75,9 \pm 0,1 ^c
Miricetina	15,4 \pm 0,5 ^{fg}	64,2 \pm 0,8 ^{fg}	80,5 \pm 1,2 ^e
Quercetina	33,5 \pm 1,6 ^e	78,8 \pm 2,6 ^e	62,3 \pm 1,2 ^{ab}
Quercitrina	72,7 \pm 0,8 ^c	91,7 \pm 0,8 ^b	95,9 \pm 1,2 ^b
Resveratrol	1,0 \pm 0,9 ^h	6,6 \pm 0,6 ^g	9,8 \pm 0,7 ^g
Rutina	72,6 \pm 1,9 ^d	95,3 \pm 3,3 ^d	95,3 \pm 2,6 ^b

Análise (n=3). Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20 – Atividade antirradicalar frente ao radical superóxido dos antioxidantes isolados.

Antioxidante	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ácido cafeico	7,4 \pm 2,1 ^d	68,1 \pm 0,4 ^b	81,1 \pm 2,4 ^b
Ácido ferúlico	*	*	*
Ácido gálico	60,9 \pm 0,4 ^a	86,5 \pm 3,5 ^a	90,9 \pm 1,4 ^a
Canferol	*	*	*
Catequina	*	30,2 \pm 3,9 ^d	56,7 \pm 2,7 ^d
Crisina	*	*	*
Fisetina	48,4 \pm 2,1 ^b	7,3 \pm 3,6 ^e	*
Flavona	*	*	*
Miricetina	53,5 \pm 2,3 ^b	12,1 \pm 3,7 ^e	*
Quercetina	51,0 \pm 1,1 ^d	24,4 \pm 3,0 ^d	40,3 \pm 1,6 ^e
Quercitrina	7,4 \pm 1,4 ^b	51,2 \pm 1,0 ^c	26,6 \pm 1,3 ^f
Resveratrol	*	*	*
Rutina	38,3 \pm 1,5 ^c	73,9 \pm 1,1 ^b	70,1 \pm 2,2 ^c

Análise (n=3); * não apresentou atividade antirradicalar. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diante da classificação dos antioxidantes isolados pelos métodos *in vitro* na presença de substrato para ROs (radicais peróxil e superóxido), pôde-se observar que o ácido cafeico e o ácido gálico apresentaram maior atividade antirradicalar em relação ao ácido ferúlico, possivelmente em virtude da presença de um maior número de grupamentos OH e pelo fato de sua quantificação ter sido realizado sem a separação dos subprodutos gerados na reação.

No entanto, pelo método do radical hidroxil na ausência de substrato, o ácido ferúlico foi mais antioxidante do que os outros ácidos estudados, o que pode ser atribuído ao único grupo hidroxila *para*-substituído em um anel aromático, que está ligado a uma cadeia lateral altamente conjugada. Esta substituição permite que o radical fenoxi do ácido ferúlico se deslocalize em toda a molécula e, portanto, seja estabilizado.

A crisina e a flavona foram os flavonoides que apresentaram menor atividade antirradicalar nos métodos *in vitro* com substratos para ROs. No entanto, pelo método do radical hidroxil (sem substrato) esse comportamento não foi observado, mostrando uma maior atividade antirradicalar da crisina em relação às outras metodologias.

Os flavonóis-glicosilados, como no caso da quercitrina e da rutina, apresentaram uma maior atividade antioxidante em relação aos flavonóis-aglicosilados (canferol, fisetina, miricetina e quercetina) que apresentam uma hidroxila no lugar do glicosídeo. A mudança na posição do grupo hidroxil na estrutura dos flavonóis-aglicosilados influencia em uma maior ou menor atividade antioxidante.

O grupo flavanol, representado pela catequina, comprova que flavonoides com a ausência da dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 da estrutura aromática central é um fator determinante na ação radicalar, influenciando numa menor atividade antirradicalar, deste composto.

5.5.2 Antioxidantes naturais

A Tabela 21 apresenta o *ranking* dos antioxidantes naturais em cada método de avaliação da atividade antirradicalar em concentrações de 1, 10 e 20 g·L⁻¹, determinada estatisticamente por ANOVA ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 – Classificação dos antioxidantes naturais pelos métodos *in vitro*.

Radical livre gerado	Concentração extrato (g·L ⁻¹)	Ranking da atividade antirradicalar dos compostos fenólicos
DPPH	1	GRA = MAS = CAP = CAM = ARR = GOI = ARN = CAR = QUEB = TER = LOU = MAC < BOL = CAJ < TIR = GUA
	10	GUA < MAS < CAP = TER < ARR < GRA < TIR = ARN = CAR = MAC = QUEB = BOL = GOI = CAJ = LOU = CAM
	20	GUA < MAS < CAP = TER < ARR = GRA < TIR < CAR = GOI = ARN = BOL = MAC = LOU = QUEB = CAM = CAJ
ROO·	1	TER = MAS = GUA < GRA < GOI = TIR < QUEB = ARN = CAP = ARR = LOU = CAM = CAR = BOL < MAC = CAJ
	10	TER < MAS = GUA < GRA < GOI < TIR = CAP < QUEB = ARR = LOU = CAR = BOL = ARN = CAM = MAC = CAJ
	20	TER < MAS < GUA < GOI = GRA < CAP = ARR = TIR = QUEB = CAR = LOU = CAM = MAC = BOL = ARN = CAJ
O ₂ ⁻	1	QUEB = TIR = GUA = TER = MAS = LOU = CAM = CAJ < ARR < ARN < MAC < GRA = BOL = CAP = CAR = GOI
	10	QUEB = TER = MAS = GUA = CAM = MAC = CAJ = TIR < BOL < CAR = LOU < CAP = GOI = ARN = ARR < GRA
	20	BOL = CAM = MAC = MAS = GUA = QUEB = CAJ = TER = CAR < GOI = TIR = LOU < ARR = CAP < ARN = GRA

Legenda: CAR (carqueja); MAC (macela); ARN (Arnica); ARR (arruda); BOL (boldo-chileno), CAJ (cajueiro); CAM (camomila); CAP (capim-limão); GOI (goiabeira); GRA (graviola); GUA (guaco); LOU (louro); MAS (mastruz); QUEB (quebra-pedra); TER (terramicina); e TIR (tiririca).

