

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

DARLENE GONÇALVES

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ACOPLADA A
VOLTAMETRIAS CÍCLICA E DE PULSO DIFERENCIAL NA ANÁLISE
DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE *Rosmarinus officinalis* Linné
(ALECRIM)**

Goiânia-GO

2010

DARLENE GONÇALVES

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ACOPLADA A
VOLTAMETRIAS CÍCLICA E DE PULSO DIFERENCIAL NA ANÁLISE
DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE *Rosmarinus officinalis* Linné
(ALECRIM)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Co-Orientador: Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição

Goiânia – GO

2010

DARLENE GONÇALVES

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA ACOPLADA A
VOLTAMETRIAS CÍCLICA E DE PULSO DIFERENCIAL NA ANÁLISE
DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE *Rosmarinus officinalis* Linné
(ALECRIM)**

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eric de Souza Gil
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Goiás-UFG

Prof. Dr. Flávio Colmatti
Instituto de Química
Universidade Federal de Goiás – UFG

Profa. Dra. Dâmaris Silveira
Universidade de Brasília-UnB

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus, por me iluminar e me dar forças para seguir sempre e jamais desistir.
- Ao professor Dr. Eric de Souza Gil, pela orientação e apoio e amizade.
- Ao colega e amigo, professor Dr. Edemilson Cardoso da Conceição pelas dicas e orientação.
- Ao colega e parceiro Renê, pelas colaborações, dicas valiosas e paciência que sempre teve em me passar um pouco do seu conhecimento. Deixo aqui também, minha admiração por esse garoto brilhante e de futuro promissor.
- Aos jovens colegas que, através do convívio, me mostraram que nunca é tarde para aprender.
- À colega e companheira Núsia que dividiu comigo um pouco das dificuldades dessa nova conquista.
- À funcionária Fernanda Bellato pela atenção e carinho com que atende a todos os alunos deste programa.

“O conhecimento exige uma presença curiosa
do sujeito em face do mundo. Requer uma
ação transformadora sobre a realidade.
Demanda uma busca constante. Implica em
invenção e em reinvenção.”

Paulo Freire

RESUMO

Esse estudo apresenta um método eletroanalítico em estado sólido para identificação e quantificação do ácido rosmarínico (AR), um fitoantioxidante de grande interesse pelas vantagens terapêuticas e aplicabilidade nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica; após isolamento do mesmo de amostras de *Rosmarinus officinalis* Linné (alecrim), através de cromatografia em camada delgada (CCD), onde utilizou-se a sílica contendo o analito isolado (mancha da cromatografia) raspada da cromatoplaça, para a elaboração de eletrodos de pasta de carbono; os quais foram submetidos a análises por voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD). O método proposto demonstrou excelente potencial analítico, baixo custo, rapidez, facilidade de execução e linearidade; o qual pode ainda ser aplicado a outros fitoantioxidantes em práticas de controle de qualidade de fitoterápicos, contribuindo na avaliação e garantia da qualidade dos mesmos.

Palavras-chave: Controle de qualidade, Eletrodos modificados, Fitoantioxidantes, Eletroquímica.

ABSTRACT

This study shows a solid-state electroanalytical method for identification and quantification of rosmarinic acid (RA), a phytoantioxidant of great interest for its therapeutical advantages and applicability in food, cosmetics and pharmaceuticals areas; after it had been isolated from *Rosmarinus officinalis* Linné (rosemary) samples through thin layer chromatography (TLC), then the silica containing the isolated analyte (chromatographic stain) scraped from chromatographic plates was used to prepare carbon paste electrodes, which were subjected to analysis by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The proposed method showed excellent analytical potential, low cost, speed, ease of implementation and linearity, which can also be applied to other phytoantioxidants in quality control practices of herbal drugs, contributing to the evaluation and quality assurance of them.

Key words: Quality control, Modified electrodes, Phytoantioxidants, Electrochemistry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1.1.1	Ação Antioxidante.....	19
1.1.2	Antioxidantes naturais.....	20
1.1.2.1	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Alecrim).....	22
1.1.2.2	O ácido rosmarínico.....	24
1.1.3	Determinação quantitativa do ácido rosmarínico.....	26
1.1.4	Métodos Eletroquímicos.....	28
1.1.4.1	Técnicas voltamétricas.....	31
1.1.4.1.1	<i>Voltametria cíclica.....</i>	<i>33</i>
1.1.4.1.2	<i>Voltametria de pulso diferencial.....</i>	<i>34</i>
1.1.4.2	Eletrodo de pasta de carbono /Eletrodo quimicamente modificado....	35
1.1.5	Cromatografia em camada delgada como método analítico.....	38
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	Amostras.....	41
3.2	Padrões e reagentes.....	41
3.3	Condições adequadas de ensaio.....	42
3.4	Preparo dos extratos.....	42
3.5	Cromatografia em camada delgada.....	42
3.6	Preparo dos EPCs.....	43
3.7	Medidas eletroquímicas.....	43
3.8	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	44
3.9	Parâmetros preliminares de validação.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	Avaliação de algumas condições de ensaio.....	46
4.2	Extratos das amostras em pó.....	47
4.3	Isolamento do analito por CCD.....	50

4.4	Preparo dos EPCs.....	51
4.5	Medidas eletroquímica.....	53
4.6	Estudo preliminar de validação.....	60
5	CONCLUSÃO.....	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas do ácido carnósico (A), sesamol(B), e ácido rosmarínico(C).....	22
Figura 2 - Figura 2: Formação de ressonância, semiquinona e quinona na molécula de AR, após eliminação de hidrogênio.Adaptado de CAO et al., 2005..	25
Figura 3 - Esquema simplificado para uma reação de oxidação-redução numa superfície de eletrodo. Adaptado de BRETT e BRETT, 1996.....	29
Figura 4 - Representação esquemática de instrumentação para voltametria.....	31
Figura 5 - Intervalo de potencial para os tipos de eletrodos mais utilizados,em vários eletrólitos suporte. (Adaptado de SKOOG et al., 2002).....	32
Figura 6 - Oxidação da água ou redução do H ₂ ocorrem em potenciais que podem variar dependendo do material do eletrodo.....	33
Figura 7 - Formato de onda em voltametria cíclica e esboço de um voltamograma cíclico, representando um ciclo de varredura completo.....	33
Figura 8 - Esquema de aplicação do impulso (1) e de voltamograma em forma de pico, característico de VPD (2).....	35
Figura 9 - Representação esquemática dos elementos básicos de um eletrodo de trabalho de pasta de carbono. Adaptado de Gil, 2010.....	36
Figura 10 - Representação esquemática da pasta de carbono, sendo visão tridimensional, visão superior – plano horizontal (A) e lateral-plano vertical (B)....	37
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos de pastas elaborados com sílica raspada de cromatoplasmas de alumínio correspondente ao AR, após extração por decocção sob refluxo (azul), ultrassom (vermelho) e agitação mecânica (preto). KCl 0,1 molL ⁻¹ pH7,0.KCl 0,1 molL ⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.....	47
Figura 12 - Cromatoplasmas com manchas características de diferentes concentrações de padrão de ácido rosmarínico, sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$ (A) e manchas características de padrões de ácido rosmarínico(AR) e cafeico (AC); extratos de Rosmarinus officinalis sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$, após eluição em cromatoplasma de alumínio e fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno (B).....	50
Figura 13 - Cromatoplasmas com manchas características de padrão de ácido rosmarínico e cafeico, e extrato de amostra autêntica de Rosmarinus officinalis,sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$, após eluição estendida (18cm) em cromatoplasma de vidro e fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno (B).....	51

- Figura 14 - Cromatoplasmas com manchas raspadas para construção de curva padrão de ácido rosmarínico (P1, P2, P3, P4, P5) e branco (sílica sem padrão ou amostra), após eluição em fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno..... 51
- Figura 15 - Representação esquemática do acondicionamento da pasta de carbono no eletrodo de trabalho..... 52
- Figura 16 - Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pastas de carbono modificados com manchas de CCDs contendo a mesma concentração de amostra de *Rosmarinus officinalis*, variando o aglutinante da pasta. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 53
- Figura 17 - Voltamograma cíclico realizado em EPC preparado com material recolhido de placa de vidro, após várias leituras (scans). KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 55
- Figura 18 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com EPCs preparados com manchas obtidas de placas de alumínio e vidro, numa mesma concentração de padrão de AR. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV..... 56
- Figura 19 - Voltamograma cíclico de eletrodos brancos elaborados com sílica raspada da cromatoplasma de alumínio (vermelho) e vidro (preto), sem a presença do analito. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 57
- Figura 20 - Voltamograma cíclico de pasta de carbono preparada com mancha de CCD contendo padrão de ácido rosmarínico mostrando dois picos reversíveis de oxidação/redução, sendo um de ácido rosmarínico (pico 1) e outro de fluoresceína (pico 2). KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 57
- Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial e cíclico, de padrão de AR em estado líquido com eletrodo de carbono vítreo. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹, amplitude pulso 50mV e -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 58
- Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial e cíclica de eletrodos de pasta de carbono preparada com raspado de cromatoplasma sem amostra ou padrão (branco). KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV e -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 58
- Figura 23 - Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pasta de carbono preparados com AR isolados e raspados de cromatoplasma de vidro confeccionada sem fluoresceína. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 59
- Figura 24 - Voltamogramas cíclico e de pulso diferencial do ponto mais concentrado da curva padrão (0,8mg/ml) de AR, em EPC modificados com manchas de cromatoplasmas de alumínio, mostrando a ausência do segundo

pico. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV e -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹ 60

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos de diferentes fitoantioxidantes em solução, obtidos com eletrodo de carbono vítreo KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹ 60

Figura 26 - *Cromatografia de camada delgada de diferentes amostras, observadas sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$; sendo (1) Rosmarinus officinalis fornecedor B, (2) R. officinalis do fornecedor A, (3) R.officinalis do fornecedor C, (4) Melissa officinalis, (5) Origanum vulgaris, (6) Apeiba tibourbou, (7) tintura comercial de R.officinalis do fornecedor I, (8) tintura comercial de R. officinalis do fornecedor II, (9) extrato fluido concentrado de R. officinalis , (10) extrato fluido concentrado de Apeiba tibourbou e (11) padrão de ácido rosmarínico.....* 62

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de amostras de extratos dos pós de Rosmarinus officinalis - alecrim de diferentes fornecedores (A e C), R. officinalis - alecrim produzida no LPPN (B); Melissa officinalis -melissa e Origanum vulgari-orégano. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹ 62

Figura 28 - Voltamogramas cíclicos de diferentes amostras comerciais (tinturas de Rosmarinus officinalis dos fornecedores I e II) e amostras preparadas no LPPN (extratos concentrados de Rosmarinus officinalis -alecrim e Apeiba tibourbou -apeiba. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹ 63

Figura 29 - Voltamograma de pulso diferencial de EPC modificado com extrato concentrado de alecrim, após isolamento por CCD em cromatoplaça de vidro. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV 64

Figura 30 - Curva Padrão obtida a partir de voltametria de pulso diferencial para pastas elaboradas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico (0,05mg.L⁻¹ a 0,8mg.L⁻¹). KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso 50 mV 65

Figura 31 - Curva padrão obtida a partir de voltametria cíclica para pastas elaboradas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico – primeiro pico (0,05mg.L⁻¹ a 0,8mg.L⁻¹). KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹ 65

Figura 32 - Curva padrão de ácido cafeico, e correspondentes voltamogramas, obtida em placas de alumínio. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV 66

Figura 33 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhidos de CCDs realizadas em placas de alumínio, e lidos imediatamente após isolamento da fração cromatográfica contendo AR (- - -) e com a pasta devidamente acondicionada em geladeira após 7 (____) e 30 (. . . .) dias . KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV 68

- Figura 34 - Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhidos de CCDs realizadas em placas de vidro, e lidos imediatamente após isolamento da fração cromatográfica contendo AR (azul) e com a pasta devidamente acondicionada em geladeira após 7 dias (preto) . KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹..... 68
- Figura 35 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos de materiais raspados de CCDs realizadas em placas de vidro na mesma concentração, sendo que um foi preparado um dia após a realização da cromatografia (vermelho) e o outro, após uma semana, sem nenhum cuidado de conservação (preto). Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mv..... 69
- Figura 36 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhido de placas de vidro, com diferentes eletrólitos suporte: KCl 0,1M pH7,0 (vermelho), Na₂SO₄. 0,1M pH7, (preto) e NaCl 0,1M pH7 (azul). Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 m..... 69
- Figura 37 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhido de placas de vidro, com diferentes pHs: pH5,0 (preto); pH 7,0 (vermelho) e pH 8,0 (verde). Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mv..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais variáveis envolvidas no método CCD-VC/VPD: V = volume aplicado à cromatoplaça; T _h = Tempo de homogeneização da pasta; T _a = Tempo de acondicionamento do eletrodo no eletrólito suporte.....	46
Tabela 2 - Avaliação dos métodos de extração de ácido rosmarínico em amostra de pó das folhas de alecrim, através do método CCD-VC/VPD em cromatoplaças de vidro.....	48
Tabela 3 - . Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial 3 ² (Box Behnken) da extração assistida por ultrassom de AR em amostra de alecrim...	48
Tabela 4 - Planejamento factorial 3 ² (Box Behnken) e respectivos valores de ácido rosmarínico.....	49
Tabela 5 - Ajuste dos parâmetros para VPD.....	54
Tabela 6 - Correntes de pico anódico (E _{pa}) e catódico (E _{pc}) para diferentes fitoantioxidantes. Voltametria cíclica, eletrodo de carbono vítreo, KCl 0,1 molL ⁻¹ pH 7,0.....	61
Tabela 7 - Concentrações de AR calculadas com base na curva padrão em diferentes amostras vegetais determinadas por CCD-VPD.....	67
Tabela 8 - Taxas de recuperação para método proposto (CCD-DPV) frente a método CLAE obtidos na análise de diferentes amostras de tintura de alecrim	67

LISTA DE ABREVIACÕES

ABTS ⁺	2,2'-azino-di[3-etil-benzotriazolina sulfonato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	cido rosmarínico
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CCD	Cromatografia de camada delgada
CE	Counter electrode – contra eletrodo ou eletrodo auxiliar.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de varia
DME	Drop Mercury electrode – eletrodo gotejante de mercúrio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2,-difenil-1-picril-hidrazil
E _{1/2}	Potencial de meia onda
E _a	Potencial anódico
E _c	Potencial catódico
ELP	Extra com líquido pressurizado.
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
FTC	Teste do ferrotiocianato férrico
HMDE	Eletrodo de gota pendente de mercúrio
HPTLC	High performance thin layer chromatography – cromatografia de camada delgada de alta eficiência.
IL	Ionic liquid – Líquido lnico
I _{pa}	Corrente de pico anódico
I _{pc}	Corrente de pico catódico
LD ₅₀	Dose letal
LMWA	Low molecular weight antioxidant.
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal de Goiás.
OMS	Organiza Mundial de Saúde

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Reference electrode – eletrodo de referência
ROS	Reactive oxygen species – espécies de oxigênio reativo
SCE	Saturated calomelan electrode – eletrodo de calomelano saturado
$t_{1/2}$	Tempo de vida médio
TAS	total antioxidant status – estatus antioxidante total
TBARS	Teste do ácido 2-tiobarbitúrico
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity – capacidade antioxidante equivalente ao trolox
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
WE	Work electrode – eletrodo de trabalho
WEPO	Water extraction and particle formation on line – extração por água e formação de partículas “on line”.

