



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU  
INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Érica Abadia da Costa

**Desenvolvimento de um método de análise de catequina e quercetina  
em extratos de espécies vegetais e fitoterápicos**

UBERLÂNDIA – MG

DEZEMBRO DE 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU  
INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Érica Abadia da Costa

**Desenvolvimento de um método de análise de catequina e quercetina  
em extratos de espécies vegetais e fitoterápicos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharelado em Química.

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Orientação:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Maria Ferreira de Sousa

UBERLÂNDIA – MG

DEZEMBRO DE 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-UFU  
INSTITUTO DE QUÍMICA-IQ  
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

Érica Abadia da Costa

**Desenvolvimento de um método de análise de catequina e quercetina  
em extratos de espécies vegetais e fitoterápicos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito do Curso de Química  
Industrial da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharelado em Química.

**Área de concentração:** Química Orgânica

Uberlândia, Minas Gerais, 13 de Dezembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Raquel Maria Ferreira de Sousa  
(Orientador- UFU)

---

Prof. Dr. Alex Domingues Batista  
(Examinador- UFU)

---

Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes  
(Examinador- UFU)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que no meio de tantas dificuldades nunca desamparou na caminhada.

Aos meus pais José Carlos e Cleide Ana, minha irmã Élide e a todos da minha família que me apoiaram, obrigada por ser a melhor família do mundo, me dando amor e carinho incondicional. Além disso, nunca mediram esforços para que esse sonho se concretizasse.

Agradeço imensamente minha amiga Sheila por toda ajuda no laboratório durante esses 3 anos e também durante a graduação.

Ademais, aos meus amigos Douglas Mendes e a Fernanda Soler por sempre me incentivarem a continuar nos momentos em que eu estava desanimada e sempre fazendo meus dias mais felizes durante a graduação. Tenho um carinho e uma admiração muito grande por vocês.

À QuímEJ- Empresa Júnior de Soluções em Química e ao Movimento Empresa Júnior que me proporcionaram muito crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da QuímEJ que estiveram comigo em momentos importantes da minha vida e que juntos conseguimos deixar um belo legado aos alunos do curso.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Maria Ferreira de Sousa pela orientação, carinho e paciência durante todo o projeto, nunca medindo esforços para me auxiliar nas atividades de pesquisa, além disso, grande parte das técnicas laboratoriais que aprendi nesses últimos anos devo a ela, uma orientadora maravilhosa e que sempre terá meu respeito e admiração pela pessoa, professora e pesquisadora que é.

A todos os pesquisadores e amigos do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPEN) que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À FAPEMIG pela bolsa concedida e pelo apoio aos projetos relacionados (APQ-02342-18) a esse trabalho.

E por fim, à UFU e ao Instituto de Química que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”***

*Charles Chapin*

## RESUMO

Os metabólitos secundários de espécies vegetais não somente apresentam um papel importante na adaptação das plantas aos seus ecossistemas, como principalmente representam uma fonte de substâncias farmacologicamente ativas. Dentre esses metabólitos se podem destacar os flavonóides e taninos condensados (proantocianidinas), por possuírem características antioxidantes e biológicas (como anti-inflamatória, antidiabética). Com o intuito de se beneficiar das atividades demonstradas por essa classe de compostos, diversos fitoterápicos de extratos de plantas têm sido desenvolvidos. Mas se sabe que um grande desafio dessa classe de medicamentos é o monitoramento do princípio ativo, com a finalidade de se estabelecer uma normalização da qualidade do fitoterápico. A similaridade estrutural entre as classes de flavonóides torna a distinção entre eles muito difícil se não forem utilizadas técnicas como espectrometria de massas, cromatografias e ressonância magnética nuclear, mas que não são de fácil acesso devido ao seu elevado custo. Neste contexto, se torna interessante o desenvolvimento de técnicas de análise, mais rápidas e baratas, que sejam possíveis de serem utilizadas no monitoramento adequado dos metabólicos de interesse do fitoterápico. Neste projeto, portanto, utilizou-se uma técnica eletroanalítica para analisar a presença e o teor de flavanol e proantocianidinas em extratos vegetais e fitoterápicos comerciais através de complexos metálicos. Verificou-se que os potenciais dos flavonóides não complexados, por possuírem potenciais de oxidação próximos não é possível diferenciá-los por esta técnica. Entretanto, quando complexados, observa-se que o potencial de 1064,3 mV da catequina se diferencia dos demais complexos. Este resultado é muito promissor, pois foi possível diferenciar a catequina dos demais flavonóides através da estratégia de complexação utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial.

**PALAVRAS CHAVE:** Voltametria de pulso diferencial, antioxidantes, flavonóides, proantocianidinas.

## ABSTRACT

The secondary metabolites of plant species not only play an important role in the adaptation of plants to their ecosystems, but mainly represent a source of pharmacologically active substances. Among these metabolites are the flavonoids and condensed tannins (proanthocyanidins), because they have antioxidant and biological characteristics (such as antiinflammatory, antidiabetic). In order to benefit from the activities demonstrated by this class of compounds, several herbal extracts of plants have been developed. But it is known that a major challenge of this class of drugs is the monitoring of the active principle, in order to establish a normalization of the quality of the herbal medicine. The structural similarity between the classes of flavonoids makes the distinction between them very difficult if techniques such as mass spectrometry and nuclear magnetic resonance are not used but are not easily accessible because of their high cost. In this context, the development of faster and cheaper analytical techniques that are possible to be used in the proper monitoring of metabolites of phytotherapeutic interest is interesting. In this project, therefore, an electroanalytical technique was used to analyze the presence and content of flavanol and proanthocyanidins in commercial plant extracts and phytotherapies through metallic complexes. It was verified that the potentials of the non-complexed flavonoids, because they have near oxidation potentials, it is not possible to differentiate them by this technique. However, when complexed, it is observed that the 1064.3 mV potential of the catechin differs from the other complexes. This result is very promising because it was possible to differentiate the catechin from the other flavonoids through the complexation strategy using the differential pulse voltammetry technique.

**KEY WORDS:** Differential pulse voltammetry, antioxidants, flavonoids, proanthocyanidins.

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1-</b> Estrutura básica de flavonóides-----	15
<b>Figura 2-</b> Estruturas de algumas classes de flavonóides -----	15
<b>Figura 3-</b> Estruturas químicas dos flavonoides: (a) quercetina, (b) rutina e (c) catequina -----	16
<b>Figura 4-</b> (a) Esquema representativo dos possíveis locais de quelação na quercetina, (b) Estruturas comuns da subclasse de flavona e a divisão de bandas I e II relacionados aos espectros de absorção UV-Vis -----	17
<b>Figura 5-</b> Vias metabólicas de síntese dos compostos fenólicos -----	18
<b>Figura 6-</b> Reação de oxidação da quercetina e da epi/catequina-----	21
<b>Figura 7-</b> Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial -----	22
<b>Figura 8-</b> Representação frontal e superior da célula eletroquímica utilizada. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) solução eletrolítica; d) barra de agitação magnética; e) eletrodo de trabalho; f) eletrodo de referência; g) eletrodo auxiliar; h) orifícios para fixação dos eletrodos; i) abertura para inserção da amostra-----	27
<b>Figura 9-</b> Espectro UV-Vis da Quercetina e do complexo Quercetina-AlCl <sub>3</sub> -----	32
<b>Figura 10-</b> Espectro UV-Vis da Catequina e do complexo Catequina-AlCl <sub>3</sub> -----	33
<b>Figura 11-</b> espectro UV-Vis da Rutina e do complexo Rutina-AlCl <sub>3</sub> -----	33
<b>Figura 12-</b> Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para catequina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha) -----	34
<b>Figura 13-</b> Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para quercetina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha)-----	35
<b>Figura 14-</b> Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para rutina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha) -----	35
<b>Figura 15-</b> Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para catequina-quercetina-rutina não-complexadas (linha azul) e complexadas (linha vermelha) -----	37
<b>Figura 16-</b> Voltamogramas da catequina em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> -----	38
<b>Figura 17-</b> Curva de calibração da catequina -----	38
<b>Figura 18-</b> Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do Chá verde, em meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).-----	43
<b>Figura 19-</b> Voltamogramas do Chá verde utilizando eletrólito de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> -----	44
<b>Figura 20-</b> Curva de calibração Chá verde -----	44
<b>Figura 21-</b> Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do Ginkgo biloba, em meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha). -----	45
<b>Figura 22-</b> Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> -----	46
<b>Figura 23-</b> Curva de calibração Ginkgo- biloba-----	46
<b>Figura 24-</b> Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato de tintura de Calêndula officinalis meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha). -----	47
<b>Figura 25-</b> Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> -----	48
<b>Figura 26-</b> Curva de Calibração tintura de Calêndula officinalis-----	49
<b>Figura 27-</b> Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do fitoterápico de quercetina não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).-----	49
<b>Figura 28-</b> Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> -----	50
<b>Figura 29-</b> Curva de calibração do fitoterápico de quercetina -----	51

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1- Voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico -----</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 2- Tabela comparativa de outras técnicas para determinação de flavonóides com a voltametria de pulso diferencial -----</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3- Teor de equivalente de catequina em E. Calycina e Sangra d'água-----</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 4- Valores de concentração de equivalente de quercetina obtidos da análise dos fitoterápicos --</i>	<i>51</i>

## LISTA DE ABREVIATÖES

CE - Eletroforese Capilar

EC - Equivalente de catequina

FIA - Análise por Injeção em Fluxo

HHDP - hexaidroxidifenóis

HPLC-PDA - Cromatografia Líquida de Alta Resolução- Detector Arranjo de Diodos

HPLC-PDA-FL - Cromatografia Líquida de Alta Resolução- Detector Arranjo de Diodos- Fluorescência

HPLC-PDA-LQT-MS - Cromatografia Líquida de Alta Resolução- Detector Arranjo de Diodos- Armadilha de íon quadrupolo- Espectrômetro de massas

IUPAC - International Union for Pure and Applied Chemistry

IQUFU - Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

NuPPeN - Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

NP - Difenilboriloxietilamina

R<sub>f</sub> - Fator de Retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

UV - Ultravioleta

VC - Voltametria Cíclica

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>14</b>
2.1	Flavonóides e antioxidantes	14
2.2	Mecanismo de biossíntese	17
<b>2.3</b>	<b>Métodos de determinação de compostos polifenólicos</b>	<b>18</b>
2.4	Voltametria de Pulso Diferencial	21
<b>2.5</b>	<b>Fitoterápicos</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Instrumentação</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Reagentes e soluções</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Procedimento experimental</b>	<b>26</b>
4.3.1	Preparação das soluções	26
4.3.2	Preparação dos complexos metálicos	26
4.3.3	Caracterização	26
4.3.3.1	Espectrometria UV-Vis	26
4.3.3.2	Medidas eletroquímicas	26
4.3.4	Curva de calibração- Método de adição de padrão	27
4.3.4.1	Preparo de soluções	27
4.3.4.2	Reações de complexação	28
4.3.4.3	Medidas eletroquímicas	28
4.3.5	Determinação do Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)	28
4.3.6	Análise dos extratos das espécies <i>E. Calycina</i> e <i>Sangra d'água</i>	29
4.3.7	Análise dos Fitoterápicos	29
4.3.7.1	Preparo da amostra	29
4.3.7.2	Análise do comportamento voltamétrico	29
4.3.7.3	Análise do teor de catequina no extrato de Chá verde	30
4.3.7.4	Análise do teor de quercetina nos extratos de <i>Ginkgo biloba</i> , Quercetina e tintura de <i>Calêndula officinalis</i>	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Espectrometria UV-Vis</b>	<b>31</b>
5.2	Voltametria de pulso diferencial em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,5 mol L <sup>-1</sup> )	34
5.3	Curva de calibração da catequina- Método de adição de padrão	37

5.4	Comparação de outras técnicas com a voltametria de pulso diferencial -----	39
5.5	Análise do teor de catequina em extrato da espécie E. Calycina e Sangra d'água	42
<b>5.6</b>	<b>Análise dos fitoterápicos -----</b>	<b>42</b>
5.6.1	Análise do comportamento voltamétrico do Chá verde -----	42
5.6.1.1	Análise do teor de catequina no extrato de Chá verde -----	43
5.6.2	Análise do comportamento voltamétrico do Ginkgo biloba -----	45
5.6.2.1	Análise do teor de quercetina no extrato Ginkgo biloba -----	46
5.6.3	Análise do comportamento voltamétrico de tintura de Calêndula officinalis -----	47
5.6.3.1	Análise do teor de quercetina na tintura de Calêndula officinalis -----	48
5.6.4	Análise do comportamento voltamétrico do fitoterápico de quercetina -----	49
5.6.4.1	Análise do teor de quercetina no fitoterápico de quercetina -----	50
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS -----</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura popular voltada ao uso de plantas medicinais, desperta, o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento. As observações populares sobre o uso e a eficiência de plantas medicinais contribuem de forma significativa para a realização de estudos científicos que visam avaliar as virtudes terapêuticas de espécies vegetais, prescritas com frequência, mesmo sem o conhecimento prévio de seus constituintes químicos, pelos efeitos medicinais que produzem (MACIEL et al., 2002).

De acordo, com um estudo realizado sobre as novas drogas lançadas em um período de 30 anos (NEWMAN; CRAGG, 2012), 1981 a 2011, foi verificado que cerca de 60% delas são inspiradas em produtos naturais, sendo que a droga final não é necessariamente o composto químico isolado do produto natural, mas pode ser um derivado de produto natural semi-sintético, ou totalmente sintético, mas o seu farmacóforo é baseado em um produto natural, ou o desenvolvimento de algum composto de origem natural.

Os componentes químicos dos produtos naturais são oriundos do metabolismo secundário das plantas e de mutações aleatórias das rotas do metabolismo primário que foram herdadas. Os metabólitos secundários são exclusivos dos vegetais e são produzidos em resposta à interação com outros organismos ou ambiente (KUTCHAN, 1993; WINK, 2003).

Vários estudos demonstraram que as plantas medicinais são uma fonte rica de compostos antioxidantes como fenólicos, flavonóides, quinonas, vitaminas, cumarinas e alcalóides, o que pode diminuir a incidência de estresse oxidativo e doenças associadas (ZHANG et al., 2011). A literatura sugere fortemente que os polifenóis vegetais (especialmente fenólicos e flavonóides) inibem o processo inflamatório regulando a produção de moléculas pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2011). Diante disso, considera-se que compostos fenólicos são componentes desejáveis na alimentação humana por apresentarem atividade antioxidante (KANG et al., 2016).

Os alimentos fornecem não somente nutrientes essenciais para a vida, mas também compostos bioativos que de acordo com EMBRAPA (2018) são moléculas orgânicas de baixa massa molecular que apresentam uma ampla diversidade química e efeitos diversos sobre organismos vivos, sendo associadas às mudanças em seu comportamento, fisiologia ou metabolismo, promovendo benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis. Esse efeito protetor

tem sido atribuído, em grande parte, as propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas C, A e E, e de compostos fenólicos como os flavonóides (GONÇALVES, 2008).

Uma das classes de compostos sintetizadas pelas plantas no metabolismo secundário são os compostos fenólicos. Dentre ela se destaca os flavonóides, que são um dos grupos mais importantes sintetizados nas plantas, onde são amplamente distribuídos nos vegetais e, quando ingerido pelo homem através de frutas e legumes, exibem uma gama de efeitos biológicos, incluindo ações antibacterianas, antiinflamatórias, antialérgicas, antitrombóticas e para o seu possível papel na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer. A característica mais importante dos flavonóides é a propriedade antioxidante por uma variedade de formas, incluindo a captura direta de espécies reativas de oxigênio, a inibição de enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, quelação de metais de transição envolvidos em processos que formam radicais e prevenção do processo de peroxidação ao reduzir os radicais alcoxilo e peroxilo (SOUSA, 2015).