Nas Figuras 38 são apresentados os percentuais médios da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturais das plantas medicinais de uso popular entre os diferentes radicais livres estudados.

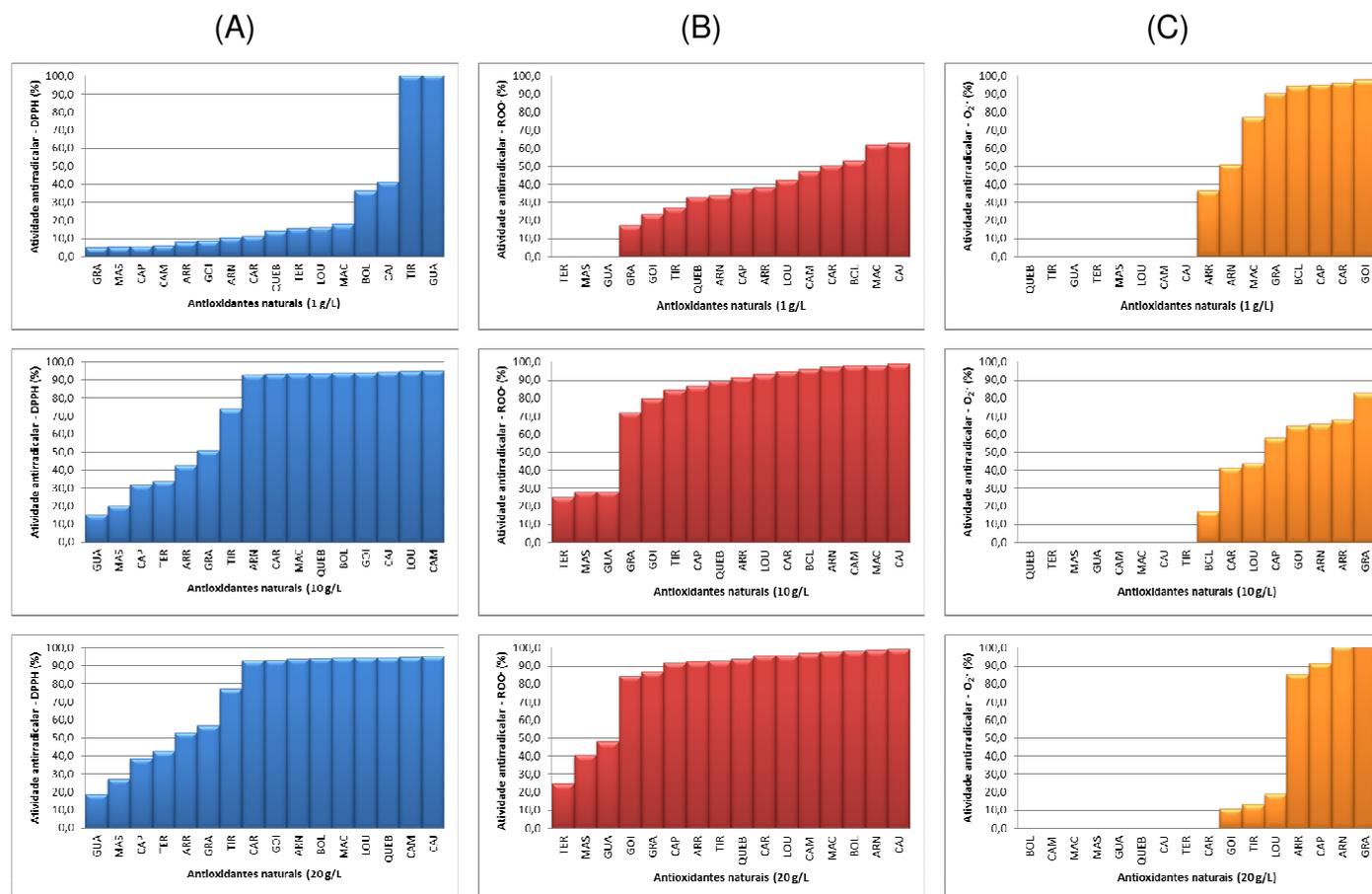


Figura 38 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes naturais, em diferentes concentrações, frente ao radical DPPH (A), peróxil (B) e superóxido (C). CAR (carqueja); MAC (macela); ARN (Arnica); ARR (arruda); BOL (boldo-chileno), CAJ (cajueiro); CAM (camomila); CAP (capim-limão); GOI (goiabeira); GRA (graviola); GUA (guaco); LOU (louro); MAS (mastruz); QUEB (quebra-pedra); TER (terramicina); e TIR (tiririca).

A atividade antirradicalar dos compostos fenólicos frente ao radical DPPH (Tabela 22) e peroxil (Tabela 23) foi mais intensa do que com o radical superóxido (Tabela 24). A atividade com o DPPH e o peroxil atingiu seu máximo, para a maioria dos antioxidantes, nas concentrações de 10 e 20 g·L⁻¹, impossibilitando uma classificação hierárquica entre os mesmos. Já na concentração de 1 g·L⁻¹ é possível realizar uma classificação dos antioxidantes de maior e menor atividade antirradicalar.