1. INTRODUÇÃO

Existe uma tendência mundial na busca por antioxidantes naturais devido aos vários benefícios atribuídos a esses compostos na área terapêutica, alimentícia e cosmética (TAWAHA et al., 2007; GENENA et al., 2008), o que tem gerado várias pesquisas de novos compostos e expectativas quanto a descobertas de alternativas aos antioxidantes sintéticos usados atualmente (MARIUTTI ; BRAGAGNOLO, 2007; MATKOWSKI, 2008).

O *Rosmarinus officinalis* Linné (alecrim), uma planta da família Lamiaceae, tem atraído muita atenção dos pesquisadores como fonte de fitoantioxidantes e seu extrato possui efeitos superiores ou semelhantes aos dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, ação essa, atribuída aos seus princípios ativos, dentre eles, o ácido rosmarínico (AR).

O AR é um éster do ácido caféico e ácido 3,4-dihidroxifenilático, comum nas Boraginaceae e na subfamília Nepetoideae das Lamiaceae (MATKOWSKI, 2008), com várias propriedades biológicas e usos que se devem à sua atividade como anti-retroviral (DUBOIS et al., 2008), antiinflamatório (OSAKABE et al., 2004), antidepressivo (TAKEDA et al., 2002), anti-angiogênico (HUANG; ZHENG, 2006), hepatoprotetor (OSAKABE et al., 2002), anti-mutagênico (AL-SEREITI et al., 1999), antibacteriano, além de ser um dos mais eficientes antioxidantes naturais (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; TEPE, 2008). Estudos recentes demonstraram sua atividade como agente fotoprotetor contra radiações ultravioleta (SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009) e como indutor da melanogênese através da ativação da proteína quinase A, sendo assim sugerido como um possível agente terapêutico para doenças despigmentantes como o vitiligo (LEE et al., 2007). Existe uma ampla gama de aplicações do AR, justificadas por sua ação antioxidante e conservante de alimentos, cosméticos e medicamentos (AL-SEREITI et al., 1999).

A identificação e quantificação de marcadores vegetais como o AR são importantes para se assegurar a autenticidade e qualidade das matérias-primas vegetais, e no caso dos fitoantioxidantes, a eficácia do produto (REIS et al., 2009). O AR tem sido analisado através de métodos, embora precisos, dispendiosos, complexos e demorados como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009). Dado sua aplicação terapêutica, o interesse por métodos alternativos tem crescido e inclui a eletroforese capilar ou mais

recentemente, o uso de biossensores (SANTHIAGO et al., 2008; FRANZOI et al., 2009), técnicas que apesar de rápidas, baixo custo e de pouco impacto ambiental, são difíceis de serem executadas.

A cromatografia em camada delgada é uma técnica analítica bastante conhecida e utilizada em laboratórios do mundo todo; é o método de escolha para separação de várias amostras quando se requer dados qualitativos em curto espaço de tempo, simples, de baixo custo e rápida, pois os extratos podem ser usados diretamente, sem necessidade de purificação prévia (JANIKSÁK; MATHÉ, 1997), e é considerada uma técnica com resultados quantitativos bastante confiáveis, dependendo do método de detecção utilizado (MENDHAM et al., 2002; SCHIBILI; REICH, 2005).

Os métodos eletroanalíticos pertencem a um grupo de métodos analíticos quantitativos que se baseiam nas propriedades elétricas de uma solução contendo a espécie de interesse (analito) quando este faz parte de uma célula eletroquímica. Assim, a transferência de elétrons ocorre na superfície do eletrodo, sendo dependente do meio, ou da solução eletrolítica, e do material do eletrodo. De modo geral, apresentam características analíticas adequadas, como viabilidade, boa seletividade, exatidão, alta sensibilidade, assim como baixos custo e impacto ambiental (baixo consumo de reagentes) (CANELAS; COSTA, 2007; REIS et al., 2009). Dentre as técnicas mais difundidas destacam-se as voltametrias cíclicas e de pulso diferencial (CANELAS; COSTA, 2007; REIS et al., 2009). Deste modo, os métodos eletroquímicos apresentam grande aplicabilidade analítica ao estudo dos fitoantioxidantes, já que estes são espécies eletroativas. Estes métodos são considerados mais seletivos e sensíveis que os métodos espectrométricos e mais reprodutíveis que os métodos biológicos xantina oxidase e peroxidação lipídica (RAPTA et al., 1995; CORSINO et al., 2003).

O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (EQMs) baseia-se em geral no uso de espécies que apresentem alguma resposta ou afinidade específica a determinado tipo de analito. Um grupo destes eletrodos bastante difundido por sua simplicidade e versatilidade é o grupo dos eletrodos de pasta de carbono (EPC) (GIL et al., 2006). Por sua vez, a modificação de eletrodos de pasta de carbono com proporções exatas da espécie eletroativa de interesse pode, segundo a Lei de Faraday, fornecer dados qualitativos e quantitativos (CANELAS; COSTA, 2007; REIS et al., 2009).

Devido à complexidade química de amostras vegetais, uma alternativa para se obter compostos isolados, seria proceder a uma separação prévia (ANDRADE et al., 2007). Neste contexto, a cromatografia em camada delgada é uma alternativa simples, rápida e de baixo custo, que pode ser utilizada para se obter um analito específico. Existem na literatura diversos trabalhos apresentando técnicas envolvendo o acoplamento desta técnica com diferentes métodos de detecção (GOODRICH; BURREL, 1982; NICOLA et al., 1996; SHAW et al., 1997; MORAES et al., 2002), incluindo métodos eletroanalíticos, principalmente na determinação quantitativa de íons metálicos (PETROVIC et al., 1998; SUN; MIRKIN, 2008). Em contrapartida, ainda não foram realizados estudos contemplando o emprego destas duas técnicas acopladas na determinação dos teores de espécies eletroativas em matrizes complexas como insumos fitofarmacêuticos.

Neste estudo, apresenta-se um método eletroanalítico em estado sólido, para análise quantitativa do fitoantioxidante ácido rosmarínico (AR), isolado por cromatografia em camada delgada (CCD), em amostras de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), onde a sílica contendo ácido rosmarínico (mancha cromatográfica), raspada da cromatoplaça, é utilizada no preparo de eletrodos de pasta de carbono (EPCs) os quais são analisados por voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (VC), e através dos voltamogramas obtidos determinam-se as concentrações deste marcador nas amostras analisadas. Faz-se também, um estudo de alguns parâmetros preliminares de validação.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Ação antioxidante

As células estão diariamente enfrentando situações internas e externas que ameaçam seu equilíbrio fisiológico e o próprio processo de respiração mitocondrial, agentes poluentes e radiações ionizantes colocam as células diante de radicais livres ou espécies de oxigênio reativo (reactive oxygen species – ROS), o que pode levar as mesmas a um “stress” oxidativo quando a exposição é excessiva, ou quando os mecanismos de defesa internos falham ou diminuem (CHEVION et al., 2000).

Por serem capazes de inibir ou retardar a oxidação de certas substâncias, mesmo em concentrações pequenas, os antioxidantes são de grande interesse para a indústria alimentícia, pois inibem, previnem ou retardam a peroxidação lipídica (rancificação) e para a saúde, pois protegem contra os danos causados pelos radicais livres e ROS, nas proteínas, DNA e lipídios dos tecidos vivos (HALLIWELL et al., 1995; HALLIWELL, 2007; MATKOWSKI, 2008).

De acordo com o modo de ação, os antioxidantes podem ser considerados primários, quando atuam na redução direta dos radicais livres (e.g. compostos fenólicos); ou secundários (e.g. ácido ascórbico, ácido cítrico) quando inibem, retardam ou previnem a formação dos radicais livres por mecanismos diferentes, como a ligação com íons metálicos, redução de oxigênios reativos, absorção de radiação ultravioleta, inibição enzimática ou desativação de oxigênio “singlet” (HALLIWELL et al., 1995; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; HALLIWELL, 2007). Um antioxidante ainda pode agir elevando a expressão de genes codificadores de superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase aumentando os níveis de defesas endógenas (HALLIWELL et al., 1995).

Existem os antioxidantes naturais e os sintéticos, sendo que os últimos têm emprego restrito por serem considerados causadores de toxicidade a longo prazo, inclusive carcinogênese; como o exemplo do butilhidroxianisol (BHA), um poderoso antioxidante, por apresentar rápida doação de hidrogênio para os radicais livres, que em altas doses via oral, causa câncer em estômago de ratos; fato que tem levado a um crescente interesse pela busca por antioxidantes naturais, principalmente para aplicação em alimentos e medicamentos (HALLIWELL et al., 1995; ARUOMA, 2003;

ALBU et al., 2004; CAO et al., 2005; TRONCOSO et al., 2005; ERKAN et al., 2007; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; MATKOWSKI, 2008). Esse interesse se estende aos métodos de isolamento e comprovação da atividade de tais substâncias (KOROTKOVA et al., 2003).

Para medir o poder de um antioxidante, podem ser usados métodos espectrométricos, biológicos (xantina oxidase, peroxidação lipídica) ou eletroquímicos (voltametria, coulometria), sendo que os dois primeiros apresentam desvantagens, pois requerem o uso de reagentes específicos e preparação demorada das amostras e reagentes (COSIO et al., 2006; REIS et al., 2009).

Os métodos espectrofotométricos mais utilizados na rotina laboratorial são divididos em dois grupos: os que avaliam a habilidade em seqüestrar radicais livres, e os que testam a habilidade de inibir a oxidação lipídica. Os do primeiro grupo utilizam radicais específicos (DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; ABTS⁺: 2,2'-azino-di[3-etil-benzotriazolina sulfonato]) (COSIO et al., 2006; MARTINEZ et al., 2006; ERKAN et al., 2008) e são exemplos do segundo grupo o teste (FTC) do ferrotiocianato férrico e (TBARS) do ácido 2-tiobarbitúrico (SILVA et al., 1999; COSIO et al., 2006; MARTINEZ et al., 2006; ERKAN et al., 2008; SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009; HERNANDÉZ-HERNANDÉZ et al., 2009).

As técnicas eletroquímicas apresentam grande potencial para caracterização de fitoantioxidantes por que fornecem parâmetros físico-químicos capazes de mostrar não apenas o potencial redox, mas também números de elétrons envolvidos (n) na etapa de transferência de carga, os mecanismos dessas transferências e a influência de prótons, constante de reação, etc.; além de serem técnicas mais rápidas que as demais citadas anteriormente (COSIO et al., 2006; BARA et al., 2008; REIS et al., 2009).

1.1.2 Anti-oxidantes naturais

O interesse por produtos naturais tem crescido muito e ainda hoje, grande parte da população mundial faz uso de plantas para tratamento e prevenção de doenças, o que demonstra que os recursos naturais continuam sendo fonte importante de substância com grande potencial terapêutico, como no caso dos produtos antioxidantes presentes nos chás, sucos e vegetais que protegem contra doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças degenerativas relacionadas ao

envelhecimento, cujas etiologias têm sido relacionadas ao “stress” oxidativo (RICE-EVANS et al., 1996; OMS, 2002; JUSTO et al., 2008).

Estudos já demonstraram que alguns extratos vegetais são tão eficientes quanto os antioxidantes sintéticos e, agem efetivamente contra os fatores que danificam o sistema vascular; sendo que a maioria apresenta poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade (KOROTKOVA et al., 2003; HERNANDÉZ-HERNANDÉZ et al., 2009).

Os compostos fenólicos de origem vegetal têm merecido grande atenção como antioxidantes naturais (RICE-EVANS et al., 1995; MATKOWSKI, 2008), os quais podem atuar como antioxidantes primários ou secundários, contribuindo para as ações anticarcinogênica e cardioprotetora (RICE-EVANS et al., 1995; PENG et al., 2005a).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas e originam principalmente da via do ácido chiquímico através dos ácidos carboxílicos aromáticos, cinâmico ou benzóico, sendo que os mais potentes como antioxidantes são os flavonóides (flavanóis, proantocianidinas, flavonas e flavonóis), ácidos fenólicos (caféico e derivados), lignanas, taninos hidrolisados (galotaninos e elagitaninos), estilbenos e xantonas (HARBONE, 2001; MATKOWSKI, 2008).

Para um polifenol ser considerado um antioxidante, precisa satisfazer algumas condições: primeiro, quando presente mesmo em pequena concentração tem que ser capaz de impedir, diminuir ou retardar a autooxidação ou a oxidação mediada por radicais livres e, segundo, o radical resultante deve ser estável (RICE-EVANS et al., 1995).

A atividade antioxidante de compostos naturais depende não apenas da quantidade de estruturas moleculares específicas presentes, mas também de fatores estruturais destas moléculas, tais como do número e posições de hidroxilas fenólicas, grupos metoxila, insaturações, etc.; e durante a reação destes compostos, novas espécies de radicais são geradas e devem ser estabilizadas por ressonância (RICE-EVANS et al., 1995; COSIO et al., 2006).

No estudo desenvolvido por Erkan et al., 2008, o potencial antioxidante, no teste de DPPH do AR foi menor que do sesamol, que foi menor que do ácido carnósico (Figura 1); sendo que o ácido carnósico possui duas hidroxilas fenólicas, o sesamol possui uma e o AR possui quatro; confirmando o estudo anterior de Rice-Evans et al., 1996, que mostrou que o número de hidroxilas fenólicas presentes na

molécula de um antioxidante nem sempre é o único fator determinante do seu potencial. As posições dos grupos –OH, presença de outros grupos funcionais na molécula, tais como duplas ligações e suas conjugações com grupos –OH e grupos cetônicos, também desempenham importante papel na atividade antioxidante (RICE-EVANS et al, 1996; ERKAN et al., 2008).