Isso torna interessante a pesquisa com estes compostos, seja na busca de novas aplicações como também no desenvolvimento de tecnologias mais simples e de menor custo para a detecção desses compostos. Dessa forma, a eletroanalítica pode ser uma ferramenta muito promissora nesta aplicação, já que com um custo muito inferior (equipamentos e reagentes), pode desenvolver técnicas no controle de qualidade desses compostos, para tal basta que a molécula seja eletroativa (SOUSA, 2015). Os flavonóides são moléculas eletroativas, tornando possível a utilização dessa técnica na análise de compostos vegetais (SOUSA, 2015).

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

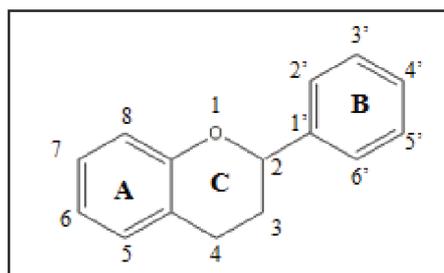
### **2.1 *Flavonóides e antioxidantes***

Os flavonóides é uma classe de compostos fenólicos muito extensa de produtos naturais e que se encontra distribuída no reino vegetal. Numa espécie vegetal, é biossintetizado em todas as partes das plantas (raízes, flores, frutos e galhos) sendo que seu armazenamento ocorre na organela chamada vacúolo das células. Devido à extensa conjugação das ligações simples e duplas, os flavonoides são coloridos, e isso pode estar relacionado com a propriedade de atração de insetos para polinização das plantas (VILA, 2006). Somado a isso, esses compostos se tornam importantes pois apresentam

diversas propriedades farmacológicas como: antioxidante, antiinflamatória, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (SANCHEZ- MORENO 2002).

Os flavonóides apresentam um núcleo flavona (mostrado na Figura 1), contendo 15 átomos de carbono arranjados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, isto é, são dois anéis aromáticos, ligados por três carbonos que podem ou não formar um terceiro anel, como mostrado na Figura 1, ligados a vários substituintes. Os flavonoides ainda podem apresentar unidades de açúcares ligados (glicosídeos) ou não (aglicona). (VILA, 2006).

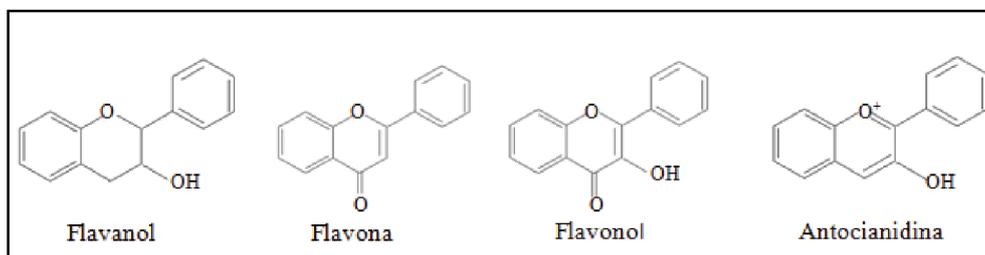
**Figura 1-** Estrutura básica de flavonóides



**Fonte:** Adaptado de MALESEV e KUNTIC (2007).

Os flavonóides podem apresentar diversas modificações que podem ocorrer durante a sua biossíntese: redução ou adição, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo de flavonóides, hidroxilação, dimerização, glicosilação de grupos. Assim, eles podem ser classificados em 10 classes: antocianidinas, leucoantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavanol e isoflavonas. A Figura 2 mostra alguns exemplos (BEECHER, 2000).

**Figura 2-** Estruturas de algumas classes de flavonóides

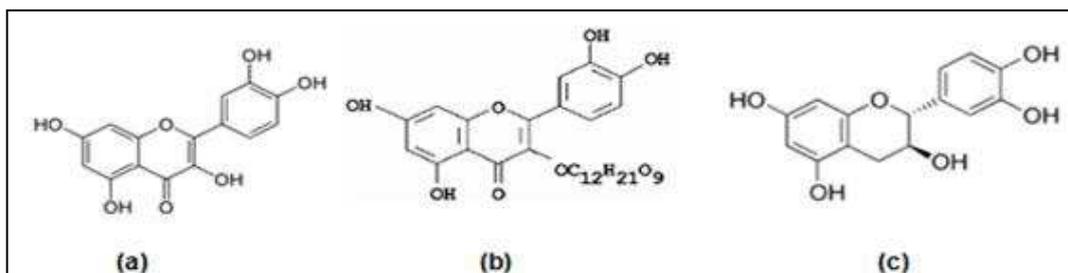


**Fonte:** Adaptada de MARTINEZ-FLORES et al. (2002).

De maneira geral, os flavonóides apresentam propriedades químicas dos fenóis: sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligados à sua estrutura; levemente ácidos e como são compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de

solventes com água; podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio; apresentam absorção no comprimento de onda do ultravioleta exibindo, de maneira geral, duas bandas de absorção, uma banda I (320-385 nm) relacionada às transições eletrônicas do anel B e uma banda II (250-285 nm) relacionada às transições eletrônicas do anel A. Figura 3 apresenta a estrutura de três flavonoides (VILA, 2006).

**Figura 3-** Estruturas químicas dos flavonoides: (a) quercetina, (b) rutina e (c) catequina

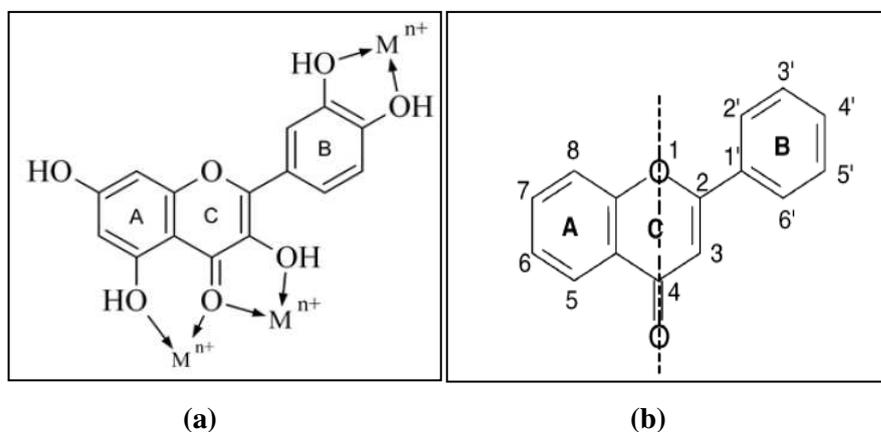


**Fonte:** Adaptado de MALESEV e KUNTIC (2007)

As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol produtos do metabolismo do fenilpropanol muito encontrados no reino vegetal, assim como os flavonóides. As proantocianidinas apresentam também uma rica diversidade de estruturas, diante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (MONTEIR et al., 2005). Comparando-se a estrutura do flavanol (catequina, por exemplo) com as demais classes de flavonóides, verifica-se que essa classe não apresenta a carbonila na posição C4 do anel C, enquanto que nos demais essa carbonila é verificada (Figura 3).

Essa diferença pode ser utilizada para diferenciar flavanol, e por consequência, proantocianidinas, dos demais flavonóides. Isso é possível através da complexação dos flavonóides com metais. Como pode ser visto na Figura 4, existem basicamente três sítios de complexação metálica em flavonóides. A grande diferença é que os flavanóis não apresentam a complexação mostrada com metal e oxigênio ligados a C4 e C3, além do C4 e C5 (MONTEIR et al, 2005).

**Figura 4-** (a) Esquema representativo dos possíveis locais de quelação na quercetina, (b) Estruturas comuns da subclasse de flavona e a divisão de bandas I e II relacionados aos espectros de absorção UV-Vis



Fonte: KASPRZAK, ERXLEBEN, OCHOCKI, (2012).

No trabalho de Souza e De Giovani (2005) foi realizada a análise eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica de complexos metálicos com alguns flavonóides, sendo que todos apresentavam carbonila em C4. Foi verificado que o potencial de oxidação dos flavonóides se tornam menores quando complexados com metais. Esse fenômeno já era esperado já que complexos radiculares apresentam maior atividade antioxidante. O que se pretende avaliar nesse projeto é o comportamento eletroquímico de flavanol (catequina) complexado com metal e, comparar o resultado obtido com o comportamento eletroquímico de outros flavonóides. Espera-se verificar uma diferenciação entre os complexos metálicos de flavanol e demais flavonóides. Em meio ácido, por exemplo, sabe-se que os complexos via C3-C4 ou C4-C5 são mais fortes que em C3'-C4', uma vez que as hidroxilas se encontram protonadas. O inverso já é observado em meios alcalinos (KASPRZAK; ERXLEBEN; OCHOCKI, 2012). A partir do resultado observado para a catequina (flavanol) se espera correlacionar com o comportamento eletroquímico de complexos metálicos de proantocianidas.

## 2.2 Mecanismo de biossíntese

Compostos fenólicos têm sido muito utilizados no tratamento de doenças como câncer e Alzheimer. Tal utilização é proveniente da alta capacidade antioxidante, sendo considerado neutralizador de radicais livres (KARAKAYA, 2004). A atividade antioxidante dos flavonóides é devida a sua habilidade de sequestrar radicais livres, como já mencionados anteriormente, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar



de metais ou proteínas e por métodos colorimétricos, sendo esses últimos mais comuns. Os métodos mais apropriados para determinação de taninos são os ensaios com precipitação de proteínas. Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, muito embora estes métodos sejam amplamente usados para analisar taninos de uma maneira geral, como no caso de taninos hidrolisáveis; eles detectam somente grupos galoi e hexaidroxidifenóis (HHDP). Apesar destas críticas, alguns autores afirmam que não há método ideal e reforçam que os métodos colorimétricos são os mais utilizados para a análise de taninos (MONTEIRO et al., 2005).

O método de Folin-Ciocalteu consiste em quantificar em espectrofotômetro a redução sofrida pelos ácidos fosfomolibídico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e fosfotungístico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) em presença de substâncias fenólicas, este processo de redução faz com que haja uma mudança de coloração da solução de amarelo para azul (AL-MUSAYEIB et al., 2012). É um tipo de ensaio químico, colorimétrico, sua vantagem é que é um teste para todos os fenóis (fenóis totais), apresentando como desvantagem um método quimicamente complexo, em que reage com todos os fenóis (MONTEIRO et al., 2005), sendo assim um método pouco seletivo.

O método vanilina sulfúrica depende da reação da vanilina com os taninos condensados (proantocianidinas) para formação de complexos coloridos. O sucesso deste ensaio depende do tipo do solvente usado, da concentração e natureza do ácido, do tempo da reação, temperatura e concentração da vanilina. O maior problema para o método vanilina é que ela não é só reativa para subunidades de polímeros de taninos, mas é reativa também para vários flavonóides, o que caracteriza a falta de especificidade, para proantocianidinas (MONTEIRO et al., 2015).

O NP (difetilboriloxietilamina) é um tipo de revelador químico utilizado em cromatografia em camada delgada para revelação de substâncias fenólicas, pois reage com estes formando complexos fluorescentes. Este revelador é muito utilizado devido a sua sensibilidade e especificidade. O PEG é geralmente utilizado como intensificador da fluorescência, observada sob luz ultravioleta, na determinação de flavonóides (DOURADO; LADEIRA, 2008), bem como, o cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) também utilizado para quantificação do teor de flavonóides. Nesta análise, o cátion alumínio ( $Al^{3+}$ ) forma complexos estáveis com os mesmos, assim o complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonóide não complexado, assim o

monitoramento dessa complexação é realizada em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda adequado (WOISKY; SALATINO, 1998).

A utilização de técnicas cromatográficas também tem sido muito utilizada pelo fato de serem eficientes na separação de compostos, apresentarem boa resolução, sensibilidade e velocidade de análise, no entanto, o custo de manutenção desses equipamentos torna-se bastante caro, além do tempo de análise que pode variar muito de acordo (CASTRO-LÓPEZ; LÓPEZ-VILARIÑO; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, 2013). Além disso, a literatura mostra que diversas metodologias estão sendo aprimoradas, com o intuito de melhorar a separação de compostos fenólicos, principalmente em extratos complexos.

Ademais, a dificuldade em interpretar alguns cromatogramas de amostras complexas também, torna necessário otimizar o estágio de detectores. Para este fim, diversos detectores já foram utilizados em trabalhos para melhorar a detecção, dentre alguns exemplos, têm-se: fluorescência (FL) para evitar interferências com outros compostos que discriminam entre picos sobrepostos fluorescentes e não fluorescentes; detectores eletroquímicos (ECD), demonstrando ser uma técnica de completação útil para a análise de compostos fenólicos provendo seletividade especial relacionada com as diversidades em substituintes eletroativos ou espectrômetros de massa (MS) frequentemente utilizados para obter informações estruturais após separação cromatográfica (CASTRO-LÓPEZ; LÓPEZ-VILARIÑO; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, 2013).

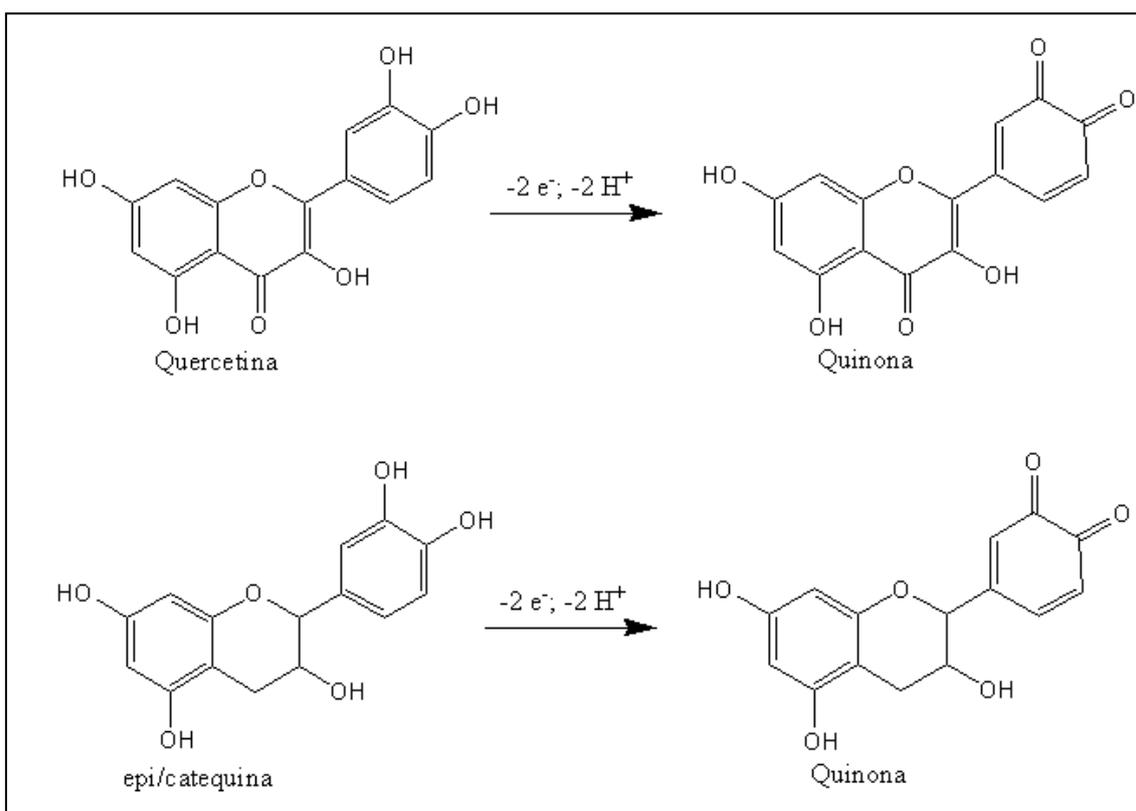
Os sistemas de detecção eletroquímica têm um lugar importante no campo da análise de compostos fenólicos porque são de baixo custo, sensíveis, seletivos, reproduzíveis e permitem uma rápida análise da amostra, diante disso, é possível determinar e quantificar os compostos fenólicos em matrizes biológicas altamente complexas (JIRI et al., 2013).