Tabela 22 – Atividade antirradicalar frente ao DPPH das planta medicinais.

Planta medicinal	1 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
Arnica	10,6 ± 2,8 ^{def}	93,1 ± 0,1 ^a	93,9 ± 0,1 ^a
Arruda	8,2 ± 3,1 ^{ef}	42,6 ± 1,7 ^d	52,9 ± 0,0 ^c
Boldo	36,4 ± 1,3 ^b	93,8 ± 0,4 ^a	94,2 ± 0,0 ^a
Cajueiro	41,5 ± 1,5 ^b	94,6 ± 0,4 ^a	95,4 ± 0,2 ^a
Camomila	6,2 ± 0,3 ^f	95,2 ± 0,0 ^a	94,7 ± 0,4 ^a
Capim-limão	5,7 ± 2,7 ^f	31,8 ± 0,9 ^e	38,6 ± 2,1 ^d
Carqueja	11,6 ± 2,2 ^{cdef}	93,3 ± 0,4 ^a	93,0 ± 0,0 ^a
Goiabeira	8,9 ± 1,5 ^{ef}	93,9 ± 0,2 ^a	93,3 ± 0,1 ^a
Graviola	5,0 ± 3,6 ^f	50,7 ± 0,5 ^c	56,6 ± 1,6 ^c
Guaco	100,8 ± 0,0 ^a	15,3 ± 3,3 ^g	18,6 ± 2,2 ^f
Louro	16,4 ± 2,1 ^{cd}	94,7 ± 0,2 ^a	94,5 ± 0,1 ^a
Macela	18,0 ± 0,9 ^c	93,5 ± 0,2 ^a	94,4 ± 0,4 ^a
Mastruz	5,5 ± 3,1 ^f	20,4 ± 1,4 ^f	27,3 ± 4,0 ^e
Quebra-pedra	14,3 ± 2,0 ^{cde}	93,7 ± 0,2 ^a	94,5 ± 0,6 ^a
Terramicina	15,8 ± 2,5 ^{cd}	33,7 ± 0,5 ^e	42,5 ± 0,8 ^d
Tiririca	100,5 ± 0,0 ^a	74,0 ± 3,7 ^b	77,2 ± 2,2 ^b

Análise (n=3). Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23 – Atividade antirradicalar frente ao peróxido das plantas medicinais.

Planta medicinal	1 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
Arnica	34,1 ± 0,9 ^f	97,5 ± 0,3 ^{ab}	98,9 ± 0,2 ^a
Arruda	38,3 ± 0,4 ^{ef}	91,5 ± 0,6 ^{ef}	92,5 ± 0,4 ^d
Boldo	52,9 ± 2,2 ^b	96,2 ± 0,7 ^{bc}	98,3 ± 0,3 ^{ab}
Cajueiro	63,0 ± 1,3 ^a	99,0 ± 0,2 ^a	99,5 ± 0,3 ^a
Camomila	47,4 ± 1,7 ^{cd}	98,1 ± 0,8 ^{ab}	97,1 ± 1,0 ^{ab}
Capim-limão	37,6 ± 2,7 ^{ef}	86,8 ± 0,5 ^g	91,7 ± 0,7 ^d
Carqueja	50,6 ± 2,8 ^{bc}	94,8 ± 0,1 ^{cd}	95,7 ± 0,2 ^{bc}
Goiabeira	23,6 ± 0,4 ^g	79,9 ± 1,3 ^h	84,6 ± 0,8 ^e
Graviola	17,5 ± 0,4 ^h	72,3 ± 0,5 ⁱ	86,7 ± 1,2 ^e
Guaco	*	28,3 ± 1,0 ^j	48,1 ± 2,7 ^f
Louro	42,4 ± 1,9 ^{de}	93,1 ± 0,3 ^{de}	95,8 ± 0,0 ^{bc}
Macela	62,1 ± 3,1 ^a	98,2 ± 0,7 ^{ab}	97,7 ± 0,9 ^{ab}
Mastruz	*	28,3 ± 2,1 ^j	40,7 ± 1,5 ^g
Quebra-pedra	33,2 ± 0,8 ^f	89,9 ± 0,6 ^f	94,0 ± 0,1 ^{cd}
Terramicina	*	25,3 ± 1,4 ^k	24,8 ± 0,8 ^h
Tiririca	27,3 ± 2,4 ^g	84,6 ± 0,1 ^g	93,0 ± 0,5 ^d

Análise (n=3); * não apresentou atividade antirradicalar. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Frente ao radical superóxido, os compostos fenólicos reagiram com menos intensidade. Por isso, para comparar o poder antioxidante e classificar os compostos fenólicos por este método foi levado em consideração a concentração de 10 g·L⁻¹.

Tabela 24 – Atividade antirradicalar frente ao superóxido das planta medicinais.