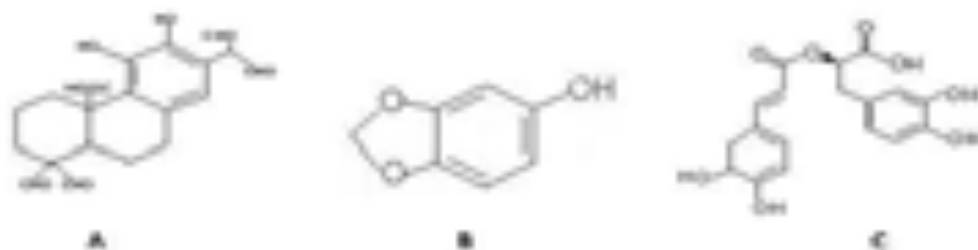


Figura 1. Estruturas químicas do ácido carnósico (A), sesamol(B), e ácido rosmarínico (C).

1.1.2.1 *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim)

Vários extratos de plantas têm atraído a atenção de pesquisadores como fontes de antioxidantes naturais, e dentre eles o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é um dos mais estudados (DEL-BAÑO et al., 2003; CELIKTAS et al., 2007; GENENA et al., 2008; JUSTO et al., 2008).

O alecrim é mundialmente conhecido como condimento e planta medicinal, pertencente à família Lamiaceae, a qual possui 150 gêneros e aproximadamente 3500 espécies. É um arbusto perene de cerca de 50 a 150 cm de altura, nativo da região do Mediterrâneo e Portugal onde é cultivado, além da região do Cáucaso, regiões central e sul da Ásia, África do Sul, Austrália e Estados Unidos (HEATH, 2000; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; JUSTO et al., 2008).

A indicação e uso do alecrim foram aprovados pela comissão “E” alemã, a qual combina estudos científicos e conhecimentos tradicionais, e o mesmo é indicado para problemas de pressão arterial, equilibrando a mesma, pois auxilia a boa circulação; para complicações dispépticas, perda de apetite e reumatismo, mas na medicina popular é usado também contra problemas digestivos, dor de cabeça e enxaqueca, dismenorréia, amenorréia, estados de exaustão, tontura e perda da memória; topicamente para tratamento de eczemas, afecções na boca e garganta, para mialgias e dores ciáticas (HEATH, 2000). Seu óleo essencial e extrato são

usados como antiinflamatório, antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antimutagênico, hepatoprotetor, diurético, mucolítico, anticonvulsivo e estimulante (DEL-BAÑO et al., 2003; GENENA et al., 2008; JUSTO et al., 2008). Na indústria de alimentos, seus efeitos antioxidativos têm se mostrado superiores aos do BHA e semelhante ao do BHT. Comercialmente tem sido usado em combinação com tocoferóis e BHA mostrando sinergismo (JUSTO et al., 2008).

Os principais compostos polifenólicos com atividade antioxidante isolados do alecrim podem ser divididos em três grupos principais: ácidos e ésteres hidroxycinâmicos (derivados caféicos), flavonóides (hispidulina, cirsimarina, apigenina, genkwanina, luteolina, naringenina) e diterpenos fenólicos (ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epi e iso-rosmanol) (DEL-BAÑO et al., 2003; ALBU et al., 2004; LUIS; JOHNSON, 2005; CELIKTAS et al., 2007; JUSTO et al., 2008; GENENA et al., 2008).

O óleo essencial extraído do alecrim possui composição química que varia de acordo com a procedência geográfica, parte da planta utilizada e etapa do desenvolvimento no momento da colheita, o que caracteriza diferentes quimiotipos, sendo que estes são determinados de acordo com a concentração de monoterpenos. Os principais são os quimiotipos cineolíferos (alta porcentagem de 1,8-cineol como os originários de Marrocos e Tunísia), canforíferos (aqueles com mais de 20% de cânfora como os quimiotipos T3, T11 e T14) e verbenoníferos (aqueles com mais de 15% de verbenona) (CENTENO, 2002).

Dentre os princípios ativos, são considerados principais antioxidantes os ácidos carnósico (hidrofóbico) e rosmarínico (hidrofílico), sendo que 90% da atividade antioxidante do alecrim é atribuída ao ácido carnósico; contudo este composto é bastante instável e encontrado em menor quantidade no extrato (6% enquanto o AR, 8%) (LUIS; JOHNSON, 2005; JUSTO et al., 2008; ERKAN et al., 2008).

Segundo Erkan et al., 2008, o ácido carnósico tem potencial antioxidante maior que o AR; porém no estudo desenvolvido por Luis e Johnson, 2005, a concentração de ácido carnósico diminuiu até 50% nos meses mais quentes e secos do verão britânico, com recuperação das concentrações no outono; já os índices de AR mostraram pouca variação durante todo o ano (DEL-BAÑO et al., 2003).

O AR no alecrim é encontrado nas folhas, ramos e raízes; de acordo com a teoria de que ácidos e ésteres hidroxycinâmicos, flavonóides e antocianidinas são

sintetizados pela via fenilpropanóide que ocorre no citosol; enquanto nas sépalas e pétalas em menor quantidade; ou seja, o AR é encontrado em todas as partes do alecrim. O ácido carnósico é encontrado apenas nas folhas, sépalas e pétalas, também confirmando a teoria de que os diterpenos são sintetizados pela via do difosfato de isopentenila ocorrendo nos cloroplastos (LUIS; JOHNSON, 2005). Apenas as folhas contêm todos os principais componentes e em maior concentração na primeira fase do desenvolvimento destas (DEL-BAÑO et al., 2003)

A atividade antioxidante do alecrim depende da sua composição fenólica, e em sistemas lipídicos, extratos com altas concentrações de diterpenos são mais efetivos, enquanto que em sistemas aquosos, altas concentrações de AR demonstram maior atividade antioxidante (DEL-BAÑO et al., 2003; LUIS; JOHNSON, 2005).

A concentração de AR pode estar relacionada ao mecanismo de defesa da planta, principalmente reação a patógenos e herbívoros (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; DEL-BAÑO et al., 2003; LUIS; JOHNSON, 2005; CELIKTAS et al., 2007; JUSTO et al., 2008)

1.1.2.2 O ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico (AR) foi isolado pela primeira vez por Scarpatti e Oriente em 1958 a partir do *Rosmarinus officinalis* L., de onde recebeu o nome; (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; TÓTH et al., 2003).

Sua estrutura foi elucidada como sendo um éster dos ácidos caféico e 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico. Ele ocorre em toda família das Boraginaceae e na subfamília Nepetoideae das Lamiaceae, mas também em outras famílias de plantas, logo, sua ocorrência não pode ser usada como um marcador quimiotaxonômico (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; TÓTH et al., 2003).

O AR é um composto fenólico natural contendo dois anéis fenólicos nos quais, ambos, possuem dois grupos *hidroxil* na posição *orto*, há um grupamento carbonila, uma dupla ligação e um ácido carboxílico entre os dois anéis fenólicos (Figura 1) (CAO et al., 2005).

A ação antioxidante do AR está relacionada à sua estrutura, e o fato mais importante é a presença de duas estruturas o-dihidroxilfenol ou catecol conjugado a

um grupamento de ácido carboxílico (DEL BAÑO et al., 2003, SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

A atividade antioxidante do AR é resultante da reação de eliminação de hidrogênio (H-abstraction) e dos radicais livres formados serem estáveis (semiquinona e quinona): essa reação pode ocorrer primeiro na posição 2 do anel A (ou na posição 4' do anel B), formando uma semiquinona que tem as três estruturas de ressonância atuando para estabilizar o radical formado. Posteriormente, o átomo de hidrogênio da posição *orto* é retirado e a estrutura da quinona é formada. Logo, as principais atividades antioxidantes do AR são os dois grupos fenóis dos anéis e os radicais formados. O anel B é um doador de elétrons e o anel A pode estabilizar o radical formado (CAO et al., 2005) (Figura 2).

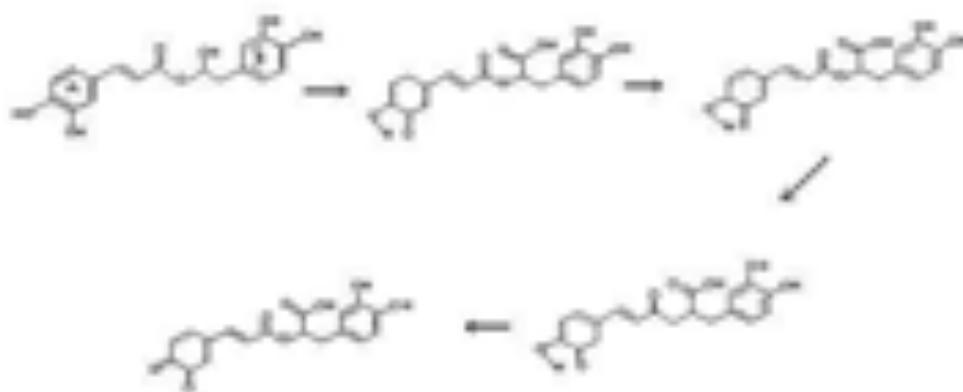


Figura 2: Formação de ressonância, semiquinona e quinona na molécula de AR, após eliminação de hidrogênio. Adaptado de CAO et al., 2005.

Alguns estudos mostram a grande capacidade do AR em captar radicais livres, e a sua capacidade antioxidante chega a mais de três vezes a do Trolox e pode inibir a atividade da xantina oxidase (CAO et al., 2005). Frente o teste de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), comparado à ação do ácido ascórbico é 3,6 vezes maior (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

Essa substância possui ampla atividade biológica, sendo as principais: adstringente, antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica, antibacteriana e antiviral (inibição do HIV e Herpes) e hepatoprotetor. A atividade antiinflamatória se dá pela inibição da lipoxigenase e cicloxigenase e interferência na cascata do complemento (PARNHAM; KESSELRING, 1985; PETERSEN; SIMMONDS, 2003; CAO et al., 2005).

Foi investigado o efeito sobre a pigmentação e o mecanismo molecular pelo qual o AR estimula a melanogênese e foi demonstrado que na verdade ele regula, elevando a expressão da enzima tirosinase (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009), e ao investigar as diferentes vias que envolvem a melanogênese, concluiu-se que ele ativa a via da proteína quinase A (LEE et al., 2007). O AR é considerado um protetor contra radiação ultravioleta (UV), e outras radiações ionizantes (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

O efeito protetor contra radiação e conseqüentemente a ação antimutagênica (ou antigenotóxica) do AR foi maior que do ácido ascórbico no teste de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

O uso de extratos de folhas de alecrim com altas concentrações de AR pode oferecer uma proteção suplementar contra problemas de pele causados pela radiação solar oferecendo proteção contra o stress oxidativo induzido pelos raios ultravioleta do tipo A (UVA); podendo ser benéficamente usado tanto via oral quanto em preparações dermatológicas (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

Quando utilizado via oral, o AR é rapidamente eliminado do sangue ($t_{1/2} = 9$ min.) e apresenta muito baixa toxicidade (LD_{50}) em ratos de 561 mg.Kg^{-1} após aplicação endovenosa (PARNHAM; KESSELRING, 1985); e inibe as alterações do fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese causadas pelos raios UVA em até 70% em ratos albinos da raça Swiss, quando expostos à 100 seções de exposição intensa à luz UVA (SANCHÉZ-CAMPILLO et al., 2009).

1.1.3 Determinação quantitativa do ácido rosmarínico

A legislação brasileira através da Resolução da Diretoria Colegiada nº 14 de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010) que preconiza dentre outras medidas para o registro de medicamentos fitoterápicos, a análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie; e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada pelo Ministério da Saúde em 2006, que tem como objetivo geral garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional;

exigem e ao mesmo tempo incentivam as buscas por métodos e técnicas para o controle de qualidade dos fitoterápicos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

Fatos como a inerente complexidade química, aliados a fatores extrínsecos como sazonalidade, aspectos agronômicos e climáticos; dificultam a padronização de produtos vegetais, levando ao questionamento da qualidade dos fitoterápicos. Deste modo, se torna evidente a necessidade de se monitorar a qualidade durante todo o processo (CALIXTO, 2000; SCHENKEL et al., 2004; BARA et al., 2006; REIS et al., 2009). Ressalta-se ainda que tanto a qualidade do produto “extrato vegetal”, quanto sua análise *per si*, é influenciada pela metodologia de extração, pois a mesma deve ser capaz de retirar do material a ser analisado, e em se focando o produto, o máximo de princípios ativos (JUSTO et al., 2008).

Neste contexto várias técnicas têm sido propostas e avaliadas para extração, *i.e.* métodos convencionais por solventes com ou sem aquecimento, extração por ultrassom (ALBU et al., 2004; ROLDÁN-GUTIERREZ et al.; 2008 PANIWNKY et al., 2009), hidrodestilação e hidrodifusão por microondas para obtenção do óleo essencial; e mais recentemente, extração com fluido supercrítico (EFS) (HERRERO et al., 2005; CELIKTAS et al., 2007; GENENA et al., 2008). Destaca-se ainda, o uso de métodos “verdes” como a extração com líquido pressurizado (ELP) que propõe a substituição de solventes orgânicos por água (HERRERO et al., 2010).

Dentre as várias técnicas de controle da qualidade de fitoterápicos, a cromatografia e demais métodos de separação merecem destaque (FAN et al., 2005), incluindo eletroforese capilar (HERRERO et al., 2005, BASKAN et al., 2007, PENG et al., 2005a; PENG et al., 2005b), cromatografia líquida de alta eficiência /CLAE (ALMELA et al., 2006; FECKA et al., 2007; FECKA; TUREK, 2007; KIVILOMPOLO; HYOTYLAINEN, 2007; THORSEN; HILDEBRANDT, 2003; WANG et al., 2004; TRONCOSO et al., 2005, WEN et al., 2005; CANELAS; COSTA, 2007; PENG et al., 2005a; PENG et al., 2005b) e cromatografia de camada delgada (JANICSÁK; MÁTHÉ, 1997; MENDHAM et al., 2002).