Ademais, as técnicas eletroquímicas estão sendo desenvolvidas e melhoradas para determinação dos compostos fenólicos, principalmente usando técnicas como voltametria cíclica e de pulso diferencial. Análises eletroanalíticas são vantajosas nesse sentido, uma vez que as propriedades antioxidantes desses compostos, relacionados à sua capacidade de doar elétrons, permitem a detecção de polifenóis com base na oxidação eletroquímica, em que essa é realizada em potenciais baixos (JIRI et al., 2013).

## 2.4 Voltametria de Pulso Diferencial

As técnicas eletroanalíticas fornecem informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias, como processos de oxidação e redução em vários meios, adsorção de um composto em superfícies e até mesmo mecanismo de transferência de elétrons, sendo possível realizar a quantificação de espécies de alta sensibilidade (SKOOG; NIEMAN, 1998). A Figura 6 apresenta a reação de oxidação da quercetina e da epi/catequina com formação da quinona correspondente.

**Figura 6-** Reação de oxidação da quercetina e da epi/catequina



**Fonte:** Adaptado de SOUSA, 2015.

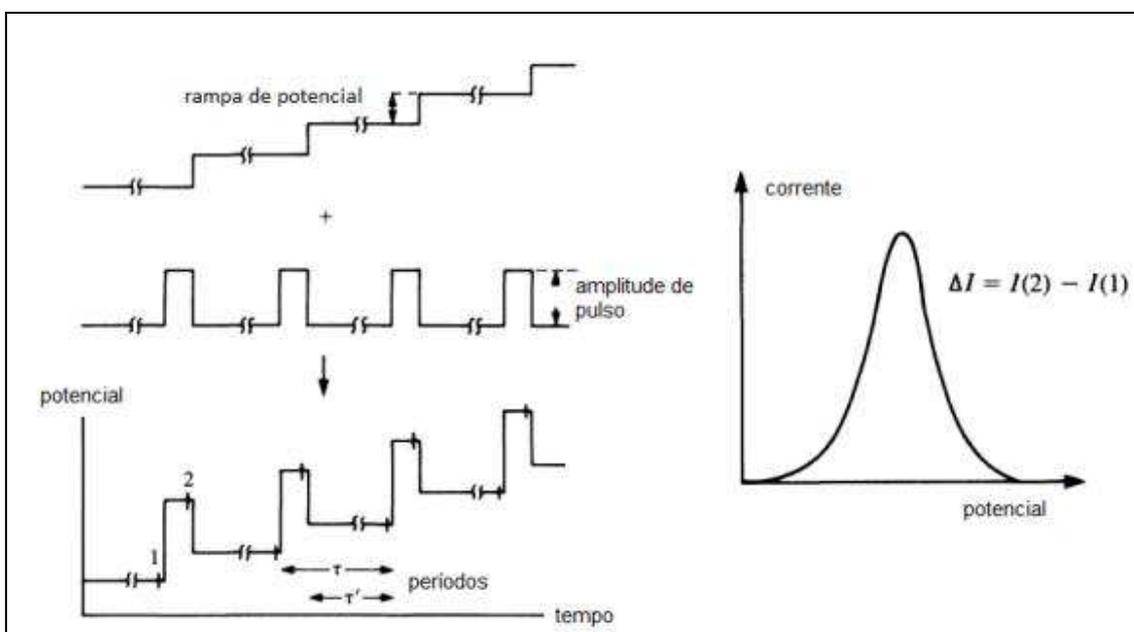
A determinação de um analito por qualquer técnica eletroquímica depende que ele seja eletroativo em um determinado potencial aplicado. O seja, a aplicação de um potencial promove a transferência de elétrons, termodinamicamente ou cineticamente favorável, criando-se um fluxo de elétrons e resultado na oxidação ou redução do composto (PACHECO et al., 2013).

O potencial é aplicado através de um eletrodo chamado eletrodo de trabalho. Esse potencial que possibilitará que a molécula seja oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. A aplicação de um potencial mais negativo resulta no eletrodo se tornar

uma fonte de elétrons, fato este que favorecerá o processo de redução. No caso contrário, aplicação de um potencial mais positivo, favorecerá o processo de oxidação. Sendo assim, uma varredura de potencial no sentido negativo é chamada de varredura catódica, enquanto que no sentido oposto é denominada de varredura anódica. A corrente elétrica resultante do processo de oxidação e redução é proporcional à quantidade de moléculas que reagem. (PACHECO et al., 2013).

Na voltametria, o parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i), ou seja,  $i = f(E)$ . O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma (PACHECO et al., 2013). A Figura 7 mostra os sinais obtidos por voltametria de pulso diferencial.

**Figura 7-** Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial



**Fonte:** PACHECO, ALMEIDA e RITTA (2013)

Nesta figura observa-se que a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. Subtrai-se a primeira da segunda, e essa diferença é plotada *versus* o potencial aplicado, o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico é diretamente proporcional à concentração do analito. Essa subtração das correntes é necessária para que se faça a correção da corrente capacitiva. A corrente capacitiva não está envolvida com o processo de oxiredução, sendo gerada devido a um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, por isso é necessário que seja eliminada. Já a corrente envolvida no processo

de oxiredução é denominada de faradaica, uma vez que obedece a Lei de Faraday, e é proporcional à concentração da molécula envolvida no processo. Esta correção de correntes possibilita que a técnica de pulso diferencial obtenha limites de detecção da ordem de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (PACHECO et al., 2013).

Diante disso, as técnicas eletroanalíticas surgem como uma alternativa para a determinação de fármacos, pois além de simples, de baixo custo e serem análises que possuem grande sensibilidade, seletividade e baixos limites de detecção, elas oferecem a possibilidade de se determinar a concentração do composto de interesse diretamente da amostra, sem pré-tratamentos ou separações prévias (SKOOG; NIEMAN., 1998).

## ***2.5 Fitoterápicos***

Os fitoterápicos pertencem a uma classe de medicamentos que utilizam como princípio ativo apenas extrato de espécie vegetal (ANVISA, 2016). Uma grande vantagem dos fitoterápicos é o seu custo e tempo de desenvolvimento serem bastante inferiores quando comparados aos medicamentos sintéticos. Estima-se que o desenvolvimento de um fitoterápico leva em torno de cinco anos enquanto que medicamentos sintéticos necessitam de pelo menos dez anos de desenvolvimento. Somado a isto, enquanto o custo de um fitoterápico está em torno de 3.000.000 a 7.000.000 de dólares, os medicamentos sintéticos custam em torno de 250.000.000 a 880.000.000 de dólares (CALIXTO, 2005, RODRIGUES, 2005).

Entretanto os fitoterápicos ainda precisam de desenvolvimento tecnológico, principalmente quando se trata de controle de qualidade. Geralmente eles são uma mistura complexa de compostos, em que não há uma molécula como princípio ativo, mas, o conjunto de moléculas de determinada classe de compostos é que se mostra responsável pela profilaxia. Assim, o desenvolvimento de tecnologia no controle do teor dos compostos ativos se faz necessário para que, assim como os medicamentos sintéticos, exista a padronização dos fitoterápicos. Sabe-se que fatores como: local de plantio, temperatura, tipo de coleta e processamento; interferem na composição de drogas vegetais (KLEIN et al., 2009). Os métodos cromatográficos são eficientes na quantificação de princípios ativos, entretanto são de custo elevado. O desenvolvimento de técnicas que permitam a quantificação através de um custo menor é de extrema importância para tornar mais seguro o mercado de fitoterápicos.

Entre 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou: o crescimento foi de 161%, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

Há três anos, cerca de 6 mil pessoas procuraram alguma farmácia de atenção básica para receber os insumos. No ano de 2015, essa procura passou para quase 16 mil. Cerca de 3.250 estabelecimentos de 930 municípios brasileiros oferecem os produtos. Atualmente, o SUS oferta doze medicamentos fitoterápicos. Eles são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite (BRASIL, 2017).

Os fitoterápicos mais utilizados na rede pública são o guaco, a espinheira-santa e a isoflavona-de-soja, indicados como coadjuvantes no tratamento de problemas respiratórios, gastrite e úlcera e sintomas do climatério, respectivamente (BRASIL, 2017). Alguns fitoterápicos, como por exemplo, o Chá verde, *Ginkgo biloba*, Quercetina e a tintura de *Calêndula officinalis* apresentam diversos flavonóides como princípio ativo. Embora existam diversas técnicas de análises desses compostos (método de precipitação com metais e proteínas, métodos colorimétricos: Folin-Ciocalteu, vanilina sulfúrica, dentre outros), elas apresentam baixa especificidade por detectarem concomitantemente ou taninos hidrolisáveis ou outros flavonóides ou outros compostos fenólicos, resultando em um valor que, muitas vezes se encontra acima do realmente apresentado pela amostra (MONTEIRO et al., 2005).

Todos esses produtos são testados para verificação da eficácia e dos riscos de seu uso e também para garantir a qualidade do insumo. Cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e às Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estaduais o controle desses medicamentos (BRASIL, 2017).

### **3 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo geral utilizar uma técnica eletroanalítica denominada voltametria de pulso diferencial para analisar a presença e o teor de flavanol e proantocianidina em extratos vegetais e fitoterápicos comerciais através de complexos metálicos.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Desenvolvimento da análise de quantificação por técnica eletroquímica de voltametria por pulso diferencial da catequina (flavanol) baseada em complexação metálica para a caracterização de compostos antioxidantes;
- Aplicação da técnica eletroquímica para fitoterápicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Instrumentação

- Pipeta Eppendorf Research Plus monocanal 100-1000  $\mu\text{L}$ ;
- Potenciostato portátil DROPSENS;
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;
- Agitador Magnético com aquecimento IKA HS 7;
- Lavadora ULTRASONIC CLEANER modelo USC 750;
- Placa aquecedora FISATOM modelo 550;
- Espectrofotômetro da marca THERMO SCIENTIFIC modelo GENESYS 10S

UV-VIS;

- Filtros Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 4.2 Reagentes e soluções

- Quercetina;
- Padrão de catequina;
- Solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ;
- Solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ ;
- Solução de catequina 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ ;
- Solução de quercetina 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ ;
- Solução de rutina 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ ;
- Metanol PA;
- Fitoterápico Chá verde;
- Fitoterápico *Ginkgo biloba*;
- Fitoterápico Quercetina;
- Fitoterápico tintura de *Calêndula officinalis*;
- Água destilada.

Os reagentes químicos usados foram de grau analítico, ademais, utilizou-se as vidrarias disponíveis no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

(NuPPeN) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia para execução dos procedimentos.

### ***4.3 Procedimento experimental***

#### *4.3.1 Preparação das soluções*

O preparo das amostras e as análises químicas foram feitas no laboratório do NuPPeN do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Primeiramente, prepararam-se em balões volumétricos de 10 mL, soluções de catequina, quercetina e rutina de concentração  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol.

Preparou-se o eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em balão de 100 mL, em metanol. E por fim, em um balão de 25 mL preparou-se a solução de  $\text{AlCl}_3$  ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) usada na preparação dos complexos metálicos.

#### *4.3.2 Preparação dos complexos metálicos*

Preparou-se os complexos através da mistura de 5 mL da solução do flavonóide ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), juntamente com 5 mL da solução de  $\text{AlCl}_3$  ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), deixando o sistema em repouso por 20 minutos, à temperatura ambiente, para que ocorresse a reação.

#### *4.3.3 Caracterização*

##### *4.3.3.1 Espectrometria UV-Vis*

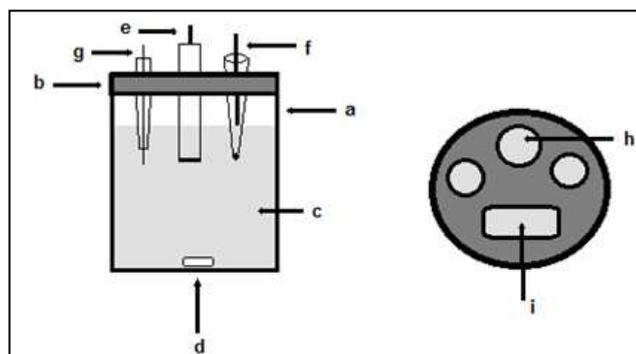
Realizou-se as medidas espectrofotométricas da mistura, em que a varredura foi feita no intervalo de 200 à 600 nm, empregando o metanol como branco para calibração do equipamento em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

##### *4.3.3.2 Medidas eletroquímicas*

Efetou-se as medidas eletroquímicas através de um potenciostato portátil Drop-Sens, conectado a um computador para análise, utilizou-se o software Drop View 1.0 para a aquisição dos dados. Empregou-se uma célula eletroquímica de 10 mL composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo ( $\varnothing = 1,6 \text{ mm}$  de diâmetro) (BAsi – West Lafayette, EUA), eletrodo de referência de  $\text{Ag/AgCl}$  ( $\text{LiCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol) e eletrodo auxiliar de platina, como esquematizado na Figura 8. A velocidade de varredura ( $S_{rate}$ ) foi  $25 \text{ mV/s}$ , sendo aplicada uma faixa de potencial entre 0,0 a 1,2 V. A altura do potencial ( $E_{puls}$ ) foi de 60,0 mV. A duração do pulso

(tpuls) foi de 10 ms. O degrau de potencial (Estep) foi de 6 mV. O eletrodo de carbono vítreo foi polido entre as medidas voltamétricas.

**Figura 8-** Representação frontal e superior da célula eletroquímica utilizada. **a)** corpo da célula; **b)** tampa superior; **c)** solução eletrolítica; **d)** barra de agitação magnética; **e)** eletrodo de trabalho; **f)** eletrodo de referência; **g)** eletrodo auxiliar; **h)** orifícios para fixação dos eletrodos; **i)** abertura para inserção da amostra



**Fonte:** A autora

Realizaram-se os ensaios por voltametria de pulso diferencial (DPV), utilizando 9,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  em metanol como eletrólito. Após a realização do branco com o eletrólito, injetou-se com o auxílio de uma micropipeta 500  $\mu\text{L}$  da amostra, e utilizou-se um agitador magnético para uma eficiente homogeneização da solução.

#### 4.3.4 Curva de calibração- Método de adição de padrão

##### 4.3.4.1 Preparo de soluções

Para construir a curva de calibração para verificar a faixa de detecção da catequina preparou-se uma solução em balão de 25 mL contendo quercetina, catequina e rutina na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  em metanol, denominada de solução problema. Além disso, preparou-se em um balão de 5 mL uma solução padrão de catequina na concentração de 10000  $\mu\text{M}$ . E por fim, em um balão de 10 mL preparou-se a solução de  $\text{AlCl}_3$  5000  $\mu\text{M}$  usada na preparação dos complexos metálicos.