Planta medicinal	1 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹	20 g·L ⁻¹
Arnica	51,0 ± 2,4 ^d	65,5 ± 3,2 ^b	101,1 ± 0,6 ^a
Arruda	36,6 ± 3,1 ^e	68,2 ± 2,7 ^b	85,5 ± 4,1 ^b
Boldo	94,6 ± 0,9 ^{ab}	17,1 ± 2,8 ^e	*
Cajueiro	*	*	*
Camomila	*	*	*
Capim-limão	95,6 ± 1,2 ^{ab}	58,1 ± 0,1 ^c	91,5 ± 2,3 ^b
Carqueja	96,4 ± 0,1 ^a	41,5 ± 3,3 ^d	*
Goiabeira	98,2 ± 0,3 ^a	64,6 ± 2,2 ^{bc}	10,8 ± 0,4 ^d
Graviola	90,9 ± 0,9 ^b	83,0 ± 0,3 ^a	101,0 ± 1,5 ^a
Guaco	*	*	*
Louro	*	44,1 ± 3,3 ^d	19,2 ± 4,1 ^c
Macela	77,2 ± 3,3 ^c	*	*
Mastruz	*	*	*
Quebra-pedra	*	*	*
Terramicina	*	*	*
Tiririca	*	*	13,4 ± 2,2 ^{cd}

Análise (n=3); * não apresentou atividade antirradicalar. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para o estudo da atividade antirradicalar dos antioxidantes naturais frente aos radicais DPPH, peroxil e superóxido foram utilizados os extratos, sem discriminação de qual antioxidante presente na amostra foi mais “ativo” na ação antirradicalar. Já na avaliação frente ao radical OH• (Tabela 25), gerado pela fotodecomposição do H₂O₂, foi acompanhado, por HPLC, o decaimento do antioxidante majoritário, denominado marcador analítico, presente no extrato bruto das plantas medicinais arnica (ARN), cajueiro (CAJ), louro (LOU), boldo (BOL) e macela (MAC). Nas demais amostras não foram observados marcadores analíticos identificáveis pelo método desenvolvido por HPLC-DAD.

Tabela 25 – Atividade antirradicalar frente ao hidroxil dos compostos fenólicos naturais.

Espécie	Marcador analítico	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Arnica	Quercitrina	56,76 \pm 7,06 ^b	80,72 \pm 2,00 ^b	81,94 \pm 0,97 ^a
Cajueiro	Quercitrina	89,77 \pm 1,14 ^a	79,78 \pm 1,09 ^b	88,16 \pm 0,63 ^a
Louro	Quercitrina	90,74 \pm 0,12 ^a	93,55 \pm 0,55 ^a	*
Boldo	Catequina	81,34 \pm 3,27 ^a	90,07 \pm 0,88 ^a	*
Macela	Quercetina	45,29 \pm 2,35 ^b	91,72 \pm 3,53 ^a	*

Análise (n=3). * não avaliado. Letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Figura 39 é apresentada a comparação percentual de atividade antirradicalar dos compostos naturais (marcador analíticos) e isolados (padrões sintéticos).

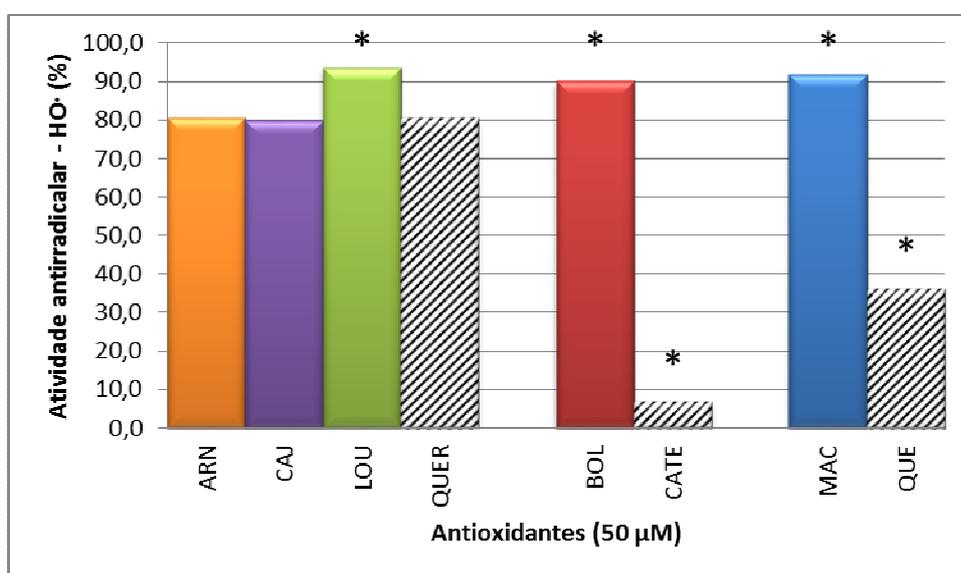


Figura 39 – Atividade antirradicalar dos antioxidantes naturais, na concentração de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, frente ao radical hidroxil. Legenda: (ARN) arnica; (CAJ) cajueiro; (LOU) louro; (QUER) quercitrina; (BOL) boldo; (CATE) catequina; (MAC) macela; (QUE) quercetina. (*)diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas plantas medicinais arnica e cajueiro, o marcador analítico quercitrina, apresentou atividade igual ao antioxidante isolado. Já no louro foi observado um aumento significativo da atividade antioxidante do marcador analítico quercitrina, o

que pode ter ocorrido pela ação conjunta dos compostos presentes no extrato de forma sinérgica.

Da mesma forma que o louro, o boldo e a macela apresentaram uma ação antirradicalar significativa de sinergismo em seu antioxidante marcador analítico, catequina e quercetina, respectivamente. Isso pode ser observado pela comparação com a atividade antirradicalar com os mesmos antioxidantes isolados na mesma concentração.

Esses resultados mostram que outros compostos antioxidantes presentes nos extratos podem potencializar a cinética de reação de um antioxidante no extrato vegetal contendo outras espécies de estrutura molecular semelhante ou, ainda, estruturas mais complexas.

5.6 Atividade antirradicalar de compostos fenólicos por métodos *ex vivo*

Com o objetivo de elucidar a efetiva contribuição dos antioxidantes estudados na ação antioxidante total da planta, um *ranking* dos antioxidantes isolados foi realizado com base nos resultados das atividades *in vitro* e esses foram comparados à atividade em nível celular (*ex vivo*).