O AR é geralmente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual apresenta desvantagens como consumo de muito tempo com o preparo das amostras e desgaste das colunas, permitindo várias interferências (PENG et al., 2005a), caracterizando-se como um método oneroso no que diz respeito a equipamento e reagentes, e que demanda tempo relativamente grande

para otimização de parâmetros cromatográficos, tais como ajuste de melhor fase móvel e estacionária (TRONCOSO et al., 2005; ALMELA et al., 2006; CANELAS; COSTA, 2007; FECKA et al., 2007; FECKA; TUREK, 2007; KIVILOMPOLO; HYOTYLAINEN, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de técnicas que incrementem, agilizem e facilitem a rotina dos laboratórios, atendam as necessidades e às exigências legais; contribui para garantir à população um medicamento de qualidade (OLIVEIRA, 2005; BARA et al., 2006; REIS et al., 2009).

Sendo assim, os métodos eletroquímicos são uma excelente alternativa, visto que, são simples, rápidos e de baixo custo instrumental e de reagentes (PENG et al., 2005a; PENG et al., 2005b; CANELAS; COSTA, 2007; BARA, et al., 2008; REIS et al., 2009). Apresentam ainda a possibilidade de utilizar eletrodos quimicamente modificados e biossensores (THURSTON, 1994; CONSORTI et al., 2001; RICCARDI et al., 2002; MAYER; STAPLES, 2002; SANTHIAGO et al., 2008; FRANZOI et al., 2009).

1.1.4 Métodos Eletroquímicos

Eletroquímica é o ramo da química relativa ao estudo dos aspectos eletrônicos e elétricos das reações químicas; as reações eletroquímicas são caracterizadas pela transferência de elétrons, e os reagentes envolvidos, pelo número de elétrons que possuem.

Os métodos eletroanalíticos pertencem a um grupo de métodos quantitativos que baseiam nas propriedades elétricas de uma solução contendo a espécie de interesse (analito) quando este faz parte de uma célula eletroquímica (SKOOG et al., 2002); são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e várias informações úteis na elucidação de processos redox, incluindo estequiometria e velocidade de transferência de cargas e massa, a extensão de adsorção e de quimiosorção, bem como parâmetros físico-químicos como cinética e constantes de reações. Apresentam vantagens como simplicidade, sensibilidade e seletividade, normalmente empregam equipamentos de baixo custo, baixo impacto ambiental dado ao baixo consumo de reagentes (RAPTA et al., 1995; SKOOG et al., 2002; CORSINO et al., 2003; SERRANO et al., 2010).

A transferência de elétrons ocorre na superfície do eletrodo, sendo dependente do meio da solução eletrolítica e do material do eletrodo; sendo que eletrodo é o terminal (pólo ou transdutor) constituído de material condutor (metal nobre, grafite ou polímero condutor) utilizado para conectar um circuito elétrico a uma parte não metálica (solução), proporcionando a transferência eletrônica (transdução) entre o circuito e o meio no qual está inserido (SKOOG et al., 2002).

As reações eletroquímicas em uma célula eletrolítica ocorrem mediante passagens de cargas pelos eletrodos, seguem as leis do equilíbrio e da termodinâmica (superfície do eletrodo/solução) e dependem da concentração e natureza dos reagentes, tipo de transporte envolvido e outros fatores como temperatura e pressão (SERRANO et al., 2010).

Na superfície do eletrodo a reação acontece em etapas como o transporte de massas e a transferência de elétrons (Figura 3).

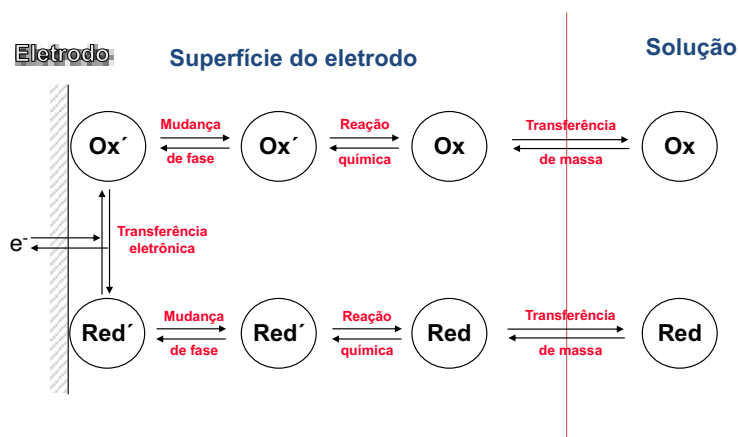


Figura 3: Esquema simplificado para uma reação de oxidação-redução numa superfície de eletrodo. Adaptado de BRETT; BRETT, 1996.

Enquanto a transferência eletrônica depende principalmente da natureza do material eletródico, o transporte de cargas e massas é bastante influenciado pelo eletrólito suporte. O eletrólito é uma substância que, quando dissolvida em um determinado solvente, produz solução com uma condutividade elétrica maior que a condutividade do solvente e em sistemas eletroquímicos o eletrólito suporte é aquele que adicionado em altas concentrações (cerca de cem vezes maior que a da espécie eletroativa) pode conferir à solução e à interface em estudo, uma série de propriedades que são resultantes da manutenção da força iônica alta e da constante

da solução, o que simplifica a análise dos sistemas eletroquímicos. Deve ter alta solubilidade, alto grau de ionização, ter estabilidade química (sua espécie química não pode reagir com outras espécies presentes na solução) e estabilidade eletroquímica (não ser oxidado nem reduzido em toda a faixa de potência de interesse) (AGOSTINHO et al., 2004).

São funções do eletrólito suporte: manter constantes os coeficientes de atividade das espécies eletroativas, a viscosidade da solução, o coeficiente de difusão da espécie eletroativa e o número médio de ligantes; tornar o número de transporte praticamente igual a zero, diminuir a espessura da dupla camada elétrica, aumentar a condutividade da solução e melhorar a cinética dos processos de eletrodo (a área eletroquímica ativa do eletrodo decresce com o aumento do tamanho do cátion do eletrólito suporte) (SKOOG et al., 2002; AGOSTINHO et al., 2004).

Os métodos eletroquímicos baseiam-se na detecção de propriedades elétricas das soluções, tais como corrente (I), resistência (R) e diferença de potencial (E), onde sabe-se que comportam-se de acordo com a equação 1:

$$E = R \cdot I \quad (1)$$

Em se tratando de fitoantioxidantes, os métodos eletroquímicos são muito usados na determinação do poder antioxidante de insumos vegetais eletroativos, tanto de substâncias isoladas quanto na forma de extratos. São em geral mais seletivos e sensíveis que os métodos espectrométricos e mais reprodutíveis que os métodos biológicos como xantina oxidase e peroxidação lipídica; além do preparo das amostras ser comumente mais simples e rápido, não requerendo muitas etapas na preparação (CHEVION et al., 2000; BARA et al., 2008; REIS et al., 2009). Por sua vez, as aplicações voltadas à determinação quantitativa de fitoantioxidantes específicos em fitoterápicos são limitadas pela inerente complexidade destas matrizes vegetais (JUSTO et al., 2008); o que justifica e requer a utilização de técnicas prévias de separação e/ou desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados mais seletivos ao analito alvo.

Dentre as técnicas eletroanalíticas para essa finalidade, destacam-se a voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e a coulometria.

1.1.4.1 Técnicas Voltamétricas

Compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais a informação sobre o analito é obtida através de medidas de corrente em função da perturbação de potencial aplicada ao eletrodo indicador ou de trabalho; e baseia-se na medida dessa corrente (faradaica) que surge na célula eletroquímica, decorrente do fluxo de elétrons da solução para o eletrodo (processo de oxidação) ou do eletrodo para a solução (processo de redução), a qual pode ser relacionada com a concentração da espécie de interesse que é passível de ser oxidada ou reduzida (espécie eletroativa) (SERRANO et al., 2010).

Os métodos voltamétricos surgiram em decorrência da existência de correlação linear, entre corrente anódica ou catódica gerada em determinado potencial respectivamente de oxidação ou redução, e a concentração da espécie analisada (SKOOG et al., 2002). O potencial (sinal de excitação) pode ser aplicado à célula eletroquímica de forma linear, cíclica ou pulsada. O modo de aplicação determina os diferentes tipos de voltametrias.

Em um sistema voltamétrico, a célula eletroquímica é constituída de três eletrodos: o eletrodo de referência (RE), eletrodo de trabalho (WE) e eletrodo auxiliar ou contra eletrodo (CE), os quais são imersos em uma solução contendo o analito e um excesso de eletrólito não reativo chamado eletrólito suporte. Esse sistema é então conectado a uma fonte de sinal e alimentado por um circuito (potenciostato/galvanostato) (Figura 4).

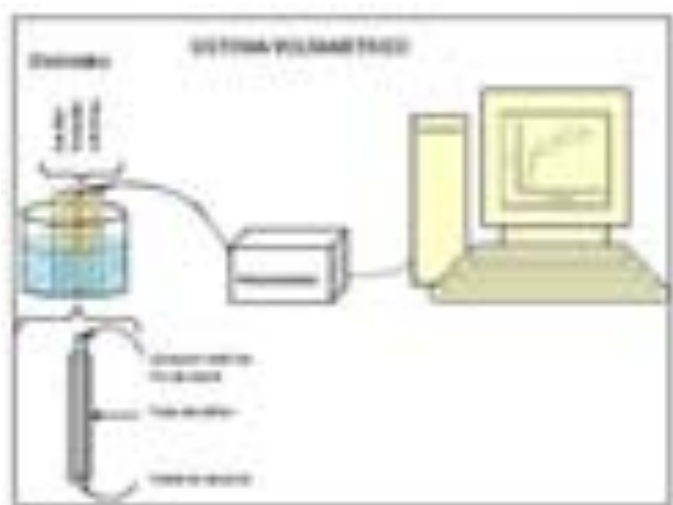


Figura 4: Representação esquemática de instrumentação para voltametria.

O potenciostato / galvanostato aplica uma diferença de potencial (d.d.p) constante, num intervalo de tempo constante, ao eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, e, em contrapartida, o aparelho lê a corrente circulante entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar (SKOOG et al., 2002).

O eletrodo de trabalho é onde as reações interfaciais (processos redox) em estudo ocorrem e são monitoradas. Pode ser de vários tipos diferentes de materiais como platina (Pt), ouro (Au), carbono (carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de carbono, fibra de carbono), mercúrio (eletrodo de gota pendente de mercúrio-HMDE, eletrodo gotejante de mercúrio-DME), biossensores (polímeros condutores) ou eletrodos íon-seletivos (ISE).

De acordo com o tipo de eletrodo utilizado o intervalo de potenciais que pode ser utilizado varia e depende não somente do material do eletrodo, mas também da composição da solução na qual está imerso (eletrólito suporte), conforme ilustrado na Figura 5.

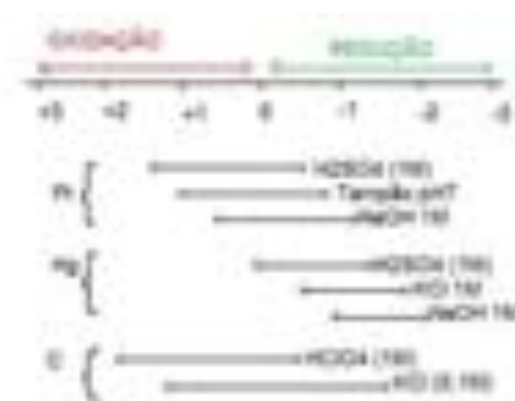


Figura 5: Intervalo de potencial para os tipos de eletrodos mais utilizados, em vários eletrólitos suporte. (Adaptado de SKOOG et al., 2002)

Geralmente as limitações do potencial positivo são causadas pelas grandes correntes desenvolvidas devido à oxidação da água para gerar oxigênio molecular e os limites negativos vêm da redução da água para liberar hidrogênio (Figura 6).

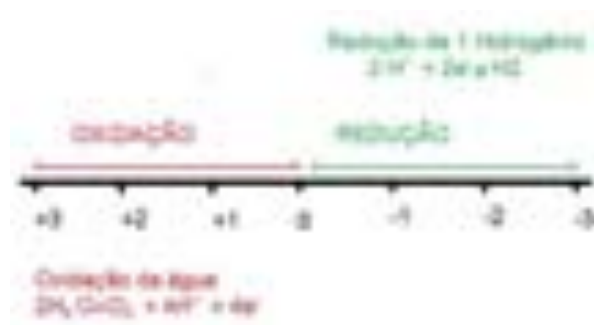


Figura 6. Oxidação da água ou redução do H_2 ocorrem em potenciais que podem variar dependendo do material do eletrodo. (Adaptado de SKOOG et al., 2002).

1.1.4.1.1 Voltametria cíclica

Nessa técnica, uma rampa de potencial de onda triangular é aplicada ao eletrodo de trabalho, de um ponto inicial até um potencial de inversão, ida e volta várias vezes, sendo feita uma varredura, onde a resposta de corrente é monitorada; e o potencial de inversão deve ser aquele posterior ao qual ocorre a oxidação ou a redução controlada por difusão de um ou mais analito. Os parâmetros obtidos num voltamograma (curva tensão corrente), *i.e.* corrente de pico anódico (I_{pa}), corrente de pico catódico (I_c), potencial anódico (E_a) e potencial catódico (E_c) podem fornecer dados úteis para caracterização eletroquímica de espécies eletroativas (Figura 7). (SKOOG et al., 2002; CHEVION et al., 2000)

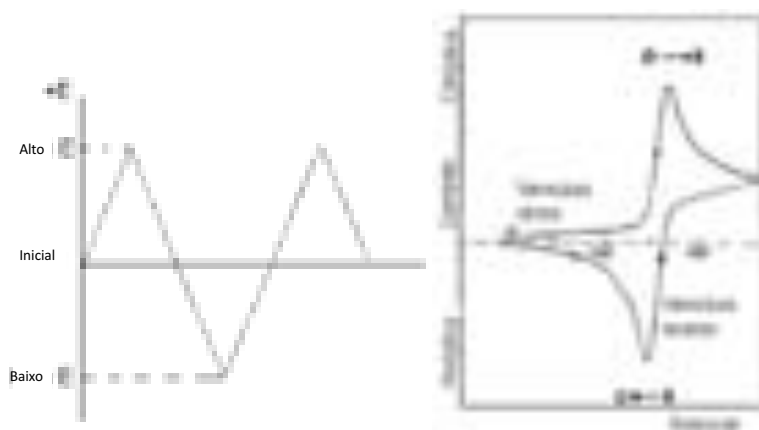


Figura 7: Formato de onda em voltametria cíclica e esboço de um voltamograma cíclico, representando um ciclo de varredura completo. Adaptado de SKOOG et al., 2002

A voltametria cíclica (VC) é a técnica eletroanalítica mais útil do ponto de vista qualitativo. Tem sido empregada na avaliação da capacidade antioxidante total e baseia-se na análise de parâmetros eletroquímicos como potencial e corrente de

pico anódico $E_{p,a}$, $I_{p,a}$, bem como do perfil voltamétrico, em que se observam ΔE , presença de ombros/desdobramentos de picos, resistividade do sistema, queda ou aumento do sinal em ciclagens sucessivas que são características que definem reversibilidade, número de etapas ou espécies eletroativas envolvidas no processo redox, bem como presença de processos adsortivos ou eletrodeposição (KOROTKOVA, 2003; MARTINEZ et al., 2006). De modo geral, quanto menor o potencial anódico ($E_{p,a}$) maior a capacidade doadora de elétrons e capacidade antioxidante da espécie eletroativa em estudo. Por sua vez, os picos obtidos mostram os níveis esperados dos fitoantioxidantes: quanto maior o pico, maior o poder antioxidante do fitoterápico ou maior a concentração de espécies eletroativas. Deste modo, quanto maior a razão entre o valor observado para a intensidade de corrente (I) e o potencial anódico (E_a), maior será a capacidade antioxidante esperada para uma matéria-prima vegetal (REIS et al., 2009); como acontece com alguns compostos fenólicos típicos de plantas aromáticas, tais como ácido carnósico, ácido caféico, ácido rosmarínico, quercetina, rutina e hesperidina, que são espécies que sofrem processos reversíveis e apresentam um potencial de oxidação muito baixo. Este comportamento o qual está relacionado com a estrutura molecular, claramente mostra suas propriedades antioxidantes (COSIO et al., 2006).