#### 4.3.4.2 Reações de complexação

Em um béquer de 10 mL adicionou-se 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  (5000  $\mu\text{M}$ ) em 2 mL de solução problema (1000  $\mu\text{M}$ ), deixando o sistema em repouso por 20 minutos, à temperatura ambiente para que ocorresse a reação. Realizou-se o mesmo procedimento com a solução padrão de catequina, no entanto, pipetou-se 2,5 mL solução de  $\text{AlCl}_3$  (5000  $\mu\text{M}$ ) adicionando-se em 2,5 mL da solução padrão de catequina (10000  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.3.4.3 Medidas eletroquímicas

Efetou-se as medidas eletroquímicas adicionando-se 9 mL do eletrólito e 1 mL da solução problema complexada em uma cela eletroquímica, assim realizou-se a primeira varredura pela técnica de DPV. Após isso, pipetou-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de catequina complexada adicionando-se a mesma na cela eletroquímica, após a varredura, poliu-se o eletrodo de carbono vítreo e o mesmo procedimento foi realizado sucessivamente, a fim de plotar a curva de corrente *versus* concentração que foi de 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu\text{M}$  através da adição de alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  na cela.

#### 4.3.5 Determinação do Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Segundo a IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry), determinou-se os limites de detecção (LD) como sendo a menor concentração de um analito que dará um sinal igual a três vezes o nível de ruído da linha de base, considerando a Equação 1.

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (1)$$

Onde  $S_B$  é o desvio padrão da média das medidas do branco (neste trabalho utilizou-se a média de 3 brancos), e  $b$  é a inclinação da reta de trabalho.

Avaliou-se também o limite de quantificação (LQ) definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas pela ANVISA (2017). Considerando-se a metodologia proposta por MOCAK et al (1997), o valor de LQ é dado pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{10S_B}{b} \quad (2)$$

Calcularam-se os limites de detecção e quantificação utilizando-se o sinal do branco, é importante salientar que o branco não contém qualquer quantidade do analito posteriormente adicionado. Ademais, por convenção as medidas de LQ e LD deveriam ser feitas a partir do desvio padrão de um número grande de medidas do branco, além disso, estatisticamente quanto maior for o número de medições menor será o limite de detecção, conforme descrito pela ANVISA (2017).

#### 4.3.6 *Análise dos extratos das espécies E. Calycina e Sangra d'água*

Para determinar a quantidade de equivalente de catequina no extrato, nas frações em *n*-butanol e acetato de etila realizou-se o mesmo procedimento descrito em 4.3.4.1, 4.3.4.2 e 4.3.4.3, no entanto, preparou-se a solução problema na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> de extrato, em um balão de 5 mL em metanol.

#### 4.3.7 *Análise dos Fitoterápicos*

##### 4.3.7.1 Preparo da amostra

Pesou-se aproximadamente 2,0 g do fitoterápico de Chá verde, após isso, dissolveu-se em 5 mL de metanol, e posteriormente, deixou-se em banho ultrassônico por 15 minutos (Adaptado de CUNHA et al. (2013)). Após isso, filtrou-se a solução em um filtro Millipore de 0,45 µm e transferiu-se então a solução para um balão de 5 mL para posteriores análises. Realizaram-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o fitoterápico *Ginkgo biloba*.

Preparou-se o fitoterápico de quercetina utilizando-se cerca de 0,50 g de amostra em um balão de 10 mL, em metanol, seguindo-se os mesmos procedimentos mencionados anteriormente. Por sua vez, para a tintura de *Calêndula officinalis* por ser líquido, pipetou-se 1 mL de amostra para um balão de 5 mL, em metanol, neste caso, não necessitou-se filtrar a solução.

##### 4.3.7.2 Análise do comportamento voltamétrico

De modo a verificar o comportamento voltamétrico dos fitoterápicos, realizaram-se análises pela técnica de voltametria de pulso diferencial, tanto dos extratos não complexados quanto complexados. Preparou-se os complexos metálicos pipetando-se 2 mL da solução do fitoterápico com 2 mL da solução de AlCl<sub>3</sub>, deixando-

se o sistema em repouso por 20 minutos. Realizou-se as análises utilizando-se 9 mL de eletrólito com 1 mL da solução não complexada e, em seguida, na cela adicionou-se 9 mL de eletrólito com 1 mL da solução complexada, seguiu-se o mesmo procedimento para todos os fitoterápicos analisados.

#### 4.3.7.3 Análise do teor de catequina no extrato de Chá verde

Para construir a curva de calibração do extrato para verificar a concentração de catequina presente no chá verde, preparou-se uma solução em balão de 5 mL contendo 2,0 g do chá verde em metanol, denominada de solução problema. Além disso, preparou-se em um balão de 5 mL uma solução padrão de catequina na concentração de 10000  $\mu\text{M}$ . E por fim, em um balão de 10 mL preparou-se a solução de  $\text{AlCl}_3$  5000  $\mu\text{M}$  usada na preparação dos complexos metálicos. Em sequência, realizaram-se os mesmos procedimentos descritos em 4.3.4.2 e 4.3.4.3.

#### 4.3.7.4 Análise do teor de quercetina nos extratos de *Ginkgo biloba*, Quercetina e tintura de *Calêndula officinalis*

Para construir a curva de calibração desses extratos para verificar a concentração de quercetina presente nos mesmos, preparou-se soluções em balão de 5 mL contendo 2,000 g *Ginkgo biloba* em metanol, no caso da tintura de *Calêndula officinalis* utilizou-se 1 mL do fitoterápico para um balão de 5 mL, e por fim, preparou-se o fitoterápico de quercetina em um balão de 10 mL contendo 0,500 g do mesmo, todas as soluções chamadas de soluções problema. Além disso, preparou-se em um balão de 5 mL uma solução padrão de quercetina na concentração de 10000  $\mu\text{M}$ . E por fim, em um balão de 10 mL preparou-se a solução de  $\text{AlCl}_3$  5000  $\mu\text{M}$  usada na preparação dos complexos metálicos. Em sequência, realizaram-se os mesmos procedimentos descritos em 4.3.4.2 e 4.3.4.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Espectrometria UV-Vis

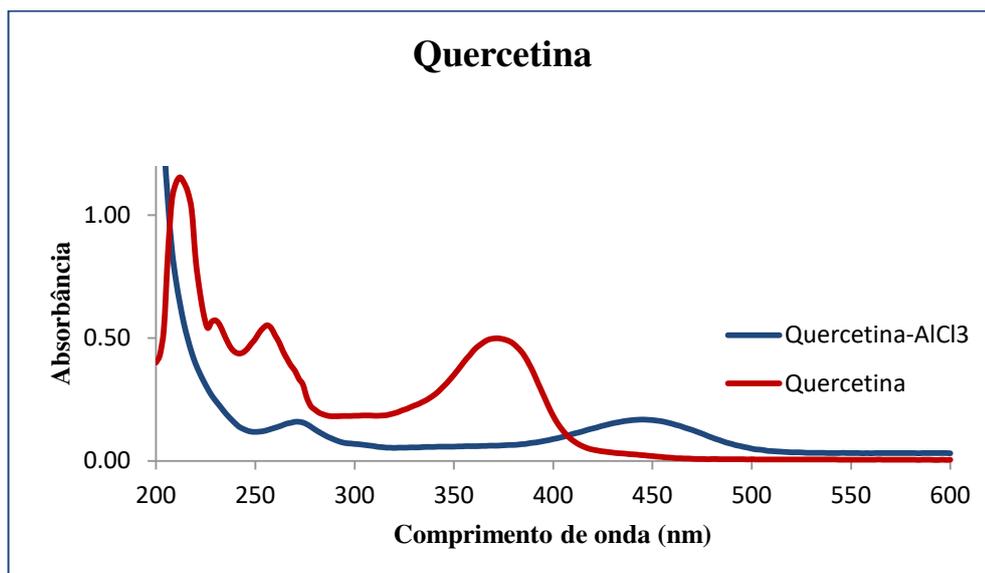
Em geral, os flavonóides podem se coordenar a íons metálicos, principalmente com o íon  $Al^{3+}$ . Essa técnica é comumente empregada no estudo de flavonóides pela análise de absorção no UV-Vis dos complexos formados, gerando deslocamentos observados nos espectros devido à formação do complexo  $Al^{3+}$ - flavonóide (POZZI, 2007). A Figura 4 (página 17) apresenta os possíveis locais de quelação da quercetina com um íon metálico para a formação de um complexo.

Para certificar-se que os complexos foram realmente formados, realizou-se medidas espectrofotométricas dos mesmos para verificar se houve deslocamentos das bandas quando comparado com os valores fornecidos pela literatura dos flavonóides analisados.

Conforme mostrado na Figura 4 (página 17), os flavonóides apresentam mais de um possível sítio de quelação para íons metálicos. A coordenação de metal no caso da quercetina pode ocorrer através do grupo 3-hidroxila e 4-carbonila do C anel aromático (denotado como sítio 3-4), o local de 4-carbonil-5-hidroxila dos anéis A e C (sítio 4-5) ou através da parte catecol do anel B (sítio 3'-4') (KASPRZAK; ERXLEBEN; OCHOCKI, 2012).

A quercetina apresenta bandas de absorção, comumente denominadas Banda I, com absorção entre 320-385 nm, correspondente à porção B do anel, e Banda II, com absorção entre 240- 280 nm, correspondente à porção do anel A (SOUZA; DE GIOVANI, 2005). Comparando os valores de absorção da quercetina com os do complexo formado com  $AlCl_3$  (Figura 9), observa-se que ocorreu um deslocamento das bandas de absorção para comprimento de onda maior (deslocamento batocrômico), (banda I: 390-510 nm; banda II: 252-300 nm). Esse deslocamento pode ser explicado pela extensão do sistema conjugado com a complexação (SOUZA; DE GIOVANI, 2005).

**Figura 9-** Espectro UV-Vis da Quercetina e do complexo Quercetina-AlCl<sub>3</sub>

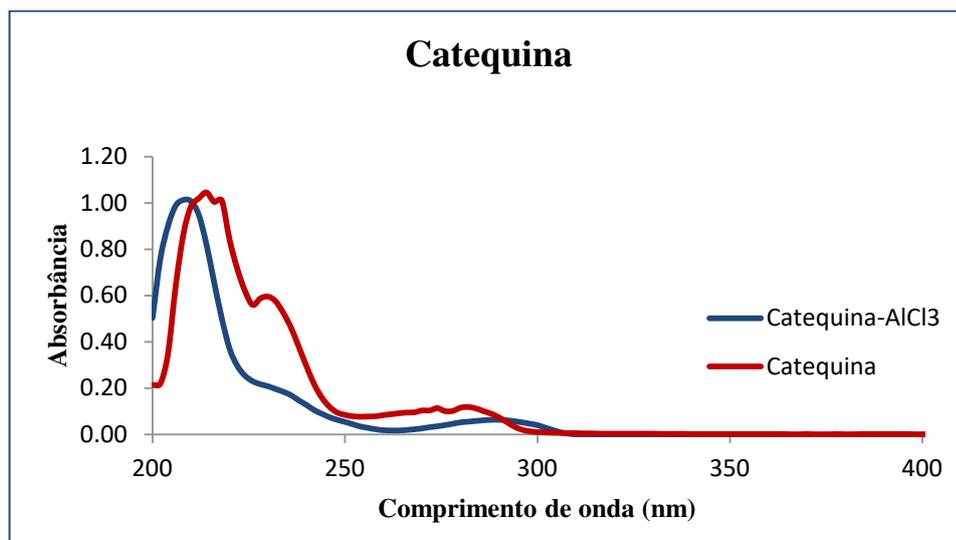


**Fonte:** A autora

É sabido que os espectros UV-Vis dão informações significativas sobre os sítios de coordenação de flavonóides. Como o hidrogênio do grupo 3-hidróxi tem menor acidez que 5-hidróxi, os grupos 3-OH e 4-Oxo são os primeiros sítios a serem envolvidos no processo de complexação (devido à interação intramolecular com a carbonila). Os grupos 3',4'-dihidroxi ligam um segundo íon metálico (LEMAŃSKA et al., 2001).

De acordo com a literatura, o espectro UV-Vis da catequina em solução de metanol exibe duas bandas de absorção, uma forte a 230 nm (banda II) e uma pouco intensa a 280 nm (banda I) (LIU et al., 2014). Na Figura 10 observa-se o espectro da catequina obtido neste experimento. Pode-se notar duas bandas de absorção, a banda II aparece em 210 nm e a banda I em 290 nm, assim, nota-se que ocorreu discreto deslocamento batocrômico das bandas. Isso se deve, pelo fato de que o complexo com a catequina é pouco estável, pois só há um sítio de quelação em sua estrutura que ocorre através da parte catecol do anel B (sítio 3',4'-OH) (Figura 4, página 17).

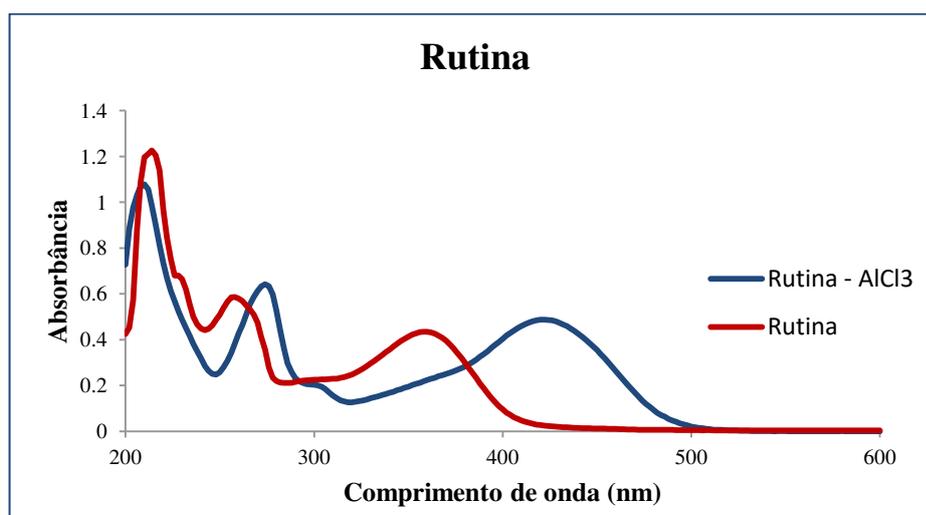
**Figura 10-** Espectro UV-Vis da Catequina e do complexo Catequina- $\text{AlCl}_3$



Fonte: A autora

Existem três bandas de absorção no espectro UV-Vis da rutina, que podem ser atribuídos à banda I (325-400 nm), banda II (250-280 nm) e a banda III (206 nm), (HONG-MEI et al., 2010). Quando complexada com cloreto de alumínio a rutina apresenta forte absorção em (320-490 nm) que corresponde à banda I, esse deslocamento batocrômico também é observado para as demais bandas do espectro em que a banda II apresenta absorção em (250-300 nm) e a banda III em (212 nm) como mostrado na Figura 11.