Em cada método *in vitro* foram enumerados os antioxidante de um a treze, sendo um para a menor atividade antioxidante e treze para a maior. Após, foram somados os valores atribuídos a cada um nas diferentes metodologias aplicadas. Foram selecionados dois antioxidantes de maior atividade (quercitrina e crisina), um de atividade intermediária (catequina) e dois de menor atividade antirradicalar (resveratrol e quercetina).

Níveis de DCFH-DA foram determinados nos antioxidantes isolados (Figura 40), em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, como indicador da produção de substâncias oxidantes pelos componentes celulares. A partir dos resultados pode-se observar que a quercitrina foi o composto antioxidante que apresentou uma menor produção de espécies reativas e agentes oxidantes, indicando estatisticamente que a mesma é o melhor antioxidante em relação aos demais.

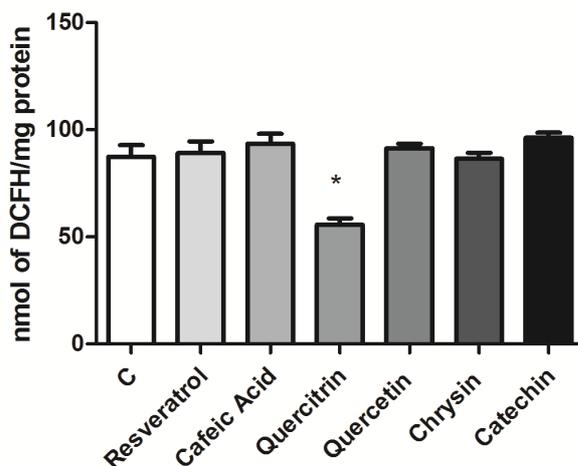


Figura 40 – Níveis de DCFH-DAD entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A análise da atividade de CAT entre os diferentes antioxidantes isolados analisados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, não apresentou diferença significativa em relação ao controle, conforme Figura 41. Se superior ao controle, é indicativo de composto com ação antioxidante. Dessa forma, observa-se que os mesmos não apresentam atividade antioxidante significativa em nível celular a partir da ação sobre a enzima catalase.

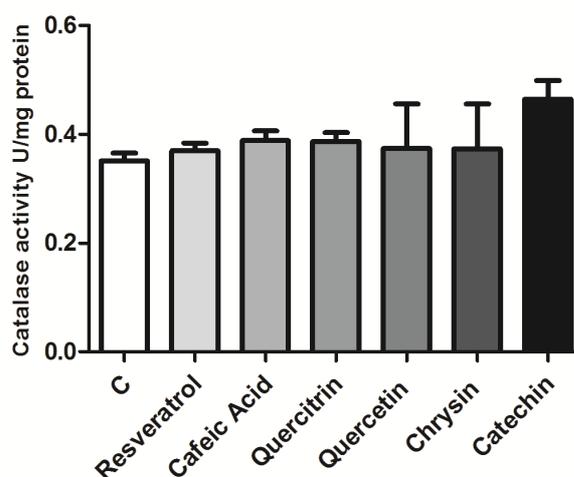


Figura 41 – Níveis de catalase entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

A análise da atividade da enzima SOD entre os diferentes antioxidantes isolados analisados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi significativa, apenas para a quercitrina,

indicando novamente a mesma como um potente antioxidante em relação ao controle, conforme Figura 42.

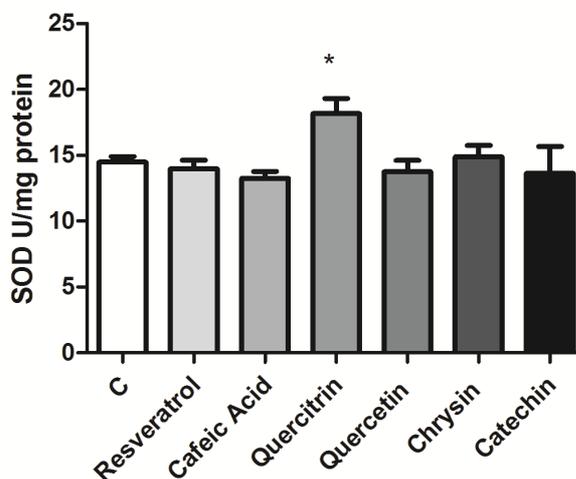


Figura 42 – Níveis de SOD entre os antioxidantes isolados em $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Portanto, os resultados obtidos em nível celular indicam que a quercitrina possui uma ação significativamente maior em relação aos demais compostos fenólicos estudados.

5.7 Permeação de compostos fenólicos em membranas

Os antioxidantes isolados resveratrol, ácido cafeico, quercitrina, quercetina, crisina e catequina, bem como os extratos das plantas arnica, cajueiro, louro, boldo e macela foram analisados pela metodologia PAMPA. Esta metodologia tem sido empregada na análise *ex vivo* da permeabilidade de fármacos na membrana lipídica (CHEN et al., 2008). Neste trabalho, esta técnica foi aplicada, de forma pioneira na avaliação da permeação celular em membranas lipídicas de compostos antioxidantes.

Dos antioxidantes isolados, apenas o ácido cafeico apresentou permeabilidade celular em relação aos demais na concentração de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, utilizada neste estudo, com coeficiente de permeabilidade efetiva de $0,00104 \pm 8,61 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$.