1.1.4.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Nessa técnica, impulsos de igual amplitude são sobrepostos a uma rampa linear de potencial. O potencial-base é aumentado entre os pulsos, os quais são iguais, e a corrente é medida imediatamente antes da aplicação e no fim do pulso e registra-se a diferença entre essas duas medidas (BRETT; BRETT, 1996).

Como a VPD é uma técnica diferencial, quando essa diferença de potencial é plotada em função da rampa linear do potencial aplicado, resulta em um voltamograma em forma de pico (Figura 8)

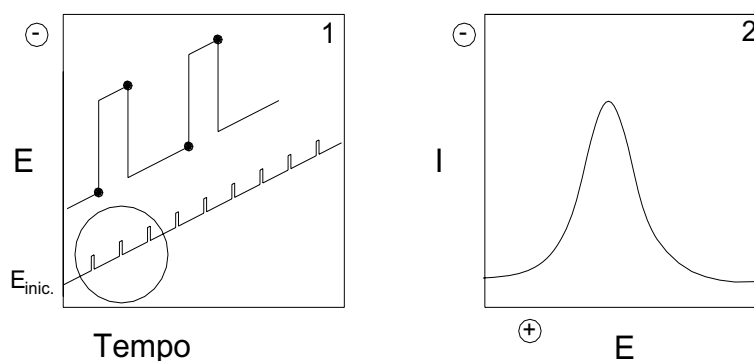


Figura 8: Esquema de aplicação do impulso (1) e de voltamograma em forma de pico, característico de VPD (2). Adaptado de BRETT; BRETT, 1996.

A VPD é uma técnica mais sensível que VC, sendo em geral a opção mais empregada em ensaios quantitativos. Nesta técnica um pulso de potencial extra ao potencial na forma de rampa é aplicado e a corrente resultante amostrada de forma diferencial, favorecendo assim que boa parte da corrente capacitiva, ou seja, corrente não Faradaica (não associada ao processo redox) seja eliminada (SKOOG et al., 2002 ; SERRANO et al., 2010).

O emprego da análise de perfil voltamétrico em ensaios qualitativos, embora menos comum, também tem sido proposto. Assim, o potencial antioxidante de insumos vegetais foram demonstrados através da medida do potencial anódico e da corrente de pico em ensaios de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) em estado sólido utilizando eletrodos de pasta de carbono quimicamente modificados com a matéria-prima ou o marcador em pó foi utilizado para fins de identificação de diferentes fitoterápicos (BARA et al, 2008; GIL, E.S., 2006).

1.1.4.2 Eletrodo de pasta de carbono /Eletrodo quimicamente modificado

Um eletrodo de trabalho quimicamente modificado deve apresentar as seguintes características: ser de fácil fabricação, baixo custo, apresentar boa condutividade elétrica; corrente de fundo baixa e estável; ter microestrutura homogênea; apresentar estabilidades física, química e eletroquímica; proporcionar rápida transferência de elétrons e reprodutibilidade nas propriedades (SERRANO et al., 2010).

Para a escolha do material do eletrodo de trabalho, deve-se observar alguns fatores importantes, tais como a zona de potenciais úteis do eletrodo no solvente a ser usado, sendo que tal zona também é limitada por fatores como a decomposição

do solvente ou do eletrólito, a dissolução do eletrodo na solução, ou a formação de uma camada isolante ou semicondutora na superfície do eletrodo; e finalmente, deve-se observar a qualidade e pureza do material empregado (BRETT;BRETT, 1996).

Um tipo de eletrodo de trabalho muito utilizado para construção de eletrodos modificados são do tipo de pasta de carbono, cujo desenvolvimento baseia-se em geral na mistura de grafite em pó e aglutinante (óleo mineral ou de silicone) e espécies que apresentem alguma resposta ou afinidade específica a determinado tipo de analito, com o objetivo de preestabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução; podendo dessa forma impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações (SOUZA, 1997; GIL et al., 2006). Eletrodos de pasta de carbono são amplamente utilizados por sua versatilidade, baixo custo, baixo ruído, baixa corrente de fundo, de fácil modificação e facilidade de renovação de superfície; além de permitir a incorporação de matrizes inorgânicas, as quais conferem características específicas ao eletrodo (FRANZOI et al., 2009). (Figura 9).

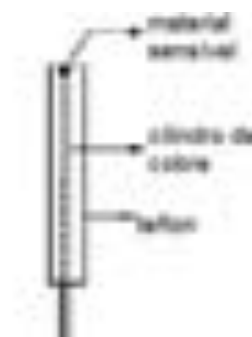


Figura 9. Representação esquemática dos elementos básicos de um eletrodo de trabalho de pasta de carbono. Adaptado de Gil, 2010.

Os métodos de imobilização do agente modificador ao substrato base, na confecção de um EQM, podem ser variados: adsorção ou quimisorção, formação de compósitos, formação de ligação covalente ou recobrimento com membranas poliméricas. A adsorção ou quimisorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução. Os eletrodos de carbono possuem uma particular capacidade de quimisorver reagentes que possuam sistemas de elétrons π estendidos, como por exemplo, compostos orgânicos aromáticos. Esta adsorção é

devida à forte interação entre o plano basal do eletrodo de carbono e o sistema de elétrons π da molécula aromática (Figura 10). Embora simples essa técnica produz EQMs com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear e também, inevitavelmente ocorrerá desorção para o meio, o que resulta em perda de reprodutibilidade, reduzindo a vida útil do EQM (SOUZA, 1997). Os eletrodos, modificados via ligação covalente, são mais estáveis, entretanto mais difíceis de preparar (envolvem tratamentos como abrasão mecânica ou fratura sob atmosfera inerte, decapagem por plasma de argônio ou termólise sob vácuo) e também geram coberturas com no máximo uma monocamada imobilizada.

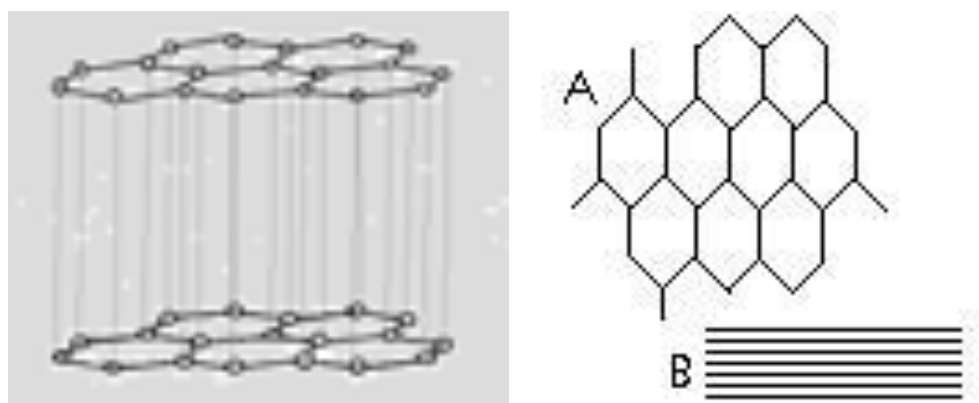


Figura 10. Representação esquemática da pasta de carbono, sendo visão tridimensional, visão superior – plano horizontal (A) e lateral-plano vertical (B). Adaptado de SKOOG et al., 2002.

Os eletrodos modificados de pasta de carbono são do tipo compósito, ou seja, consiste em simplesmente misturar o modificador no substrato do eletrodo. Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono em pó (grafite), como os eletrodos de pasta de carbono (EPCs). No geral, consiste em misturar o grafite a uma solução do modificador e depois, evaporar o solvente, ficando somente o modificador, o que resulta numa distribuição mais homogênea deste último. Também pode ocorrer perda gradual para a solução do eletrólito prejudicando a reprodutibilidade (SERRANO et al., 2010).

Os EPCs são construídos misturando grafite, que é um condutor elétrico, com um aglutinante ou ligante, normalmente um líquido orgânico não condutor como silicone, óleo mineral, e mais recentemente, líquidos iônicos; podendo ser um EQM quando misturado a um modificador orgânico ou inorgânico. Desenvolvem reações eletroquímicas mais lentas que eletrodos metálicos e a cinética de transferência de elétrons depende da estrutura e preparação da superfície, porém apresentam

vantagens tais como versatilidade, modificação controlada, facilidade de construção, baixo custo, facilmente renovável e baixa corrente de fundo (BRETT; BRETT, 1996, GIL et al., 2006)

1.1.5 Cromatografia em camada delgada como método analítico

Atualmente, a cromatografia em camada delgada (CCD) evoluiu de modo que permite, não apenas o desenvolvimento de ensaios semi-quantitativos, como também obter resultados quantitativos bastante confiáveis. As CCDs quantitativas podem ser divididas em duas categorias: método *in situ* e método indireto. Na primeira a detecção é feita diretamente na cromatoplaça, em geral utilizando a densitometria; já na segunda as manchas obtidas e visualizadas por técnica não destrutiva passam por processo de extração, e são posteriormente analisadas através de técnica quantitativa apropriada (MENDHAM et al., 2002).

Embora a técnica CCD tenha mantido seus fundamentos e princípios básicos tanto para métodos *in situ* quanto indiretos, o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas à aplicação de amostras, desenvolvimento (eluição) cromatográfico e sistemas de detecção; permitiu tal evolução (MENDHAM et al., 2002). Assim, separações em alta resolução por CCD passaram a ser possíveis e designadas como cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) ou High Efficient Thin Layer Chromatography (HPTLC); a partir do momento que melhoraram a qualidade dos adsorventes (sílica gel especialmente purificada e de diâmetros de 3 a 5µm), dos procedimentos de aplicação (aplicador mecânico, capilar de platina-irídio polido) e sistemas acoplados de detecção (JANIKSÁK; MÁHTÉ, 1997; MENDHAM et al., 2002). Entre os métodos de detecção que têm sido acoplados a esta técnica, merecem destaque a densitometria (JANIKSÁK; MÁHTÉ, 1997; FERENCZI-FODOR et al., 2001) e métodos de detecção eletroquímicos (PETROVIC et al., 1998; KOMORSKY-LOVRIC et al., 2006; SUN; MIRKIN, 2008).

Janicsák e Máthé, 1997, através de cromatografia em camada delgada (CCD) associada à densitometria, desenvolveram um método rápido, barato e sensível, com reprodutibilidade adequada, no caso de análises de rotina, envolvendo várias amostras; em que realizaram determinações quantitativas de ácidos rosmarínico e caféico simultaneamente em amostras de várias espécies diferentes de sálvia (JANICSÁK; MÁTHÉ, 1997).

Entre os métodos eletroquímicos desenvolvidos para sistemas de detecção em CCD destacam-se aquelas voltadas à determinação quantitativa de íons metálicos (PETROVIC et al., 1998; SUN; MIRKIN, 2008). Nestes sistemas, microeletrodos são colocados diretamente sobre as cromatoplasas e a fase móvel exerce também função de eletrólito suporte (BROWN et al., 1989; PETROVIC et al., 1998; SUN; MIRKIN, 2008). No caso de compostos orgânicos (BROWN et al., 1989), estes dispositivos apresentam além da dificuldade relacionada ao ajuste ótimo do eletrodo de trabalho, maior dificuldade na reprodutibilidade do tamanho das manchas. Estes fenômenos seriam ainda mais evidentes em amostras complexas como os extratos vegetais, sendo que neste caso a CCD indireta seria a mais indicada.

As vantagens quantitativas da CCD vêm sendo encobertas pelo sucesso que a CLAE tem atingido ultimamente (PETROVIC et al., 1998; THORSEN; HILDEBRANDT, 2003; WANG et al., 2004; WEN et al., 2005; TRONCOSO et al., 2005; CANELAS; COSTA, 2007; FECKA et al., 2007a) e pelas dificuldades e desvantagens custos/benefícios de se obter os aparelhos necessários à detecção; então, no presente estudo, propõe-se acoplar detecção eletroquímica à CCD, utilizando o analito isolado, no preparo de eletrodos de trabalho, os quais são elaborados por formação de compósitos entre a sílica contendo a mancha, o transdutor (grafite em pó) e um aglutinante (óleo mineral); tornando assim, o método barato e simples, acrescentando vantagens às CCDs quantitativas já existentes atualmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método eletroanalítico em estado sólido, para análise quantitativa do ácido rosmarínico (AR), isolado por cromatografia em camada delgada (CCD), de amostras de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim).

2.2 Objetivos específicos

Estudar condições ótimas de ensaio, avaliando efeitos de variáveis envolvidas no processo.

Estudar métodos para a extração do AR e métodos de isolamento do mesmo através de cromatografia em camada delgada (CCD) em amostras de alecrim e outros fitoterápicos.

Avaliar eletrodos de pasta de carbono com diferentes aglutinantes e diferentes condições de acondicionamento das mesmas.

Fazer estudos de otimização dos parâmetros de voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria cíclica (VC).