**Figura 11-** espectro UV-Vis da Rutina e do complexo Rutina- $\text{AlCl}_3$



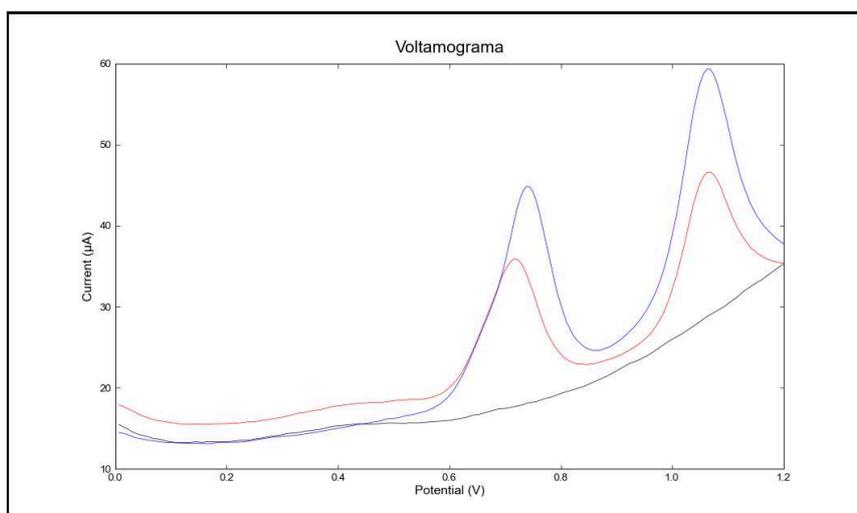
Fonte: A autora

## 5.2 Voltametria de pulso diferencial em $H_2SO_4$ ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ )

A VPD é baseada nas propriedades elétricas de uma solução que apresenta espécies de interesse (analito). Essa solução foi colocada em um sistema contendo uma célula eletroquímica, que é constituída de três eletrodos (trabalho, referência e contra eletrodo). No eletrodo de trabalho ocorreram as reações redox de interesse. O eletrodo de referência permite que o potencial permaneça constante ao longo das medidas experimentais e o contra eletrodo minimiza as possíveis reações paralelas que poderiam ocorrer no sistema. Entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência ocorreu a medida do potencial. E entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo ocorreu à medida da corrente (OLDHAM; MYLAND, 2001).

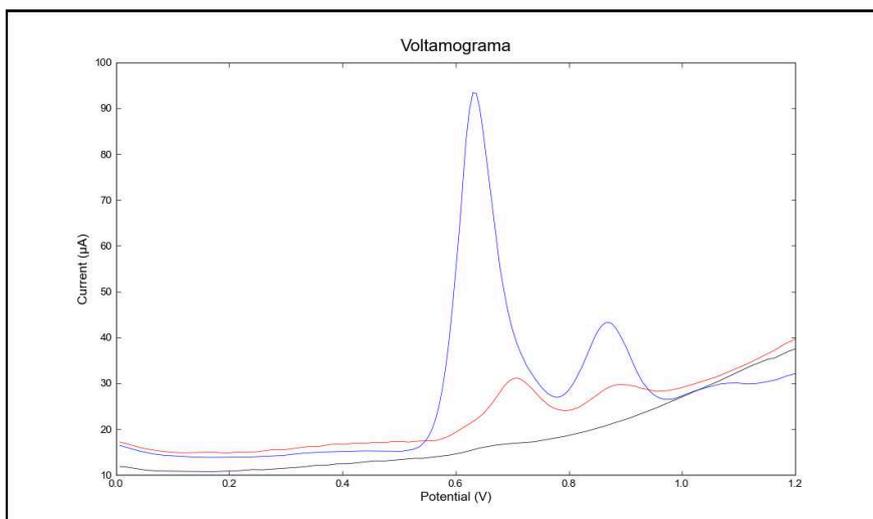
Inicialmente, a influência da complexação no comportamento dos picos de oxidação característicos dos sítios ativos de flavonóides foi avaliada através da técnica de voltametria de pulso diferencial, visto que esta é mais sensível quando comparada a voltametria cíclica e apresenta limites de detecção significativamente menores. Utilizou-se como íon o cátion  $Al^{3+}$  para complexação visto que este é o mais empregado de acordo com a literatura. Dessa forma, obtiveram-se os voltamogramas apresentados nas Figuras 12, 13 e 14 onde é possível observar as correntes de oxidação quando utilizada a solução de  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Figura 12-** Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para catequina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha)



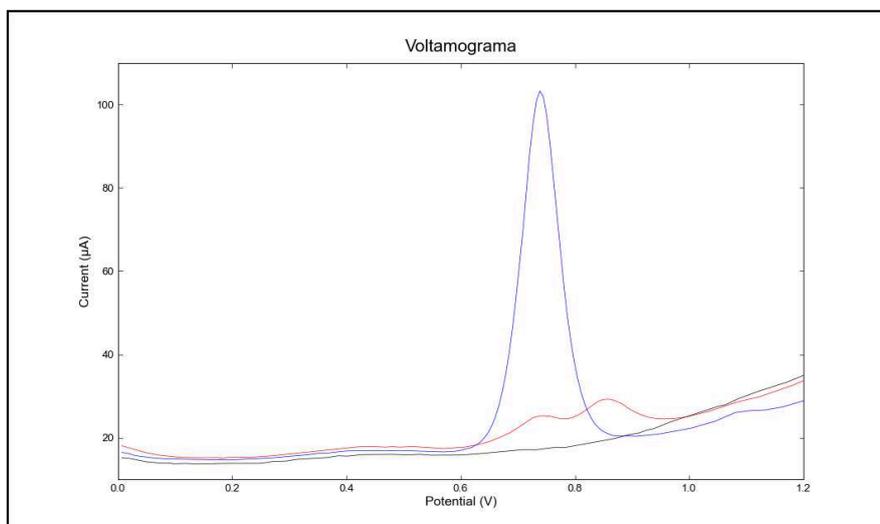
Fonte: A autora

**Figura 13-** Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para quercetina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha)



**Fonte:** A autora

**Figura 14-** Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para rutina não-complexada (linha azul) e complexada (linha vermelha)



**Fonte:** A autora

O potencial de cada pico é uma característica de cada espécie em estudo, bem como o meio (pH, natureza do eletrólito de suporte, temperatura etc). Além de estar relacionada à concentração do analito, a altura do pico também é função da amplitude do pulso aplicado. Verificando o comportamento eletroquímico através dos voltamogramas das Figuras 12, 13 e 14 é possível identificar os picos de oxidação, os quais estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico

<b>Composto</b>	<b>Valores de Potenciais (mV)</b>	
<b>Catequina</b>	737,5	1062,9
<b>Catequina-Complexo</b>	717,3	1064,3
<b>Quercetina</b>	635,8	866,8
<b>Quercetina-Complexo</b>	704,1	888,6
<b>Rutina</b>	739,0	1103,6
<b>Rutina-Complexo</b>	743,3	853,7

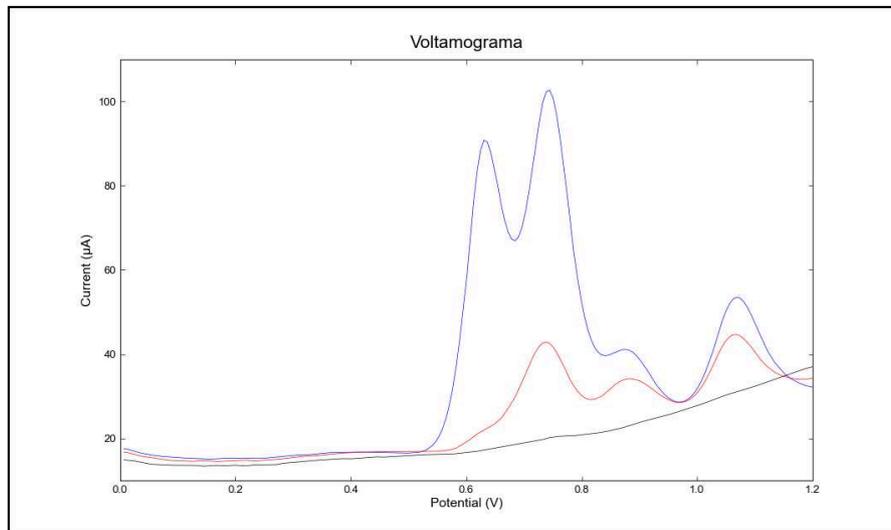
**Fonte:** A autora

As estruturas químicas dos flavonóides são bastante similares como mostrado na Figura 3 (página 16), e essas apresentam potenciais de oxidação muito próximos, principalmente, a catequina (monômero de proantocianidinas) com a rutina e, assim, torna-se difícil diferenciar essas estruturas em uma amostra que contenha tais moléculas. Quando são complexadas, a catequina forma quelatos com suas hidroxilas na posição orto do anel B, porém essas são instáveis em meio ácido, refletindo os valores próximos de potenciais, indicados na Tabela 1.

A quercetina e a rutina formam complexos mais estáveis e apresentam mais de um possível sítio de quelação. A quercetina complexada apresentou valores de potenciais maiores do que ela não complexada, e o segundo potencial da mesma não cai em nenhum intervalo próximo com a catequina e nem com a rutina. E a rutina que apresentou um potencial de 1103,6 mV, muito próximo com o valor da catequina, que quando complexada passa a apresentar um potencial de 853,7 mV, um resultado satisfatório, indicando que o pico de potencial que aparece em 1064,3 mV na Figura 16, seja apenas o da catequina.

Realizaram-se também medidas voltamétricas com 500 µL de cada solução dos flavonóides e também com os três complexos juntos para avaliar o seu comportamento, o voltamograma obtido encontra-se na Figura 15.

**Figura 15-** Voltamograma gerado por voltametria de pulso diferencial em meio de ácido sulfúrico para catequina-quercetina-rutina não-complexadas (linha azul) e complexadas (linha vermelha)



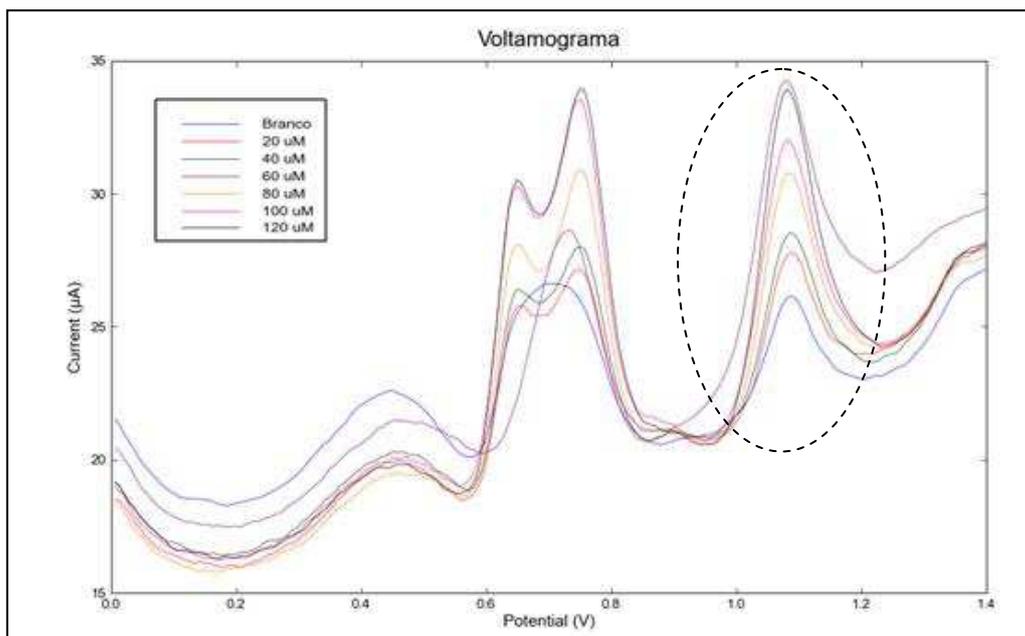
**Fonte:** A autora

Diante disso, observando os potenciais dos flavonóides não complexados, por possuírem potenciais de oxidação próximos não é possível diferenciá-los por esta técnica. Entretanto, quando complexados, observa-se que o potencial de 1064,3 mV da catequina diferencia-se dos demais complexos. Logo, torna-se possível a determinação e a quantificação desse composto em um extrato que contenha quercetina e rutina, por exemplo.

### **5.3 Curva de calibração da catequina- Método de adição de padrão**

Para a construção da curva de calibração da catequina realizou-se diversas varreduras com soluções da mesma, em diferentes concentrações. A Figura 16 mostra um voltamograma obtido de uma das triplicatas.

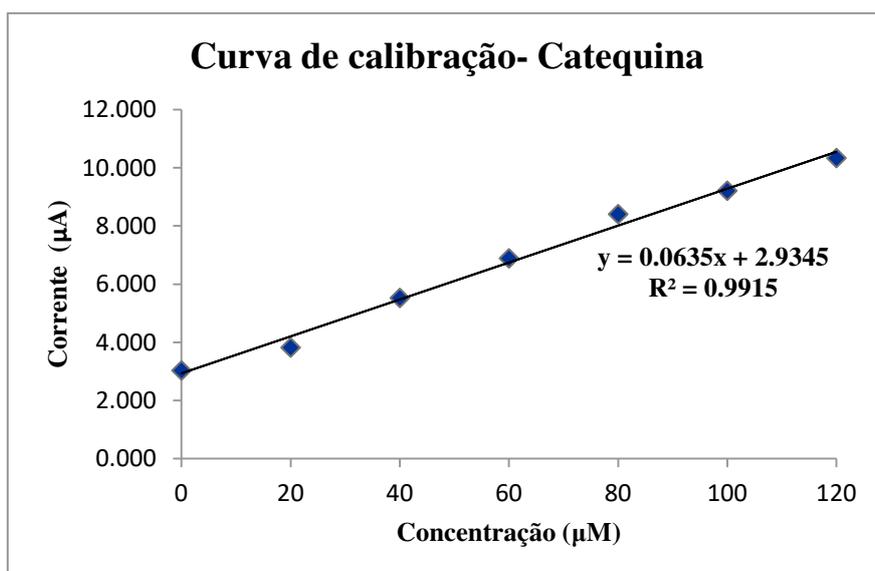
**Figura 16-** Voltamogramas da catequina em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$



**Fonte:** A autora

A dependência linear das correntes de pico com a concentração da catequina em solução possibilitou a construção da curva de calibração mostrada na Figura 17. Realizou-se a construção dessa a partir da média dos valores de área obtidos integrando-se os picos assinalados, conforme mostra a Figura 16.

**Figura 17-** Curva de calibração da catequina



**Fonte:** A autora

De acordo com ANVISA (2003), a recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, diante disso, a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de catequina adicionado à amostra foi de 93,8 %, correspondendo a uma concentração de  $46,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$  um valor bastante aceitável para a análise.