Já nos extratos das plantas medicinais de uso popular, observou-se que a quercitrina apresentou permeabilidade celular somente nos extratos de arnica e louro, com coeficientes de $0,0120 \pm 5,89 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ e $0,0253 \pm 3,98 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$, respectivamente. Esta permeabilidade foi acompanhada pela medida cromatográfica do marcador analítico por HPLC-DAD presente nestas amostras, na mesma concentração utilizada para os antioxidantes isolados ($50 \mu\text{M}$).

Observou-se que a quercitrina quando isolada não foi capaz de permear a membrana celular. Porém nos extratos analisados, em que sua presença foi identificada, houve permeabilidade celular. Esses resultados mostram que no extrato da planta a espécie antioxidante apresenta permeabilidade em membranas, além de apresentar alta ação antirradicalar em nível celular.

5.8 Estudo comparativo da bioatividade *in vitro* e *ex vivo* dos antioxidantes isolados e naturais

Na análise da bioatividade *in vitro* dos antioxidantes isolados, pode-se verificar que na concentração de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pelos métodos de DPPH e peroxil, a quercitrina foi o composto antioxidante que apresentou, estatisticamente, uma melhor atividade antirradicalar em relação aos outros compostos analisados. Os compostos crisina, flavona e resveratrol apresentaram uma menor atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, peroxil e superóxido.

Ao comparar estes resultados com as análises *ex vivo* verificou-se que, pela metodologia de DCFH-DA e SOD, a quercitrina foi também o composto antioxidante que exibiu melhor atividade antirradicalar que os demais avaliados.

Na análise *in vitro* das plantas medicinais de uso popular, foi observado um menor teor de compostos fenólicos totais pela metodologia de Folin-Ciocalteu na terramicina, mastruz e guaco, e um maior teor no boldo. Quando comparado com as atividades frente aos radicais DPPH, peroxil e superóxido na concentração de 10

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ verificou-se que as mesmas plantas que apresentaram uma menor quantificação foram as mesmas que apresentaram uma menor atividade antirradicalar por estas metodologias, enquanto que o boldo foi a planta a apresentar uma maior atividade antioxidante pelo método de DPPH e peroxil.

Na avaliação da permeabilidade celular *ex vivo* pode-se observar que o ácido cafeico foi o único antioxidante analisado capaz de atravessar a membrana lipídica. Das plantas avaliadas, somente extratos de louro e arnica, contendo quercitrina como marcador analítico, foram capazes de permear a membrana. Apesar de a quercitrina estar presente nessas amostras, seu efeito isolado não foi satisfatório na permeação celular. Porém em sinergismo com outros compostos, seu efeito foi potencializado.

A quercitrina, apesar de não ter permeado a membrana celular, apresentou atividade antirradicalar, estimulando a SOD e reduzindo a produção de compostos oxidantes na célula pelo DCFH-DA. Isso pode ser explicado pelo rompimento da membrana celular no ensaio *ex vivo*, mostrando que a atividade dos compostos antioxidantes pode se dar, também, na região extracelular, como por exemplo, a ação da penicilina que ocorre na parede celular inibindo sua biossíntese.

Além disso, esses estudos mostram que dentre os métodos *in vitro* estudados, aqueles que empregam os radicais HO^\bullet e O_2^\bullet são os que mais espelham o comportamento antirradicalar dos compostos estudados, onde a quercitrina aparece no grupo de maior ação (ao lado da crisina). Esses resultados também mostram que, em termos de ação antirradicalar direta de compostos fenólicos, nem todos os compostos fenólicos deverão cumprir um papel significativo. Entretanto, esses compostos podem estar envolvidos em processos indiretos em nível fisiológico ou também protegendo um antioxidante fundamental nos processos envolvendo reações com radicais livres, como observado no estudo comparativo da ação contra radicais HO^\bullet no extrato vegetal para quercitrina, catequina, quercetina e sua cinética de reação isolada.

Além da ação direta de um antioxidante frente a um radical altamente reativo (como HO^\bullet) *in vitro* e em nível celular, a capacidade de um antioxidante em atravessar membranas lipídicas também deve ser levada em consideração para a

sua ação global. Ou seja, não necessariamente uma espécie radicalar com uma cinética de reação favorável à manutenção de um equilíbrio redox em sistemas fisiológicos terá uma ação efetiva em nível celular.

Esse fato pode estar associado ainda à sua permeabilidade através de membranas, uma vez que sua ação depende de seu transporte e absorção no organismo. Com o objetivo de investigar essa via de ação dos antioxidantes avaliados, estudos de permeabilidade celular *in vitro* foram realizados com o mesmo grupo de antioxidantes estudados comparativamente para ação antirradicalar *in vitro* e *ex vivo*.

Da mesma forma, os extratos de plantas foram avaliados a partir de seus marcador analíticos quercitrina, catequina e quercetina frente ao radical HO[•]. Com base nestes estudos, observou-se que extratos de plantas contendo quercitrina como antioxidante apresentam atividade antirradicalar potencializada em alguns extratos.

Além de sua cinética lenta de reação frente ao radical HO[•] (representativo de alta ação antioxidante), a quercitrina apresentou ação protetora contra radicais livres em nível celular (células de córtex). Somada à alta ação antirradicalar *in vitro* e em nível celular (*ex vivo*), a quercitrina também apresentou capacidade de permeação em biomembranas. Essas respostas, quando somadas, podem credenciar a quercitrina com um dos antioxidantes da classe dos polifenóis de maior relevância em nível fisiológico, uma vez que a ação efetiva de um antioxidante deve estar associada a essa combinação de fatores.

6 CONCLUSÕES

- O método cromatográfico (HPLC-DAD) baseado na separação por gradiente, empregando acetonitrila e ácido fosfórico (0,1%), desenvolvido para determinação dos antioxidantes nas plantas medicinais em estudo, mostrou-se satisfatório e pioneiro na análise dos 13 compostos antioxidantes avaliados, mostrando alta detectabilidade, precisão e exatidão, bem como um baixo limite de quantificação.