Modificar eletrodos de pasta de carbono (EPCs) com as frações isoladas dos extratos e padrões de ácido rosmarínico e outros compostos fenólicos; realizar análises voltamétricas para obtenção de potenciais e intensidade de corrente de pico para fins de estimar a atividade antioxidante e intensidade de corrente para fins quantitativos e comparar perfis voltamétricos para fins de identificação.

Fazer estudo preliminar de validação

Avaliar o comportamento dos eletrodos confeccionados, frente diferentes valores de pH e diferentes eletrólitos, variando cátions e ânions.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram adquiridas de fornecedores de insumos fitoterápicos para farmácias, duas amostras de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) em pó e duas na forma de tintura; uma amostra de *Origanum vulgare* L. (orégano) em pó e uma amostra de *Melissa officinalis* L. (melissa) em pó.

Uma amostra de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) em pó e uma de extrato hidroalcoólico concentrado foram produzidas no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás, a partir de amostra autêntica de folhas coletadas de espécimes localizados no Horto de Plantas Medicinais do Hospital de Medicina Alternativa da Secretaria Estadual da Saúde de Goiânia-GO (16°43'50.3" Sul; 49°14'32.9" Oeste), com exsicata depositada no herbário desta instituição, as quais foram secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho de faca.

Amostras em pó e extrato hidroalcoólico concentrado de *Apeiba tibourbou* Aubl. (apeiba) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Edemilson Cardoso, desta Instituição.

3.2 Padrões e Reagentes

Ácido rosmarínico e ácido caféico, ambos da marca Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha; ácido elágico produzido no LPPN; rutina e quercetina adquiridos de fornecedores de matérias primas para farmácias foram usados como substâncias de referência. Silicagel H Seg tipo 60 (Merck), etanol (Chemis®, São Paulo, Brasil), óleo mineral (Nujol®, São Paulo, Brasil), grafite em pó (Merck S/A, São Paulo, Brasil), KCl (Synth®, São Paulo, Brasil), HCl (Impex®, São Paulo, Brasil), ácido fórmico anidro (Impex®, São Paulo, Brasil), líquido iônico cloreto de 1butil-2,3-dimetilimidazólio (BMI.Cl) (Sigma-Aldrich, Alemanha), óleo de silicone DC200 (Sigma Aldrich, Alemanha), acetona (Chemis®, São Paulo, Brasil), cloreto de metileno (Chemis®, São Paulo, Brasil), acetonitrila grau CLAE (Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil), metanol grau CLAE (Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil) e água ultra pura obtida a partir

de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®], Bedford, EUA) foram usados como reagentes analíticos.

3.3 Condições adequadas de ensaio

Com o propósito de otimizar o método analítico proposto nesse trabalho, foram avaliados os efeitos de algumas das principais variáveis envolvidas no processo, tais como volume de amostra aplicada na cromatoplaça, tempo de homogeneização das pastas de carbono e tempo de acondicionamento da pasta no eletrólito suporte.

3.4 Preparo dos extratos

Avaliou-se diferentes formas de extração (decocção sob refluxo, agitação mecânica e banho de ultrassom), e um planejamento fatorial completo do tipo Box-Behnken (BOX et al., 1978) foi desenvolvido para verificar as melhores condições de extração por sonicação, em amostra autêntica de alecrim produzida no LPPN.

Para as análises, as amostras em pó foram tamizadas (32 mesh) e 1g das mesmas foi submetido à extração com 10 mL de metanol.

Os extratos dos pós assim preparados, as tinturas e os extratos concentrados foram aplicados diretamente sobre as cromatoplaças.

Para a extração assistida por ultrassom as amostras em pó foram submetidas à extração com volumes variados de metanol (10 a 250 mL) e submetidas à sonicação por 10 a 40 minutos.

3.5 Cromatografia em camada delgada

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatoplaças de alumínio (Whatman AL SIL G/UV250) e de vidro (Silicagel 60UV254) ambas com 20X20 cm, adquiridas da Cial, Paulínia-SP, impregnadas com sílica gel com indicador de fluorescência, de 0,20 mm e 0,25 mm de espessura respectivamente, sob temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e em cromatoplaças sem indicador de fluorescência, confeccionadas no LPPN. Utilizou-se cuba cromatográfica previamente saturada com o vapor da fase móvel composta por acetona, ácido

fórmico, e cloreto de metileno (25: 8,5: 85), conforme proposto pela Farmacopéia Portuguesa VIII (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 8 ed.) na monografia de *R. officinalis*. Volumes de 5 a 20 µL de padrões e amostras foram aplicados a 1,5 cm da base da placa e após eluições de 8 cm (tempo médio de 25 minutos), as placas foram secas a temperatura ambiente em capela e as manchas correspondentes ao AR foram observadas sob luz ultravioleta a 365nm.

A fase móvel e soluções padrão foram preparadas imediatamente antes dos ensaios cromatográficos, sendo todas as análises realizadas em triplicata.

3.6 Preparo dos EPCs

As manchas observadas nas cromatoplasmas de vidro e de alumínio, correspondentes à fração AR das amostras e soluções padrão em diferentes concentrações foram cuidadosamente raspadas com espátulas de plástico, recolhidas e guardadas em frasco Ependorff sob refrigeração (4° C), protegidos da luz e umidade.

As alíquotas de sílica com o analito isolado (manchas da cromatografia) foram misturadas com grafite em pó e um aglutinante (óleo mineral, silicone ou uma mistura de óleo mineral e líquido iônico) nas proporções de 7-9 mg: 25 mg: 66-68 mg (% p/p/p), por 5 a 15 minutos. As pastas assim obtidas foram utilizadas no preparo de EPCs e os mesmos foram submetidos a ensaios eletroanalíticos para a determinação quantitativa do AR.

O preparo das pastas e análises foram feitos imediatamente após o isolamento das manchas contendo o AR e sílica e estas também foram guardadas sob refrigeração e ao abrigo da luz nos tempos de 7 e 30 dias após este isolamento. Foram também observados eletrodos preparados com manchas recolhidas das placas, após uma semana, sem qualquer cuidado especial de conservação.

3.7 Medidas eletroquímicas

Para as análises voltamétricas foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato Autolab® III PGSTAT (Eco Chemie®, Utrecht, Holanda), o qual foi acoplado a um computador equipado com o software PGSTAT 20 versão 4.9 para aquisição de dados e esse aparato, conectado a uma célula eletroquímica convencional com

sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificados com a sílica contendo AR, a qual foi adequadamente compactada na cavidade de 2 mm de diâmetro do eletrodo; eletrodo auxiliar de espiral de platina e eletrodo de referência de calomelano. As medidas foram executadas sob temperatura ambiente tendo uma solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito suporte.

Foram desenvolvidas voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (CV); em pastas de carbono preparadas com o material retirado da área correspondente ao AR (manchas), de placas de alumínio e de vidro.

Para os ensaios de VC, foi adotada a faixa de potencial de -0,25 a 1,25V, suficientemente ampla para avaliar a maioria dos compostos polifenólicos de interesse e 100mV.s⁻¹. Para a VPD, foram investigados alguns parâmetros no intuito de otimizar o processo: potenciais de pulso de 0,012 e 0,015 V; intervalos de pulso de 0,4 a 0,6 s; velocidades de varredura de 24 a 30 mV.s⁻¹ e amplitudes de pulso de 25 a 17 mV

3.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A título de comparação, foram realizados experimentos adicionais visando à quantificação do AR por CLAE. As análises foram realizadas usando um Sistema Cromatográfico Líquido Shimadzu® (modelo LC – 20AT Prominience) equipado de uma bomba quaternária Shimadzu® (LC – 20AT), degaseificador Shimadzu® (DGU –20A5 Prominience), injetor automático Shimadzu® (SIL – 20A Prominience) e detector PDA Shimadzu® (SPD – M20A Prominience).

As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna Gemini® FR-C18 3µm (4,6mm de Ø interno x 250mm de comprimento) inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato Shimadzu® (CTO –20A Prominience), empregando como fase móvel uma mistura de acetonitrila a 30% (v/v) e 70% (v/v) de uma solução de acetonitrila : ácido fórmico : água milli-Q (2.5:0.5:97 % v/v) (CANELAS e COSTA, 2007) sob fluxo isocrático de 0.5 mL.min⁻¹ por 15 min. e detecção a 254 nm. A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando um Módulo Controlador Shimadzu® (CBM – 20A Prominience) acoplado a um computador com software Shimadzu® LC Solution (SHIMATZU, 2008).

3.9 Parâmetros preliminares de validação

Para que um novo método analítico gere informações confiáveis, e interpretáveis sobre determinada amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Utilizando o método de validação chamado validação no laboratório (“in house validation”) (RIBANI et al., 2004), e seguindo a legislação brasileira, de acordo com a Resolução RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003); foram avaliadas algumas figuras analíticas de mérito desta nova técnica; tais como, seletividade, linearidade, precisão intermediária, exatidão; limites de detecção e quantificação e robustez.

A seletividade foi determinada pela comparação dos voltamogramas de diferentes fitoantioxidantes (ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido elágico, rutina e quercetina).

A capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de ácido rosmarínico foi testada através do método de padronização externa, ou seja, utilizando concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão, do qual foi feito uma solução estoque, e a partir desta, foram preparadas as soluções de trabalho.

No parâmetro precisão, foram avaliadas a repetibilidade, onde foram feitas nove determinações com três concentrações diferentes (baixa, média, e alta).

A exatidão foi calculada através de ensaios comparativos da determinação quantitativa de ácido rosmarínico de amostras autênticas de alecrim analisadas por CLAE e pelo método CCD - VC / VPD.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

Foi avaliado o desempenho dos eletrodos quando imersos em diferentes soluções de eletrólitos suporte, sendo cloreto de potássio (KCl), sulfato de sódio (Na_2SO_4) e cloreto de sódio (NaCl); todas na concentração de 0,1 M e pH = 7,0. Foi avaliado também o desempenho dos eletrodos nos pHs 5,0 e 8,0. Avaliou-se o desempenho quanto à temperatura de acondicionamento das placas cromatográficas (ambiente e sob refrigeração), dias de colheita das manchas e tempo de acondicionamento do eletrodo em geladeira.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de algumas condições de ensaio

Com o propósito de otimizar o método analítico proposto nesse trabalho, foram avaliados os efeitos de algumas das principais variáveis envolvidas, as quais estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais variáveis envolvidas no método CCD-VC / VPD: V = volume aplicado à cromatoplaça; T_h = Tempo de homogeneização da pasta; T_a = Tempo de acondicionamento do eletrodo no eletrólito suporte.

VARIÁVEIS	VALORES INVESTIGADOS			MELHOR DESEMPENHO
V (μL)	5	10	20	5
T_h (min.)	5	10	15	10
T_a (min.)	1	2	4	4

Para o isolamento do analito nas placas, o volume de 5 μL mostrou-se o mais adequado, uma vez que possibilitou a obtenção de manchas bem evidentes e com menor proporção de sílica

O tempo de mistura das pastas de carbono em eletrodos modificados (EPCs) é, em geral, determinante para uma perfeita homogeneização; entretanto, não se observou diferenças significativas nos tempos avaliados, adotando-se o tempo de 10 minutos, assegurando-se assim dois requisitos importantes: perfeita homogeneização a rapidez do ensaio.

Por sua vez, após preparo dos EPCs, verificou-se que o tempo mínimo de acondicionamento em eletrólito suporte foi de quatro minutos. Tempos menores resultaram em aumento de ruído e da corrente capacitiva, bem como outras distorções relacionadas ao processo de hidratação das pastas. Em contrapartida, tempos excedentes de acondicionamento, além de retardar o tempo de análise, pode resultar na lixiviação/deessorção do analito e conseqüente redução do sinal.

4.2 Extratos das amostras em pó

Para fins de avaliar o método mais apropriado para extração do analito, desenvolveram-se três diferentes métodos em amostra autêntica de alecrim produzida no LPPN, utilizando a proporção de 1g do pó para 10 mL do solvente (metanol), durante 30 minutos.

No método de extração por agitação mecânica, a amostra preparada conforme descrito, foi levada a uma mesa agitadora com velocidade de 120 rpm, durante 30 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi submetido à CCD; na decocção com refluxo, a amostra foi colocada em balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de bolas e aquecida em manta a 60°C por 30 minutos e o sobrenadante, submetido à cromatografia e na extração por ultrassom, a mostra foi colocada diretamente em balão volumétrico e sonicada por 30 minutos e o sobrenadante submetido à CCD.

A Figura 11 mostra o desempenho das três extrações, sendo que o método CCD – VC / VPD foi desenvolvido em cromatoplasmas de alumínio.

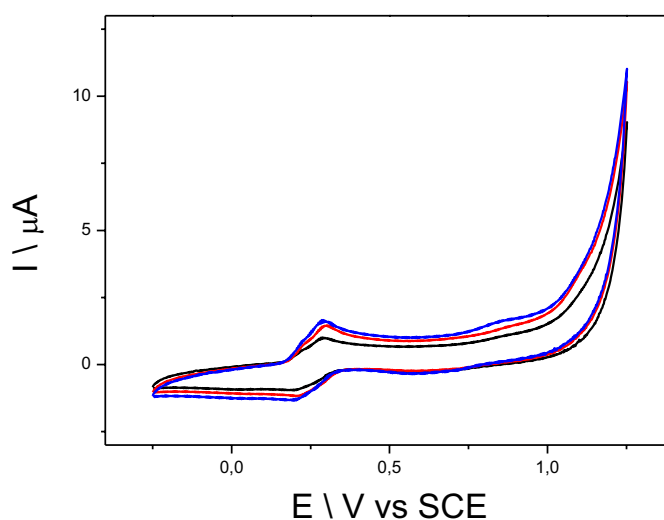


Figura 11: Voltamogramas cíclicos de pastas elaborados com sílica raspada de cromatoplasmas de alumínio correspondente ao AR, após extração por decocção sob refluxo (azul), ultrassom (vermelho) e agitação mecânica (preto). KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹.