#### 5.4 Comparação de outras técnicas com a voltametria de pulso diferencial

Diante das análises realizadas até então, observa-se que a voltametria de pulso diferencial apresentou-se ser mais rápida do que técnicas como cromatografia líquida de alta resolução e eletroforese capilar) e que as técnicas voltamétricas apresentam um tempo de análise menor, como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2-** Tabela comparativa de outras técnicas para determinação de flavonóides com a voltametria de pulso diferencial

Técnica	Tempo de análise (min)	Recuperação (%)	Limite Quantificação (LQ) $\text{mg. L}^{-1}$	Limite de Detecção (LD) $\text{mg. L}^{-1}$	Linearidade ( $R^2$ )	Referência
VPD	4,8	93,8	0,4692	0,1408	0,9915	A autora
RP-HPLC	25	91,8-105	0,04-1,41	0,04-0,85	0,9995	PADILHA et al. (2017)
HPLC-PDA	10	-	0,16-2,50	0,05-0,80	0,9997	LÓPEZ et al. (2013)
	4,17	-	0,8160 <sup>a</sup>	0,2418 <sup>a</sup>	0,9710	
FIA-VC			4,4568 <sup>b</sup>	1,3431 <sup>b</sup>	0,9920	MAGNUSZEW
CE	10	99,7-102	0,946 <sup>a</sup>	0,2841 <sup>a</sup>	0,9620	e KROGULEC (2013)
			1,4530 <sup>b</sup>	0,4359 <sup>b</sup>	0,9560	

<sup>a</sup> Valores obtidos para quercetina e <sup>b</sup> valores obtidos para rutina

**Fonte:** A autora

O método de determinação de compostos fenólicos utilizado por PADILHA et al. (2017) foi a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se uma nova coluna de resolução mais rápida, porém mais cara, para caracterizar produtos comerciais produzidos com novas variedades brasileiras de uva do Nordeste do Brasil, dentre os quais destaca-se o vinho. Alguns parâmetros de validação utilizados por este autor estão mostrados na Tabela 2, em que avaliou-se 15 compostos

fenólicos presentes em vinhos e sucos, dentre eles a (+)-catequina, que também foi objeto de estudo nesse trabalho. Segundo PADILHA et al. (2017), o método utilizado em seu estudo foi considerado rápido, uma vez que em métodos de determinação de compostos fenólicos por RP-HPLC usando colunas clássicas tipo RP-C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5 µm) os tempos de duração variam de 43 a 86 min. Comparando-se a técnica de VPD desenvolvida nesse trabalho com a RP-HPLC utilizada por PADILHA et al. (2017), verifica-se que o primeiro é mais de 5 vezes mais rápido, além de ser um equipamento mais barato e de fácil manutenção.

No trabalho de CASTRO-LÓPEZ et al. (2013), desenvolveu-se métodos também por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para analisar os antioxidantes naturais catequinas e quercetina utilizados em embalagens ativas e alimentos funcionais, tais compostos também foram avaliados nesse trabalho. Os métodos mais desenvolvidos para a determinação de catequinas foram estabelecidos com base na HPLC de fase reversa acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (PDA). Assim, a viabilidade das metodologias Cromatografia Líquida de Alta Resolução-Detector Arranjo de Diodos- Fluorescência (HPLC-PDA-FL) e Cromatografia Líquida de Alta Resolução- Detector Arranjo de Diodos- Armadilha de íon quadrupolo-Espectrômetro de massas (HPLC-PDA-LQT-MS) para a determinação simultânea de rotina de catequinas maiores e menores e quercetina foi comparada em termos de melhor resolução e maior sensibilidade de detecção. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para o ensaio utilizando HPLC-PDA para a análise de rotina de sete catequinas e da quercetina. Dessa forma, de acordo com CASTRO-LÓPEZ et al. (2013) a HPLC-PDA forneceu análises em um curto período de análise (10 min) por um gradiente de eluição de metanol-água, tempo este considerado ainda superior quando comparado a VPD cujo tempo gasto para as análises foi de 4,8 minutos. Os estudos no trabalho de CASTRO-LÓPEZ et al. (2013) foram feitos para 12 amostras naturais chás branco, verde, vermelho e preto; resíduos de uva, cacau, tutsan, verbena de limão, casca de cevada, ouriço de castanheiro, lúpulo e resíduo de fabricação de cerveja. Ademais, um importante impacto proporcionado pela VPD é a possibilidade de quantificar e diferenciar catequina de demais flavonóides em amostras complexas, como fitoterápicos, chás, vinhos, por exemplo.

Além disso, dentro da área de produtos naturais quando se realiza a análise de compostos presentes em extratos de material vegetal, na maioria das vezes utiliza-se ensaios colorimétricos, a fim de determinar proantocianidinas e flavonóides, no entanto,

sabe-se que tais avaliações qualitativas não são eficientes devido à grande similaridade entre as estruturas. Aliado a isso, os fitoterápicos exigem análises quantitativas, mas de menor custo e as técnicas voltamétricas surgem como uma opção bastante promissora. Dessa forma, esse trabalho possibilitará o desenvolvimento de uma análise com uma gama de aplicações muito importantes.

MAGNUSZEWSKA e KROGULEC (2013) aborda a determinação de quercetina e rutina por análise por injeção em fluxo em voltametria cíclica (FIA-VC) e eletroforese capilar (CE) utilizando detecção eletroquímica que foi descrita para análise dos flavonóides em amostras naturais da planta (extrato de espinheiro) e uma preparação farmacêutica (Cerutin).

Os resultados apresentados no trabalho de MAGNUSZEWSKA e KROGULEC (2013) mostram que em condições de fluxo (FIA e CE) na voltametria cíclica em microeletrodos de platina normal e quente pode ser usada para determinar flavonóides, como a quercetina e a rutina. Foi demonstrado que o método de detecção por voltametria cíclica permite a detecção direta e rápida de baixas concentrações de flavonóides em amostras naturais das plantas (extrato de espinheiro marítimo) ou em amostras farmacêuticas (Cerutin). Na Tabela 2 pode-se verificar também que tanto a FIA-VC quanto a VPD apresentam tempos de análises muito semelhantes e que essas permitem a detecção de compostos de maneira mais rápida que as demais técnicas abordadas. A recuperação determinada para flavonóides no CE foi de 99,7-102,9%, enquanto que a taxa de recuperação para a catequina foi de 93,8% por VPD, o trabalho de MAGNUSZEWSKA e KROGULEC (2013) não menciona a recuperação obtida por FIA-VC. De acordo com as análises, o uso de microeletrodos aquecidos para detecção em eletroforese capilar não apresenta resultados comparáveis àqueles obtidos pelo FIA-VC, nota-se isso por meio dos valores de linearidade que não foram satisfatórios para a CE. Por meio da Tabela 2, é possível observar que os LQ e LD obtidos pela técnica de VPD estão dentro do intervalo de todas as demais técnicas mencionadas e ainda que a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra teve uma relação bastante linear.

### 5.5 *nálise do teor de catequina em extrato da espécie E. Calycina e Sangra d'água*

Após a constatação de que é possível determinar e quantificar a catequina em extratos avaliou-se o teor de catequina em frações (*n*-butanol e acetato de etila) do extrato etanólico da *E. Calycina* em folhas, galhos e flores, bem como nos galhos da espécie Sangra d'água. Tais determinações foram realizadas por meio de curvas de calibração que se encontram no APÊNDICE A. A Tabela 3 mostra a quantidade de catequina dada em *mg* de equivalente de catequina por *g* de extrato ( $\text{mg EC g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ).

**Tabela 3-** Teor de equivalente de catequina em *E. Calycina* e Sangra d'água

Frações <i>E. Calycina</i>	Teor de equivalente de catequina ( $\text{mg EC g}_{\text{extrato}}^{-1}$ )			
	Galho	Folha	Flor	Sangra d'água
<i>n</i> -Butanol	0,0017	4,0201	0,3504	3,5433
Acetato de etila	21,8939	11,2775	15,2533	9,8506

Fonte: A autora

Na Tabela 3 é possível notar que as frações de acetato de etila foram aquelas que apresentaram uma maior concentração de catequina (monômero de proantocianidinas), além disso, a concentração da mesma é maior nos extratos de galho e no extrato de flor da partição em acetato de etila.

Como os compostos fenólicos apresentam polaridade intermediária, isso pode levar a uma maior extração de compostos fenólicos para as frações em acetato de etila, isso pode justificar a maior quantidade obtida.

Quanto maior estes valores, maior o teor de catequina, diante disso, pode-se dizer que as frações *E. Calycina* em acetato de etila estão em maiores quantidades no galho e em seguida nas flores.

### 5.6 *Análise dos fitoterápicos*

#### 5.6.1 *Análise do comportamento voltamétrico do Chá verde*

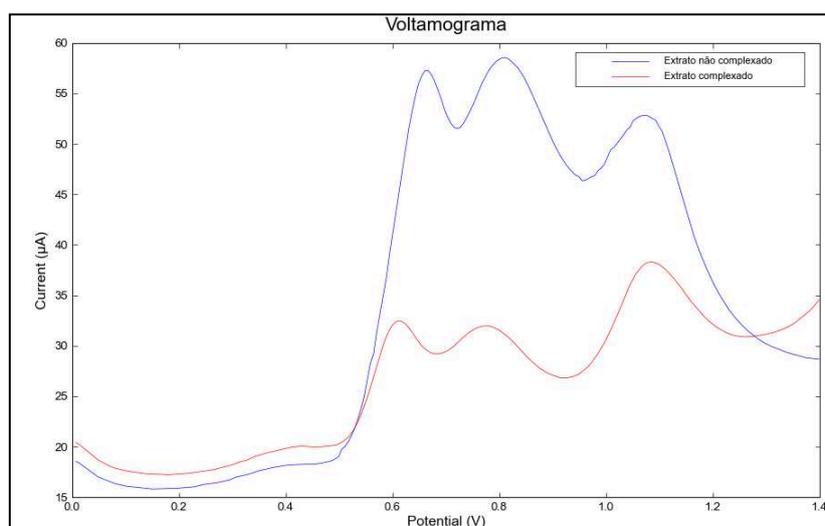
Após a quantificação de catequina em extratos vegetais, avaliou-se a presença e o teor de catequina e quercetina em fitoterápicos. O primeiro estudo de caso foi realizado com o fitoterápico de chá verde, segundo SENGGER, SCHWANKE e GOTTLIEB (2010), a composição química do chá verde inclui diversas classes de compostos fenólicos ou flavonóides, tais como flavonóis e ácidos fenólicos, além de

caféina, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e certos micronutrientes como as vitaminas B, E, C e minerais como o cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro.

Os principais flavanóis presentes no chá verde são os monômeros de catequinas. As catequinas do chá verde incluem, por exemplo, a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG) (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

A EGCG corresponde a mais abundante catequina do chá verde (50-60%). O teor de catequinas no vegetal depende de alguns fatores externos, tais como forma do processamento das folhas antes da secagem, localização geográfica do plantio e condições de cultivo. Observam-se por meio do voltamograma apresentado na Figura 18, picos de oxidação característicos da catequina, 732 mV e em 1062,7 mV.

**Figura 18-** Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do Chá verde, em meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).



**Fonte:** A autora

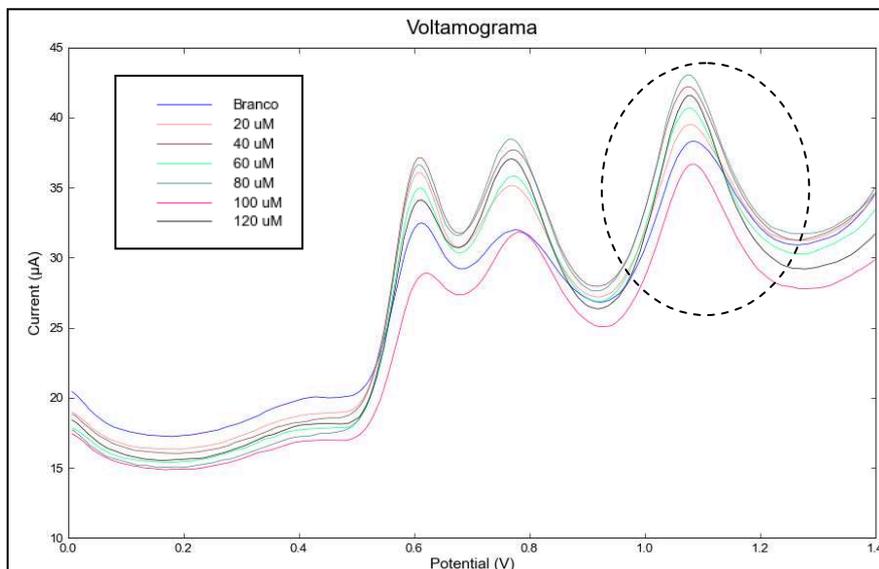
Comprovando-se a presença de catequina no chá verde, determinou-se o teor de catequina presente no mesmo, realizando-se uma curva de calibração pelo método de adição de padrão.

#### *5.6.1.1 Análise do teor de catequina no extrato de Chá verde*

A Figura 19 mostra os voltamogramas em diferentes concentrações, observa-se um pico de oxidação muito característico da catequina, que está assinalado, por meio da

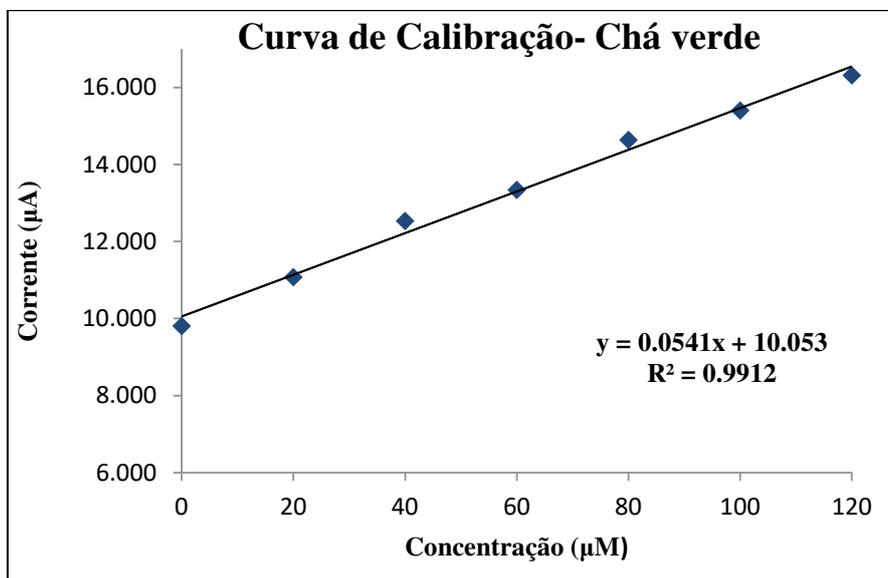
integração desses foi possível construir a curva de calibração do extrato de chá verde, apresentado na Figura 20.

**Figura 19-** Voltamogramas do Chá verde utilizando eletrólito de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$



Fonte: A autora

**Figura 20-** Curva de calibração Chá verde



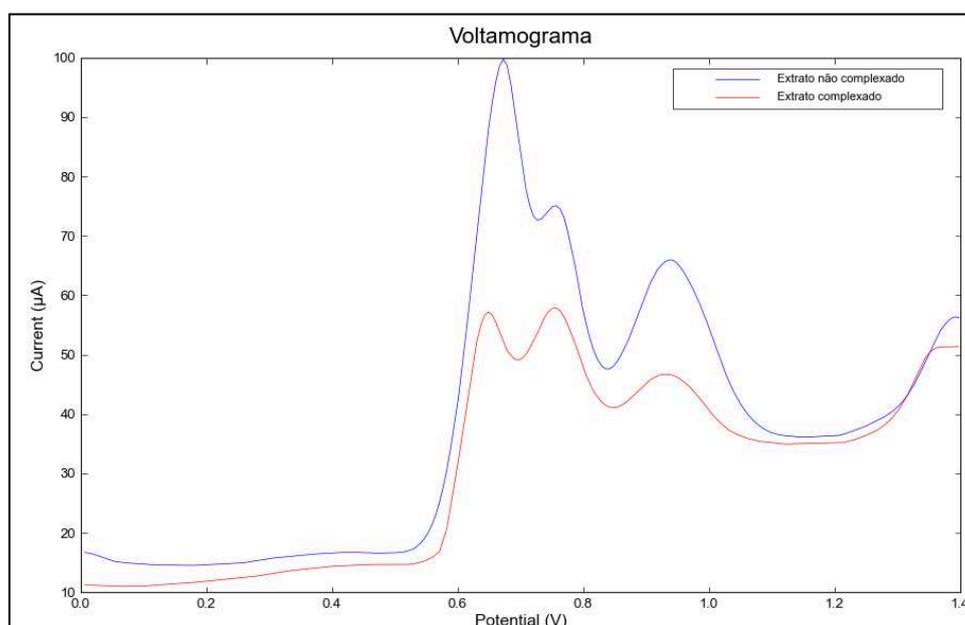
Fonte: A autora

A concentração obtida de equivalente de catequina presente no chá verde foi de  $185,82 \pm 0,30 \text{ µM}$ .