- O método eletroforético baseado na separação por zona (CZE-DAD) com tetraborato de potássio a $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ com pH 9,2, acrescido de uma concentração final de metanol de 10% (v/v) e potencial de separação de 20 kV, otimizado para determinação dos antioxidantes naturais, também mostrou-se eficaz na determinação dos compostos presentes nas amostras.

- Os métodos *in vitro* baseados na geração de diferentes radicais livres e avaliados neste estudo, permitiram a classificação dos antioxidantes isolados e naturais, quanto a sua atividade antirradicalar, mostrando que entre os antioxidantes isolados, a quercitrina foi o composto antioxidante que apresentou uma melhor atividade antirradicalar em relação aos outros compostos analisados, enquanto que a crisina, flavona e resveratrol apresentaram uma menor ação antioxidante.

- Nas análises *ex vivo* (SOD, CAT e DCFH-DA), a quercitrina foi também o composto antioxidante que exibiu melhor atividade antirradicalar em relação aos demais avaliados.

- O louro e arnica, com marcador analítico quercitrina presente em sua matriz, foram capazes de permear a membrana celular possivelmente por uma ação sinérgica entre os compostos presentes nessas amostras, já que isolado, esse marcador analítico, não permeou a membrana celular.

- Os resultados obtidos neste trabalho são pioneiros e inéditos e serão de grande importância para estudos fisiológicos *in vivo*, bem como para estudos farmacológicos com substâncias antioxidantes (naturais e isoladas) para atuarem como candidatos a fármacos com elevada ação antirradicalar.

- Pesquisas complementares são necessárias para compreender plenamente as ações sinérgicas e antagônicas dos compostos presentes na matriz de plantas empregadas na medicina alternativa.
- Estudos comparativos envolvendo a ação antirradicalar de espécies antioxidantes associada à sua atividade em nível celular e permeação em biomembranas podem se caracterizar como um valioso protocolo integrado para a avaliação da bioatividade de extratos de plantas com fins terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, S. B. E. V. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. v.20, p.331-342, 1996.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.

ALARCON, T. Fitoterápicos são alternativa de tratamento no SUS. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/sus-oferece-fitoterapi-cos-como-alternativa-de-tratamento.html>. Acesso em 03 de set 2013

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2115 – 2123, 2009.

ANTOLOVICH, M., et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**. v.127, n.1, p.183-198, 2002.

ATANASSOVA, M.; GEORGIEVA, S.; IVANCHEVA, K.. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal

herbs. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**. v.46, n.1, p.81-88, 2011.

BALK, R. S. et al. Clomipramine Treatment and Repeated Restraint Stress Alter Parameters of Oxidative Stress in Brain Regions of Male Rats. **Neurochemical Research**, v.35, n11, p.1761-1770, 2010.

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

BIMAKR, M., et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. **Food and Bioproducts Processing**. v.89, n.1, p.67-72, 2011.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v.30, n.6, p.609-615, 1997.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução RE nº 899 de 29/05/2003**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos/Ministério da Saúde**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006

BRUM, T. F. et al. HPLC Analysis of Phenolics Compounds and Antioxidant Capacity of Leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8342-8357, 2013.

CALEGARI L.; GORENSTEIN C.; GENTIL V. Effect of chronic treatment with clomipramine on food intake, macronutrient selection and body weight gain in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. n.8, v.30, p.1541-1546, 2007.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, L. M. et. al. 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, n.7, p.1123-1131, 2013

CASTRO, M.D L.; GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**. v.369, n.1–2, p.1-10, 1998.

CHEN, X. et al. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.7, p.1511-1520, 2008.

CUYCKENS F. et al. Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.36, n.11, p.1203-1210, 2001.

DENISOV, E. T. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor ; Francis Group, 2005. 981p.

ERLEJMAN A.G. et al. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. **Free Radical Research**, v.38, n.12 , p.1311-1320, 2004.

ELY D.R.; DAPPER V.; MARASCA J. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiology & Behavior**, n.3, v.61, p.395–398, 1997.

FABRE N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanones aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.12, n.6, p.707–715, 2001.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.1, p.69-75, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.

FRANCISCO, M. L.; RESURRECCION, A.V.A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, v.117, n.2, p.356-363, 2009.

GUO, H. et al. Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.21, n.5, p.715–729, 2007,

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 4th ed. Oxford University Press, New York, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology: Therapeutics**. v. 96, p. 67–202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HERNÁNDEZ, I. et al. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p.125-132, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.1841, n.53, p.1841-1856, 2005.

HUO, L., et al. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *Jasminum nervosum* Lour. **Grasas y Aceites**, v.62, n.2, p.149-154, 2011.

JANOVIK, V. et al. HPLC/DAD Analysis, Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity from the Leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. **Research Journal of Phytochemistry**. v.5, n.4, p.209-215, 2011.

LIMA, F. O. **Estudo fotoquímico da ação anti-radicalar de compostos polifenólicos empregando espectrofotometria e HPLC-UV**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

LIN, L.; TANG, C.. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**. v.101, n.1, 2007, p.140–147, 2007

MA, X.H. et al. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. **Drug Discovery Today**, v.14, n.11–12, p.579-588, 2009.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**. v.40, n.3, p.255-260, 2005.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L. et al. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.851–857, 2009.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, p.3170–3175, 1972.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. S. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**. v.1073, n.1–2, p.201-227, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**. v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. v.1054, n.1–2, r 2004, p.95-111, 2004

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n. 3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. S. de. Interação medicamentosa: parte II. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 97-110, 1986.