O desempenho dos três métodos pode ser melhor comparado quando as CCDs foram realizadas em cromatoplasmas de vidro, conforme a Tabela 2:

Tabela 2. Avaliação dos métodos de extração de ácido rosmarínico em amostra de pó das folhas de alecrim, através do método CCD-VC/VPD em cromatoplacas de vidro. (I_p = corrente de pico)

MÉTODO	I_p (μ A)	Concentração (mg/mL)
Agitação	19,045	0,601
Decocção	35,701	1,113
Ultrassom	35,001	1,092

O ultrassom é um método onde ocorre uma intensificação da transferência de massa surgida do colapso das bolhas de cavitação próximas das paredes celulares, as quais podem ser rompidas ou haver um jato ultrassônico agindo como uma bomba que força o solvente para dentro, dissolvendo seus componentes; e técnicas que o utilizam, demonstraram ser de poder extrativo bastante eficiente, mais rápidas, utilizando temperaturas bem mais baixas, e são menos dependentes dos solventes tradicionais, utilizando menor quantidade dos mesmos (ALBU et al., 2004; ROLDÁN-GUTIÉRREZ et al., 2008; PANIWNKY et al., 2009).

Com base na literatura e na observação de diferença pequena no rendimento apresentado nas técnicas de decocção e ultrassom, optou-se pelo método do ultrassom por ser mais rápido e prático; e para avaliar as proporções e tempo adequados para extração do analito, foi feita uma extração assistida por ultrassom e desenvolvido um planejamento fatorial completo do tipo Box-Behnken (BOX et al., 1978). Os níveis dos fatores estudados são apresentados na Tabela 3, que mostra os códigos e valores de cada fator.

Tabela 3. Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial 3^2 (Box Behnken) da extração assistida por ultrassom de AR em amostra de alecrim.

FATOR	NÍVEL		
	-1	0	+1
X_1 proporção(p/v)	1:10	1:50	1:250
X_2 tempo (min.)	10	20	40

Os fatores foram codificados para permitir a análise de variância (ANOVA) seguindo a regra de codificação dada pela equação (2); e foi usada a técnica de superfície de resposta, empregando o módulo Visual General Linear Model (VGLM) do software Statistica '99 (Statsoft Inc.)

$$Variável\ codificada = \frac{(nível\ não\ codificado - 0.5 \times (nível\ alto + nível\ baixo))}{0.5 \times (nível\ alto - nível\ baixo)} \quad (2)$$

As matrizes com os fatores estudados por meio de um modelo fatorial completo do tipo 3^2 são apresentadas na tabela 4, com respectivos valores encontrados para amostra autêntica de alecrim, sendo que os experimentos 10, 11 e 12 foram replicatas dos experimentos 1, 5 e 9 respectivamente:

Tabela 4: Planejamento factorial 3^2 (Box Behnken) e respectivos valores de ácido rosmarínico.

Exp.	X ₁	X ₂	I _p (µA)	Conc. AR (mg/mL)
1	-1	-1	15,320	0,486
2	-1	0	29,874	0,934
3	-1	+1	35,100	1,095
4	0	-1	5,541	0,185
5	0	0	10,230	0,330
6	0	+1	12,431	0,397
7	+1	-1	2,210	0,083
8	+1	0	4,309	0,147
9	+1	+1	5,171	0,174
10	-1	-1	15,787	0,500
11	0	0	9,974	0,322
12	+1	+1	5,320	0,178

Os melhores valores foram encontrados no experimento onde foi utilizado uma proporção de 1g da amostra para 10 mL do solvente (metanol), quando submetido a 40 minutos em ultrassom.

Observou-se que o rendimento dos extratos do tempo médio (20 minutos) para o maior tempo (40 minutos) foi menos de 20%, logo, adotou-se o tempo de 30 minutos como tempo padrão de extração.

4.3 Isolamento do analito por CCD

Nesse estudo, utilizou-se como forma de aumentar a sensibilidade do eletrodo, a eliminação de interferentes, por meio de outra técnica de separação, no caso, a cromatografia em camada delgada (CCD).

O perfil cromatográfico obtido para as amostras apresentou uma zona cromatográfica fluorescente branco azulada (intensa) com $R_f 0,5 \pm 0,02$ idêntico aos valores de R_f do padrão de ácido rosmarínico (0,5), e uma zona cromatográfica fluorescente branco azulada de menor intensidade atribuída ao ácido caféico com $R_f 0,85$. Optou-se pelo método oficial, já que se comprovou que estas condições experimentais foram adequadas para eluição do analito; os quais foram facilmente isolados (raspados) para elaboração dos EPCs e análise em estado sólido (Figura 12).

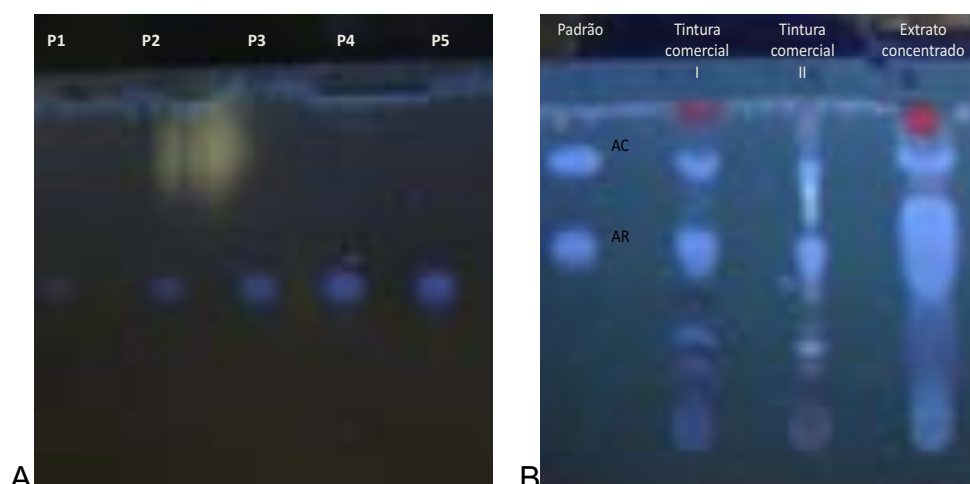


Figura 12: Cromatoplas com manchas características de diferentes concentrações de padrão de ácido rosmarínico, sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$ (A) e manchas características de padrões de ácido rosmarínico (AR) e caféico (AC); extratos de *Rosmarinus officinalis* sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$, após eluição em cromatoplasca de alumínio e fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno (B).

Para certificar que a separação dos componentes do alecrim ocorria completamente, foram realizadas CCDs estendidas (18 cm de corrida), verificando-se que não apresentou nenhum outro composto na mancha correspondente ao AR, como pode ser observado na Figura 13.

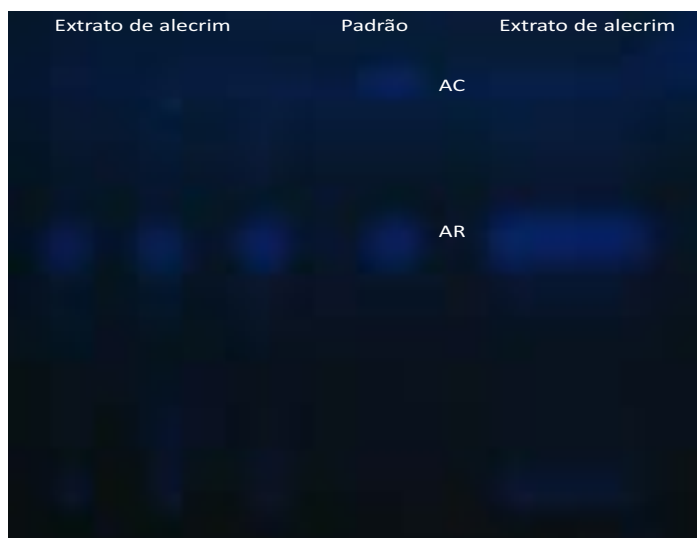


Figura 13: Cromatoplasmas com manchas características de padrão de ácido rosmarínico e cafeico, e extrato de amostra autêntica de *Rosmarinus officinalis*, sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$, após eluição estendida (18cm) em cromatoplasma de vidro e fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno (B)

4.4 Preparo dos EPCs

Como método de preparação do eletrodo, utilizou-se a técnica de formação de compósito, onde misturou-se as manchas de sílica contendo o analito (modificador), raspadas das cromatoplasmas (Figura 14), com o grafite em pó (condutor elétrico); pois é sabido que a modificação de EPCs com proporções exatas da espécie eletroativa de interesse pode, segundo a Lei de Faraday, fornecer dados qualitativos e quantitativos (BARA et al., 2006; REIS et al., 2009).



Figura 14: Cromatoplasmas com manchas raspadas para construção de curva padrão de ácido rosmarínico (P1, P2, P3, P4, P5) e branco (sílica sem padrão ou amostra), após eluição em fase móvel composta por ácido fórmico/acetona/cloreto de metileno.

Após uma homogeneização por 10 minutos do grafite, óleo mineral e manchas raspadas de cromatoplas de vidro ou de alumínio, as pastas obtidas foram acondicionadas na cavidade (orifício) do eletrodo de trabalho e submetidas aos ensaios voltamétricos (Figura 15)

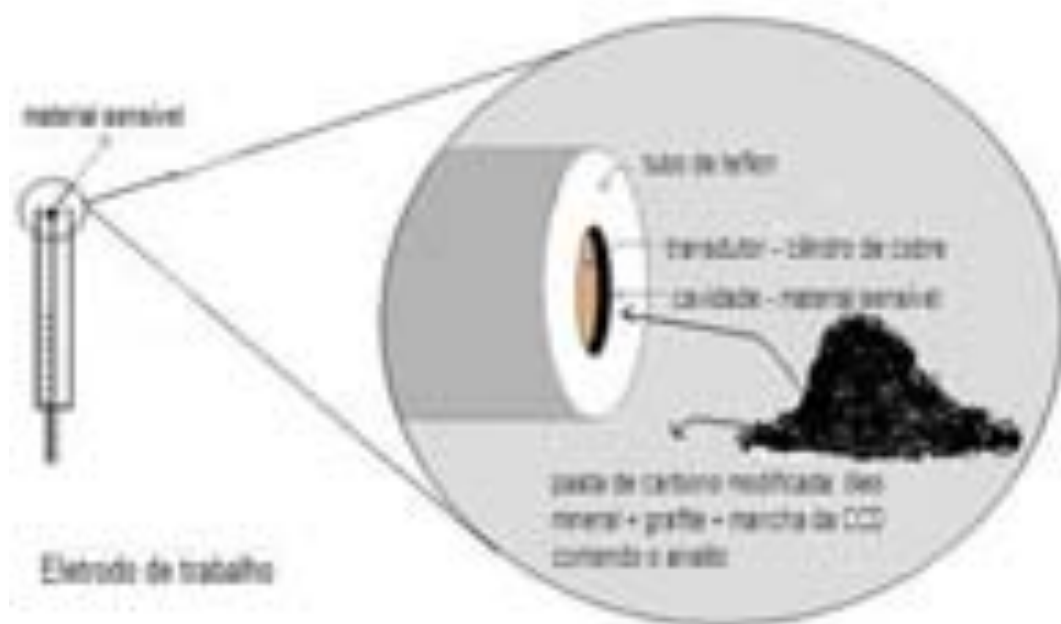


Figura 15: Representação esquemática do acondicionamento da pasta de carbono no eletrodo de trabalho.

Foram avaliadas pastas preparadas com diferentes aglutinantes, sendo óleo mineral puro, silicone, e uma mistura de líquido iônico (LI) cloreto de 1-butil-2,3-dimetil-imidazólio e óleo mineral 1:1 (FRANZOI et al., 2009), respeitando as proporções de 7-9 mg: 25 mg: 66-68 mg (% p/p/p), sem qualquer alteração significativa para ambos aglutinantes nas placas de alumínio; já nas placas de vidro, observou-se que ao utilizar silicone houve uma queda significativa na resposta, e com o líquido iônico (LI), ao contrário da expectativa, não houve ganho significativo dos valores de I_{pa} e I_{pc} e ocorreu perda da definição dos picos de oxidação e redução (Figura 16).

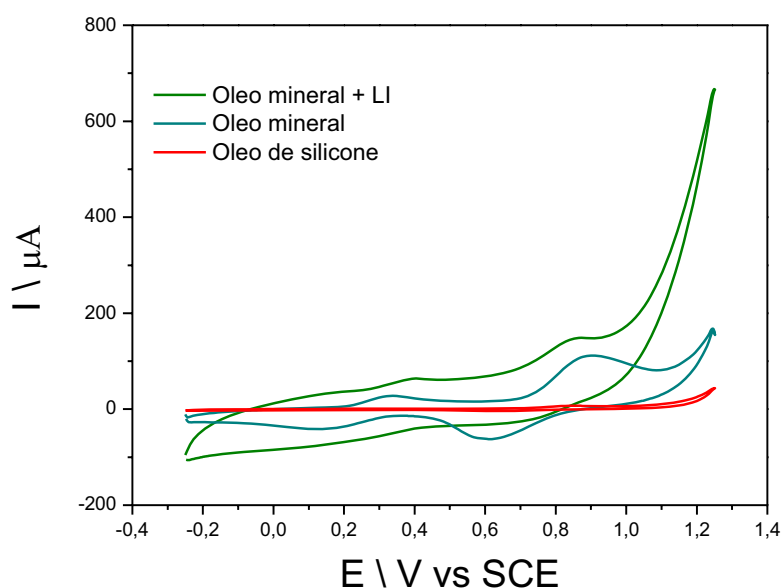


Figura 16: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pastas de carbono modificados com manchas de CCDs contendo a mesma concentração de amostra de *Rosmarinus officinalis*, variando o aglutinante da pasta. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100 mV.s^{-1} .

As proporções de aglutinante e líquido iônico neste estudo foram feitas com base na literatura, onde a utilização dos mesmos houve uma melhora do perfil voltamétrico em biossensores para AR (FRANZOI et al., 2009); porém a definição das proporções ideais não foi propósito deste trabalho, e as mesmas poderão ser melhor investigadas em estudos futuros.

4.5 Medidas eletroquímica

Foram avaliados parâmetros eletroquímicos, para a VPD tais como: velocidade de varredura e amplitude de pulso, constatando-se respectivamente, valores ótimos de 30 mV.s^{-1} e 50 mV ; ressaltando-se que em VPD, a velocidade de varredura é dada pela razão entre *step potential* (potencial de pulso aplicado) e *interval time* (intervalo de aplicação do pulso), logo estes parâmetros também foram avaliados; sendo que os valores são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Ajuste dos parâmetros para VPD.

Parâmetros avaliados	Valores investigados	Valores otimizados
Potencial de pulso(V)	0,012 e 0,015	0,015
Intervalo de pulso(s)	0,4; 0,5 e 0,6	0,5
Vel. de varredura (mv.s ⁻¹)	24, 25 e 30	30
Amplitude de pulso (mV)	25, 50 e 75	50

As medidas eletroquímicas utilizando-se os EPC contendo sílica e analito (manchas da cromatoplaça) foram realizadas após acondicionamento de quatro minutos, tempo este que se mostrou suficiente à hidratação da pasta. Ressalta-se, que a padronização deste tempo mostrou-se fundamental à reprodutibilidade das medidas, haja visto que, ácido rosmarínico apresenta moderada solubilidade em meio aquoso.