### 5.6.2 Análise do comportamento voltamétrico do *Ginkgo biloba*

O segundo fitoterápico analisado foi o *Ginkgo biloba* cuja composição química é: diterpenos (ginkgolídeos A, B, C, J e M); flavonóides (bioflavonóides: ginkgetina, isogenkgetina, bilobetina); flavonóis (quercetina, kaempferol e seus glicosídeos); hidrocarbonetos; aminoácidos; esteróis; açúcares; álcoois; proantocianidina e terpenos (Extrato padronizado 24% de Flavonóides Glicosídeos) (GINKGO, 2018). Por meio de dados da literatura e do perfil voltamétrico do extrato obtido na Figura 21, verifica-se picos de oxidação referentes à quercetina, no potencial de 668,9 e em 929,9 mV. Ademais, o pico de oxidação que aparece no potencial de 753,7 mV pode ser de algum outro composto presente na amostra que possa sofrer oxidação.

**Figura 21-** Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do *Ginkgo biloba*, em meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).



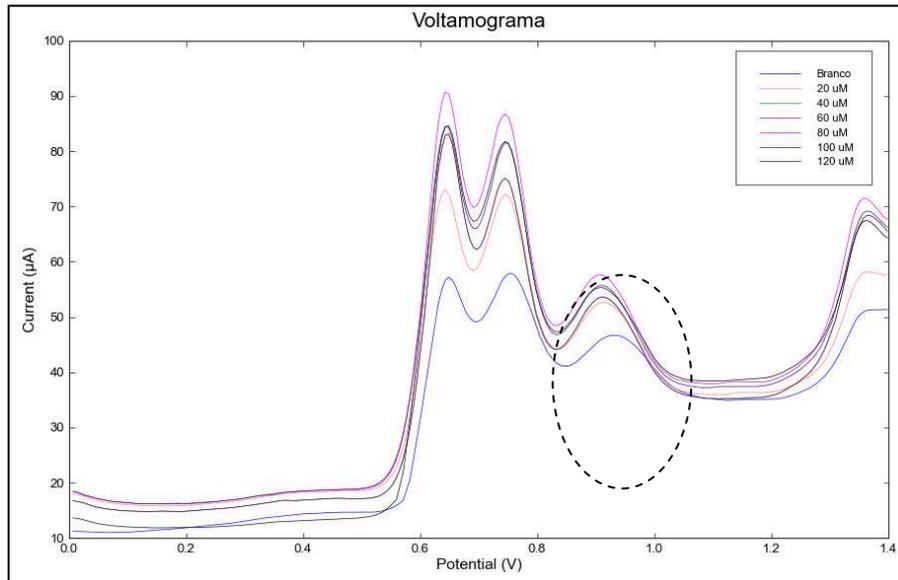
**Fonte:** A autora

Diante do exposto, realizou-se a construção de uma curva de calibração a fim de determinar a concentração de quercetina presente no fitoterápico analisado.

### 5.6.2.1 Análise do teor de quercetina no extrato *Ginkgo biloba*

Para a elaboração da curva de calibração adotando-se o método de adição de padrão, integrou-se o pico assinalado no voltamograma mostrado na Figura 22, no qual se obteve a melhor correlação em comparação com os demais picos.

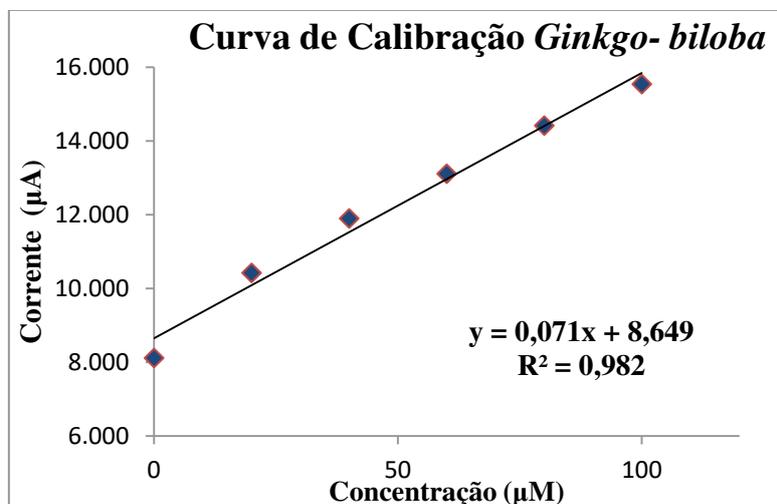
**Figura 22-** Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>



Fonte: A autora

Dessa forma, foi possível determinar a concentração de equivalente de quercetina por meio da curva de calibração mostrada na Figura 23, obtendo-se um valor de  $121,82 \pm 0,13 \mu\text{M}$ .

**Figura 23-** Curva de calibração *Ginkgo- biloba*



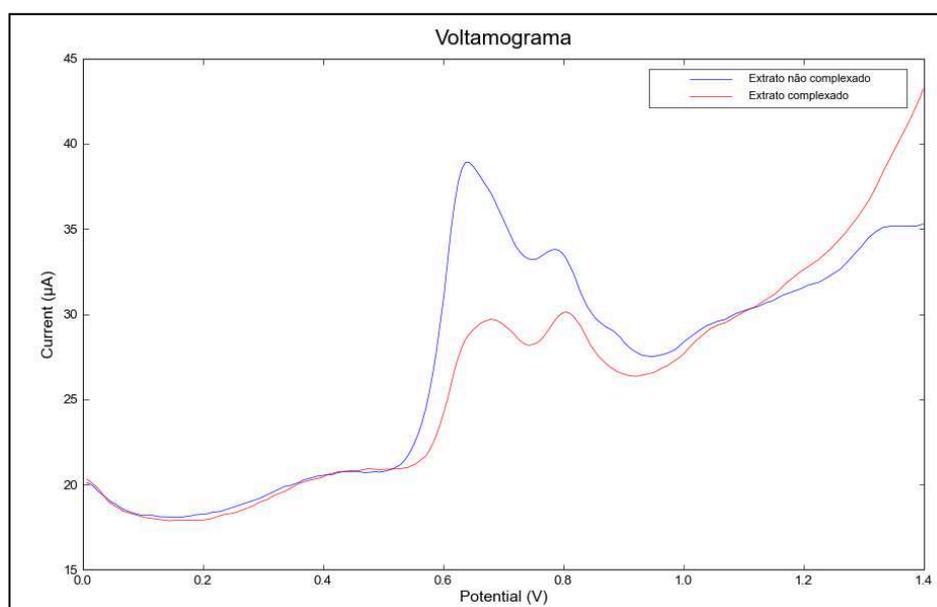
Fonte: A autora

### 5.6.3 Análise do comportamento voltamétrico de tintura de *Calêndula officinalis*

A *Calêncula officinalis* é conhecida popularmente como bem-me-quer, mal-me-quer, margarida dentre outros. Sua composição é basicamente: óleo essencial, abundante em monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados: carvona, geranilacetona, mentona, isomentona, cariofileno, alfa e betaiononas, pedunculatina, dihidroascinidiólido; saponinas: calendulosídeo A, D, D<sub>2</sub> e F; carotenóides: calendulina, caroteno, licopeno, rubixantina, violaxantina e zeína; flavonóides: derivados do quercetol e do isorramnetol; álcoois triterpênicos pentacíclicos: arnidiol, faradiol, ácido faradiol-3- mirístico, lupol, taraxasterol, ácido faradiol-3-palmítico; polissacarídeos: ramnoarabino-galactano e arabinogalactanos; ácido málico; mucilagens; resina; Goma (calendulina); taninos; poliacetilenos; esteróis: sitosterol, estigmasterol, isofucosterol, campesterol e ácido salicílico (CALÊNDULA, 2018).

No voltamograma mostrado na Figura 24 do extrato de tintura de *Calêndula officinalis* nota-se que não há presença de catequina, no entanto, há a presença de derivados de quercetina. O perfil voltamétrico obtido é distinto dos demais realizados até então, e assim como os outros voltamogramas apresentados, o extrato complexado apresenta uma intensidade menor.

**Figura 24-** Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato de tintura de *Calêndula officinalis* meio de ácido sulfúrico quando não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).



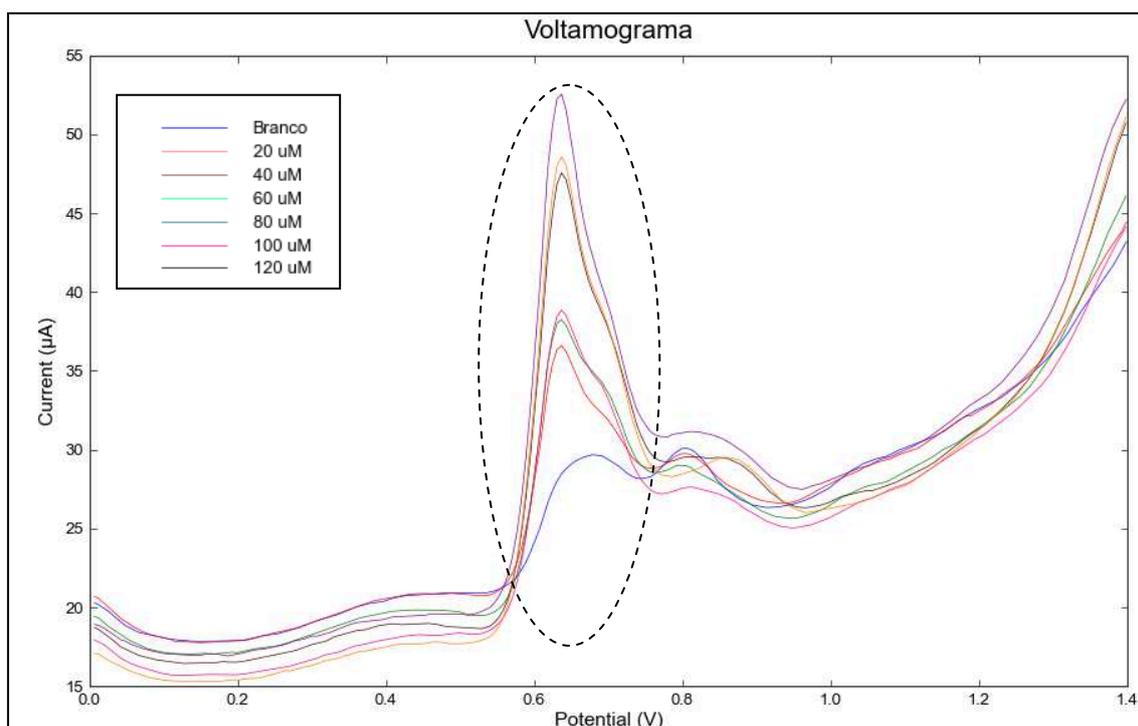
Fonte: A autora

Os potenciais de oxidação do extrato não complexado aparecem em 636,7 e 787,9 mV enquanto o do extrato complexado se encontra em 668,9 e 802,8 mV. Comparando-se esses valores com os potenciais de oxidação da quercetina que se encontram na Tabela 1, pode-se observar que esses valores são muito similares e, dessa forma, provavelmente o perfil voltamétrico obtido é de quercetina ou um derivado com estrutura muito similar à mesma.

### 5.6.3.1 Análise do teor de quercetina na tintura de *Calêndula officinalis*

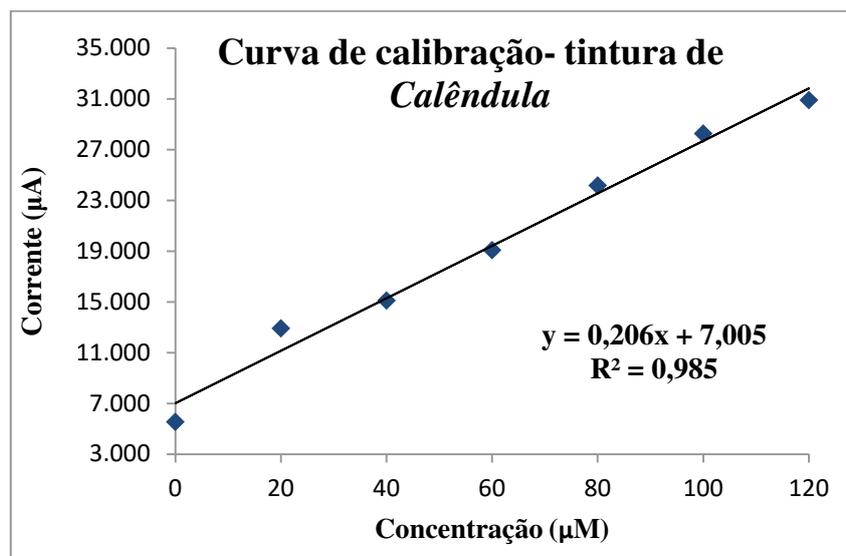
A determinação do teor de quercetina na tintura de *Calêndula officinalis* foi obtido integrando-se os picos assinalados na Figura 25.

**Figura 25-** Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol L<sup>-1</sup>



Fonte: A autora

**Figura 26-** Curva de Calibração tintura de *Calêndula officinalis*



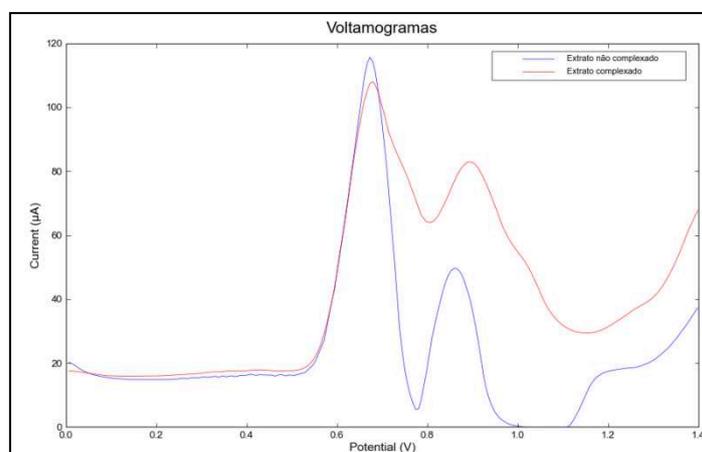
Fonte: A autora

Diante disso, obteve-se uma concentração de equivalente de quercetina de  $34,00 \pm 1,17 \mu\text{M}$  presente no fitoterápico de tintura de *Calêndula officinalis*, apresentando a menor concentração de quercetina dentre os fitoterápicos analisados.

#### 5.6.4 Análise do comportamento voltamétrico do fitoterápico de quercetina

O último fitoterápico analisado foi o que continha quercetina, verifica-se que quanto maior a concentração desse presente no extrato, maior é a intensidade do sinal, e isso pode ser verificado na Figura 27.

**Figura 27-** Perfil voltamétrico pela técnica VPD do extrato do fitoterápico de quercetina não complexado (linha azul) e com complexação (linha vermelha).