ONG, K. C.; KHOO, H. Biological effects of myricetin. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.29, n.2, p.121-126, 1997.

PÉREZ-MAGARIÑO S. et al. Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v.847, n.1–2, p.75–81, 1999.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v.63, p.1035–1042, 2000.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology ; Medicine**. v.26, n.9-10, p.1231–1237, 1999.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. v.21, n.3, p.133-149, 2005.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**. n.84, p.705–712, 2009

ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals**. Wiley - Blackwell Publishing, 2010. 367p.

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

SENGUPTA, B.; BANERJEE, A.; SENGUPTA, P. K. Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: Insights from fluorescence spectroscopic studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.80, n.2, p.79-86, 2005.

SERRA H. et al. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. **Bioorganic ; Medicinal Chemistry**, v.16, n.7, p.4009-4018, 2008.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição, ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOUSA, C. M. M., et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. n.2, v.30, p.351-55, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science**. n.18, v.30, p.3268-3295, 2007.

TAKANASHI, T. et al. Fluorophotometric quantitation of oxidative stress in the retina in vivo. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 38, p. 2721 – 2728, 1997.

VALKO et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry ; Cell Biology**. v.39, p.44–84, 2007.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v.1032, n.1–2, p.273-279, 2004.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.59, p.113-122, 2004.

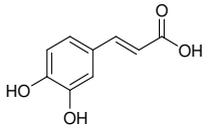
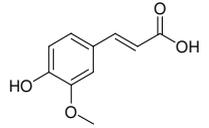
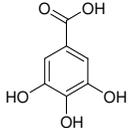
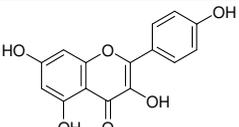
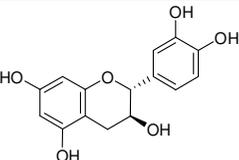
ZADRA, Marina et al. Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the Leaves of Solanum guaraniticum A. St.-Hil. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12560-12574, 2012.

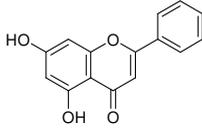
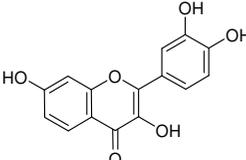
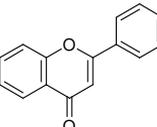
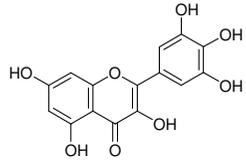
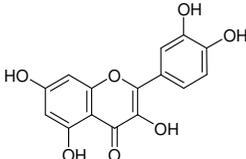
ZHAO, H. et al. Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.19, p.7277–7286, 2006.

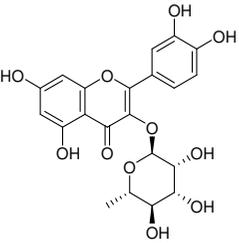
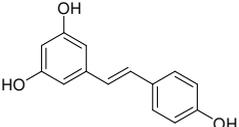
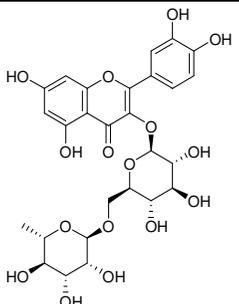
ANEXOS

ANEXO A – Características químicas e físicas dos compostos fenólicos estudados

Tabela 26 – Características químicas e físicas dos compostos fenólicos estudados.

Antioxidante	Classificação	Nomenclatura (IUPAC)	Massa molecular (g·mol ⁻¹)	Fórmula molecular ^E <small>erro! Indicador não definido.</small>	pKa (a 25°C)	Fórmula estrutural
Ácido cafeico	Ácido hidroxicinâmico	(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	180,15742	C ₉ H ₈ O ₄	4,58±0,10	
Ácido ferúlico	Ácido hidroxicinâmico	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	194,184	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	4,58±0,10	
Ácido gálico	Ácido hidroxibenzóico	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	170,11954	C ₇ H ₆ O ₅	4,33±0,10	
Canferol	Flavonol	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	286,2363	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6,34±0,40	
Catequina	Catequina	(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	290,26806	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	9,54±0,10	

Antioxidante	Classificação	Nomenclatura (IUPAC)	Massa molecular (g·mol ⁻¹)	Fórmula molecular ^E <small>erro! Indicador não definido.</small>	pKa (a 25°C)	Fórmula estrutural
Crisina	Flavona	5,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one	254,2375	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	6,50±0,40	
Fisetina	Flavonol	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxychromen-4-one	286,2363	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6,83±0,40	
Flavona	Flavona	2-phenylchromen-4-one	222,2387	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	—	
Miricetina	Flavonol	3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one	318,2351	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	6,30±0,40	
Quercetina	Flavonol	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	302,2357	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	6,31±0,40	

Antioxidante	Classificação	Nomenclatura (IUPAC)	Massa molecular (g·mol ⁻¹)	Fórmula molecular ^E <small>erro! Indicador não definido.</small>	pKa (a 25°C)	Fórmula estrutural
Quercitrina	Flavonol	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-((2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxychromen-4-one	448,3769	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6,17±0,40	
Resveratrol	Diarilieteno	5-((E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl)benzene-1,3-diol	228,24328	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	9,22±0,10	
Rutina	Flavonol	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-((2S,3R,4S,5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxymethyl)oxan-2-yl)oxychromen-4-one	610,5175	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	6,17±0,40	

Fontes: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION: database. PubChem. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

Calculado utilizando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V. 11.02 (© 1994-2011 ACD/Labs).