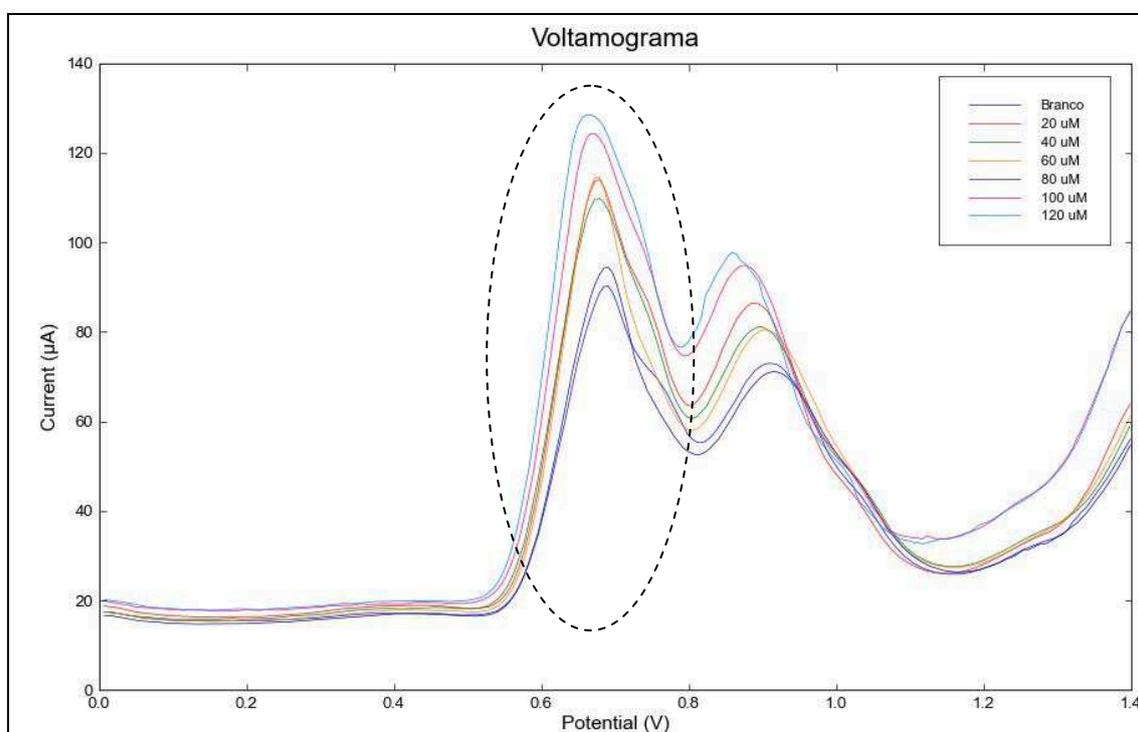
Fonte: A autora

Os potenciais de oxidação do extrato não complexado aparecem em 670,6 e 860,4 mV e os potenciais do extrato complexado em 684,2 e 907,9 mV, valores de potenciais muito próximos ao da quercetina padrão que se encontram na Tabela 1.

#### 5.6.4.1 Análise do teor de quercetina no fitoterápico de quercetina

O teor em equivalente de quercetina foi determinado pela integração dos picos de oxidação assinalados na Figura 28.

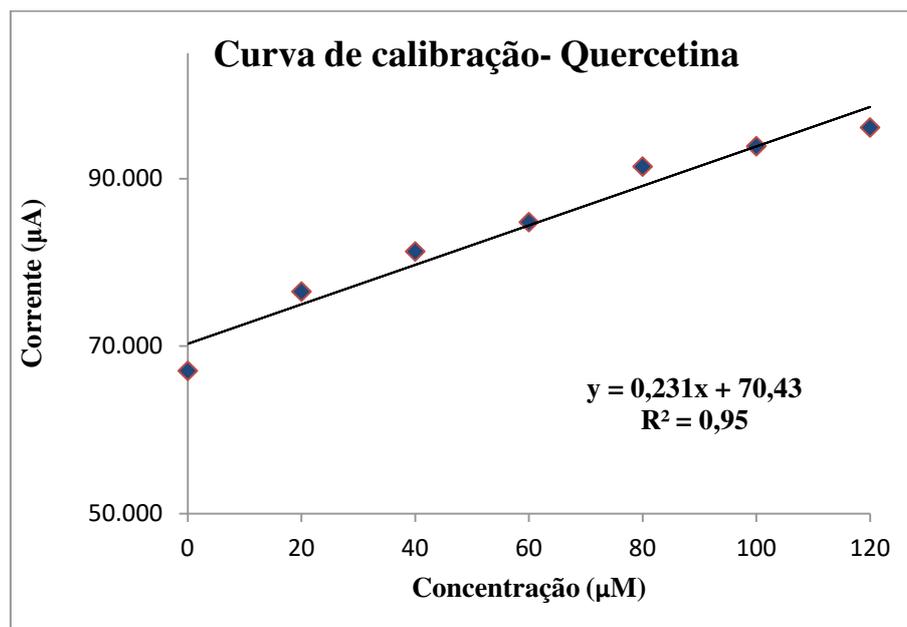
**Figura 28-** Voltamogramas em diferentes concentrações dissolvidas no eletrólito de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$



**Fonte:** A autora

A concentração de equivalente de quercetina obtida foi de  $299,06 \pm 2,97 \mu\text{M}$ , logo dentre os fitoterápicos que continham quercetina, esse último é o que apresenta a maior concentração.

**Figura 29-** Curva de calibração do fitoterápico de quercetina



**Fonte:** A autora

Nota-se ainda, que a curva de calibração da Figura 29 apresentou uma correlação menor do que os demais fitoterápicos estudados, porém ainda é uma correlação forte. A Tabela 4 apresenta os valores de concentração de equivalente de quercetina determinados por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial, construindo-se curvas de calibração pelo método de adição de padrão.

**Tabela 4-** Valores de concentração de equivalente de quercetina obtidos da análise dos fitoterápicos

<b>Fitoterápicos</b>	<b>Concentração quercetina (µM)</b>
<i>Ginkgo biloba</i>	121,82 ± 0,13
Tintura de <i>Calêndula officinalis</i>	34,00 ± 1,17
Quercetina	299,06 ± 2,97

**Fonte:** A autora

Diante dos valores obtidos, verifica-se que o fitoterápico de quercetina apresenta o maior teor, seguida do *Ginkgo biloba* e, por fim, a tintura de *Calêndula officinalis*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da técnica de voltametria de pulso diferencial foi possível diferenciar por eletroquímica o monômero de proantocianidinas (catequina) dos flavonóides analisados através da estratégia de complexação.

Com a construção de uma curva de calibração da catequina foi possível obter uma taxa de recuperação que está de acordo com os padrões estabelecidos pela norma.

Ademais, o estudo realizado com os extratos da espécie *E.Calycina* e Sangra d'água na quantificação de catequina se mostraram bastante eficientes, um resultado muito promissor.

Conseguiu-se analisar a presença e determinar o teor de catequina e quercetina nos fitoterápicos comerciais analisados por meio da VPD, adotando-se a estratégia de complexação com o íon  $Al^{3+}$ .

A técnica empregada apresentou-se como uma boa opção para a realização das análises, além, de um custo reduzido, boa resolução e rápida velocidade.

## REFERÊNCIAS

- AL-MUSAYEIB, N. M.; MOTHANA, R. A.; MATHEEUSSEN, A.; COS, P.; MAES, L. *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 49-56, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186%2F1472-6882-12-49>
- ANVISA .**RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 166**:. 141 ed. São Paulo: 2017. 22 p. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2018.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO - RE N° 899, DE 29 DE MAIO DE 2003**: GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS. São Paulo: 2003. 12 p. Disponível em: [http://redsaing.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsaing.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)>. Acesso em: 08 nov. 2018.
- ANVISA. **O que são fitoterápicos**, 2016. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster\\_fitoterapicos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf) >. Acesso em: setembro de 2016.
- BRASIL. Portal Brasil. Ministério da Saúde. **Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%**. 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 27 nov. 2018.
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3248S – 3254S, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3248S>
- CALÊNDULA. Disponível em: <http://florien.com.br/wp-content/uploads/2016/06/CAL%C3%80NDULA.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2018.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.004>
- CASTRO-LÓPEZ, M. D. M.; LÓPEZ-VILARIÑO, J. M.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. V. Analytical determination of flavonoids aimed to analysis of natural samples and active packaging applications. **Food Chemistry**, v. 150, p. 119-127, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.156>
- CUNHA, R. R.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p.663-668, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000500009>
- DOURADO, R. S; LADEIRA, A. M. Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae), **Revista Brasil**,v. 31, n.4, p.611-620, 2008.
- EMBRAPA. **Substâncias ativas e nanomateriais**: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Disponível em: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/gp/bioativos-nanomateriais>>. Acesso em: 29 nov. 2018.
- GINKGO BILOBA. Disponível em: <http://florien.com.br/wp-content/uploads/2016/06/GINKGO-BILOBA.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HONG-MEI, Z.; QIU-HUA, Z.; YU-QIN, Y.; YAN-QING, W. Investigation of the interaction between rutin and trypsin in solution by multi-spectroscopic method. **Spectroscopy Letters**, v. 43, n. 3, p. 183-191, 2010. <https://doi.org/10.1080/00387010903284331>

JIRI, D; ONDREJ, Z; BRANISLAV, R-N; MIROLASVA, B, JAROMIR, H; BORIJOV, K; RENE, K;VOJTECH, A., Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants: a review, **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 4, p. 4520-4542, 2013.

KANG, J.; PRICE, W. E.; ASHTON, J.; TAPSELL, L. C.; JOHNSON, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of *Sorghum wholegrains* by LC-ESI-MS(n). **Food Chemistry**, v. 211, p. 215-226, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.052>

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004. DOI: 10.1080/10408690490886683

KASPRZAK, M. M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, v. 5, n. 57, p. 45853-45877, 2012. DOI: 10.1039/c5ra05069c

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KUTCHAN, T. M. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 493-506, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95128-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95128-8)

LEMAŃSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELIŃSKI, R.; SOFFERS, A. E. M. F.; RIETJENS, I. M. C. M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 7, p. 869-881, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00638-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00638-4)

LIU, J.; LU, J.-F.; KAN, J.; WEN, X.-Y.; JIN, C.-H. Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 76-83, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.028

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>

MAGNUSZEWSKA, J.; KROGULEC, T. Application of hot platinum microelectrodes for determination of flavonoids in flow injection analysis and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 786, p.39-46, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.031>

- MALESEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonóide chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n.10, p. 921 - 939, 2007. DOI: 10.2298/JSC0710921M
- MARTINEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUNON, M.J Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, v. 17, n.6, p. 271-278, 2002.
- MOCAK, J.; BOND, A. M.; MITCHEL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standart (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 297-328, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1515/iupac.69.0002>
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012. DOI: 10.1021/np200906s
- OLDHAM, K.; MYLAND, J. **Fundamentals of Electrochemical Science**. ed. New York Academic Press 2001. 496 p.
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. DOI: 10.5935/1984-6835.20130040
- PADILHA, C. V. D. S.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. D. S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométricos de flavonóides do “Maracujá”**. 2007, (Dissertação) - Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, E. A parceria Universidade-Empresa privada na produção de fitoterápicos no Brasil. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v. 4, n. 37, p. 30-39, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, v. 38, n. 329, p.29-40, 2002.
- SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p.292-300, 2010.
- SKOOG, D. A., F. J., NIEMAN, T. A. Principles of Instrumental Analysis. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders College Publishing., 1998.
- SOUSA, R. A. F. **Estudo químico de *Eugenia calycina* Cambess e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e inibidora de alfa-amilase**. 2015.222 f. (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.

SOUZA, R. F. V.; DE GIOVANI, W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 1985–1990, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.07.029>

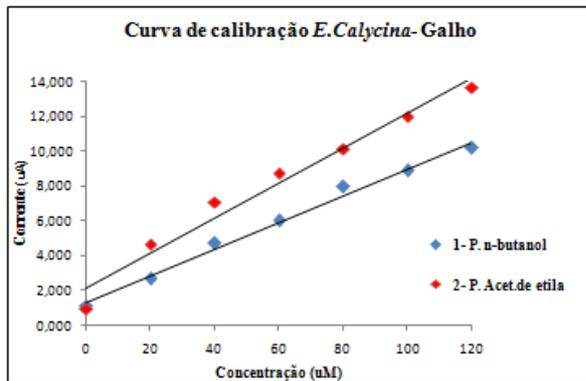
VILA, F. C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)

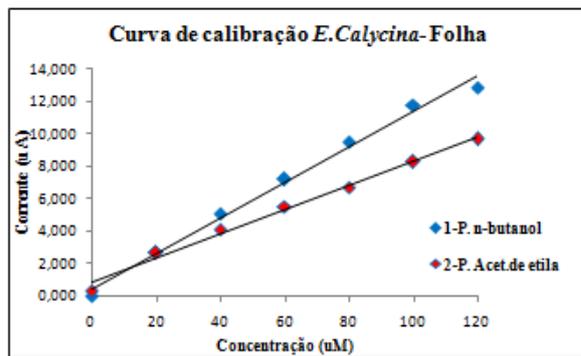
WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

ZHANG, L.; RAVIPATI, A. S.; KOYYALAMUDI, S. R.; JEONG, S. C.; REDDY, N.; SMITH, P. T.; BARTLETT, J.; SHANMUGAM, K.; MÜNCH, G.; WU, M. J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12361-12367, 2011. DOI: 10.1021/jf203146e

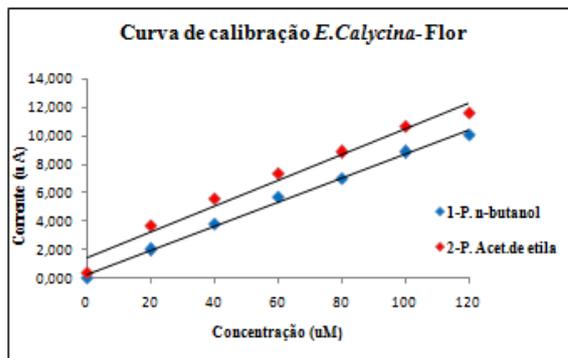
## APÊNDICE: Curvas de Calibração



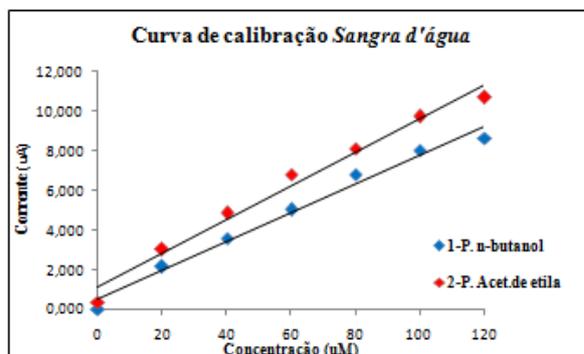
Partição	Equação	R <sup>2</sup>
1	$y = 0,0767x + 1,3347$	0,9917
2	$y = 0,0999x + 2,1872$	0,9724



Partição	Equação	R <sup>2</sup>
1	$y = 0,1095x + 0,4402$	0,9926
2	$y = 0,0746x + 0,8413$	0,9923



Partição	Equação	R <sup>2</sup>
1	$y = 0,084x + 0,2943$	0,9956
2	$y = 0,0912x + 1,3911$	0,9757



Partição	Equação	R <sup>2</sup>
1	$y = 0,0797x + 0,2824$	0,995
2	$y = 0,0917x + 0,9033$	0,9868