Neste contexto, também foi investigada a possibilidade da redissolução direta de manchas de CCD correspondentes à fração de AR no eletrólito suporte; entretanto, observou-se que seria necessário um tempo mínimo de 20 minutos (sob agitação) para a dessorção (lixiviação total) do analito da sílica e estabilização dos níveis de corrente (I_{pc}) medidos.

Assim sendo, considerando que a maioria dos fitoantioxidantes polifenólicos é tão ou menos hidrossolúvel que o AR, o método aqui proposto (em estado sólido) mostra-se mais adequado do que a dissolução direta no eletrólito suporte. Por sua vez, outro aspecto vinculado a fitoantioxidantes diz respeito à adsorção e/ou eletrodeposição de compostos polifenólicos, quando submetidos a potenciais anódicos, resultando em passivação da superfície eletródica e requerendo tempo adicional para renovação da superfície de materiais eletródicos convencionais, *i.e.* eletrodos de carbono vítreo e platina (GIL et al., 2006; BARA et al., 2008; REIS et al., 2009). Outrossim, levando-se em consideração que a análise em CCD é uma prática rotineira no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos (SERRANO et al., 2010), a praticidade do método proposto se torna ainda mais evidente.

Corduneanu *et al.*, 2006, desenvolveram uma técnica voltamétrica em estado sólido para o estudo da oxidação eletroquímica do resveratrol imobilizando micropartículas do analito na superfície de um eletrodo de carbono vítreo; porém essa técnica apresenta desvantagens em relação à técnica aqui apresentada, pois não é possível saber quanto do analito aderiu ao eletrodo, e o mesmo também precisa ser insolúvel no eletrólito suporte. Nesta proposta, quantidade conhecida de analito faz parte da matriz do eletrodo (pasta de carbono) e mesmo materiais com certa hidrossolubilidade podem ser analisados, desde que o tempo de análise seja pré-estabelecido, sem ocorrer dissolução do mesmo no eletrólito utilizado (CORDUNEANU *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2010)

Deste modo, pode-se observar na Figura 17, que após sucessivos ciclos há queda dos níveis de corrente, provavelmente associada à perda do analito para a solução ou passivação do eletrodo devido adsorção do composto fenólico.

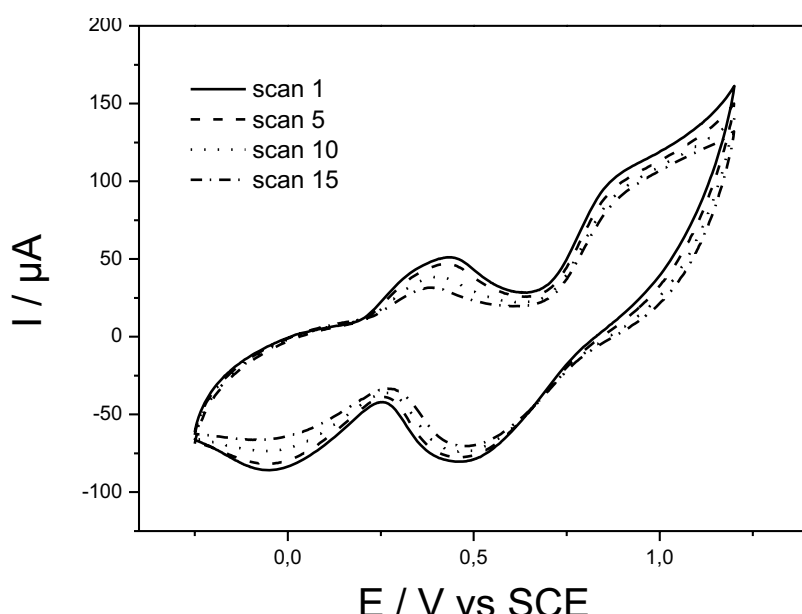


Figura 17: Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de pasta de carbono preparado com material recolhido de placa de vidro, após várias leituras (scans). KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100 mV.s^{-1}

Assim, faz-se necessário que se padronize tanto o T_a para EPCs elaborados com material isolado de padrões e amostras, quanto o número de ciclos a ser aplicado (Figura 18).

Embora métodos analíticos envolvendo sistemas híbridos com detecção direta (BROWN *et al.*, 1989; PETROVIC *et al.*, 1996; SUN; MIRKIN, 2008),

apresentem ainda maior rapidez e praticidade que o procedimento aqui proposto, tais dispositivos apresentam dificuldades operacionais relacionadas ao ajuste ótimo do eletrodo de trabalho sobre a cromatoplaça. Por sua vez, esta dificuldade implica em falta de reprodutibilidade na espessura do filme interfacial de eletrólito suporte (fase móvel), constituindo-se num fator de erro experimental (BROWN et al., 1989; PETROVIC et al., 1996; SUN; MIRKIN, 2008). Em contrapartida, o método aqui proposto requer aparatos disponíveis comercialmente, podendo ser executado em qualquer laboratório de controle da qualidade (GONÇALVES et al., 2010).

Nas condições otimizadas estabelecidas anteriormente, observou-se uma diferença bastante significativa dos resultados obtidos com concentrações equivalentes de AR quando foram utilizadas placas de alumínio e placas de vidro (Figura 18).

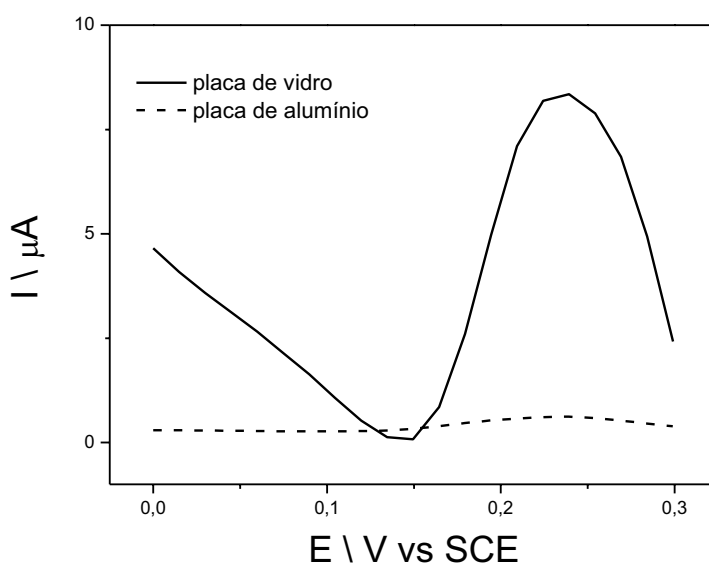


Figura 18: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com EPCs preparados com manchas obtidas de placas de alumínio e vidro, numa mesma concentração de padrão de AR. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s^{-1} ; amplitude de pulso de 50 mV.

Em contrapartida, embora para EPCs preparados com manchas de cromatoplaças de vidro tenha ocorrido um aumento bastante expressivo da sensibilidade, observou-se que no branco (eletrodo de pasta de carbono elaborado apenas com sílica raspada da cromatoplaça, sem eluição de amostra nem padrão e nem da fase móvel), houve o aparecimento de um pico aproximadamente em 800 mV, não associado à presença do analito (Figura 19).

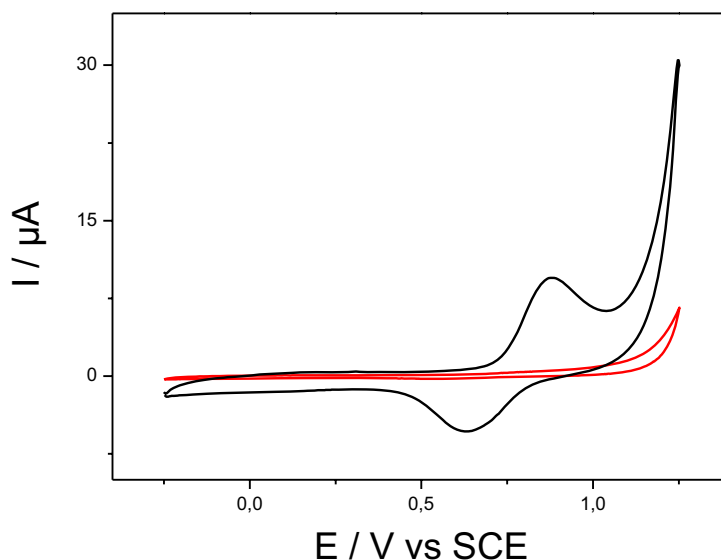


Figura 19: Voltamograma cíclico de eletrodos brancos elaborados com sílica raspada da cromatoplaça de alumínio (vermelho) e vidro (preto), sem a presença do analito. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. $-0,25$ a $1,25 \text{ V}$, 100 mV.s^{-1} .

Após analisarmos as possíveis substâncias envolvidas nesse processo anódico; aventou-se como hipótese a oxidação da fluoresceína ou qualquer outro fluoróforo distinto presente como indicador na fase estacionária (sílica) destas diferentes cromatoplaças, já que trata-se também, de moléculas eletroativas (Figura 20).

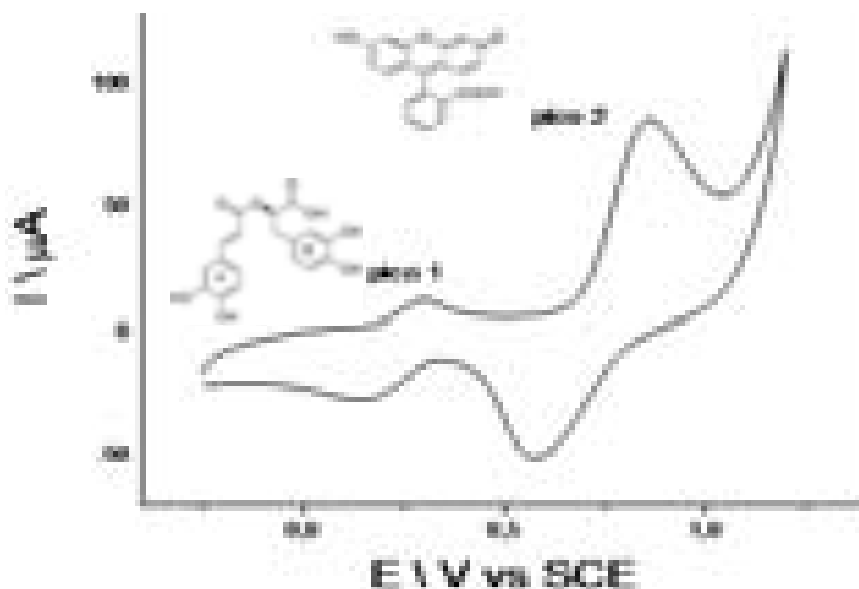


Figura 20: Voltamograma cíclico de pasta de carbono preparada com mancha de CCD contendo padrão de ácido rosmarínico mostrando dois picos reversíveis de oxidação/redução, sendo um de ácido rosmarínico (pico 1) e outro de fluoresceína (pico 2). KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. $-0,25$ a $1,25 \text{ V}$, 100 mV.s^{-1} .

Outra hipótese poderia estar associada à oxidação em cascata de cada hidroxila fenólica do AR. Para certificarmos sobre os dois picos, realizamos voltametria em estado líquido onde aplicamos padrão de AR ao eletrólito suporte e utilizamos um eletrodo de carbono vítreo, eliminado dessa forma, a presença da sílica, verificando assim o aparecimento apenas do pico 1 (Figura 21).

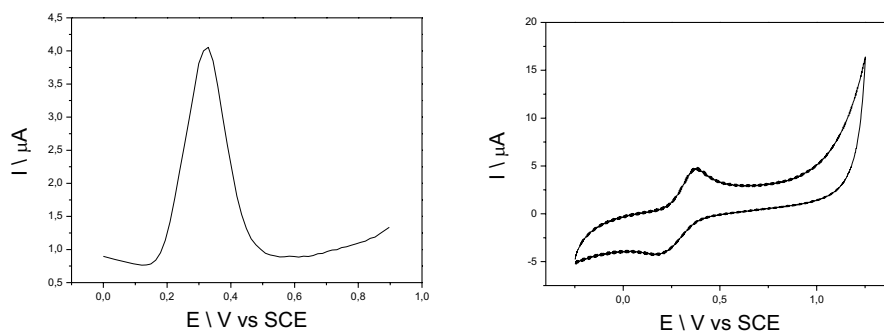


Figura 21: Voltamogramas de pulso diferencial e cíclico, de padrão de AR em estado líquido, eletrodo de trabalho de carbono vítreo. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s^{-1} ; amplitude de pulso de 50 mV e -0,25 a 1,25 V, 100 mV.s^{-1} .

Ao analisarmos o eletrodo branco (apenas sílica raspada da cromatoplaca, sem eluição de amostra nem padrão, mas com eluição da fase móvel), observamos somente o pico 2 (Figura 22)

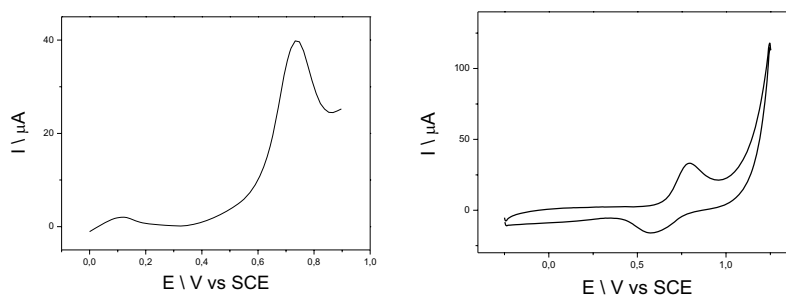


Figura 22: Voltamogramas de pulso diferencial e cíclica de eletrodos de pasta de carbono preparada com raspado de cromatoplaca sem amostra ou padrão (branco). KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s^{-1} ; amplitude de pulso de 50 mV e -0,25 a 1,25 V, 100 mV.s^{-1} .

Para certificar ainda o segundo pico como sendo do fluoróforo da cromatoplaca, foram confeccionadas placas sem fluoresceína, sendo que a visualização sob luz ultravioleta, embora dificultada, foi possível, e permitiu o isolamento das manchas, as quais foram usadas na elaboração e EPCs, como mostra a figura 23

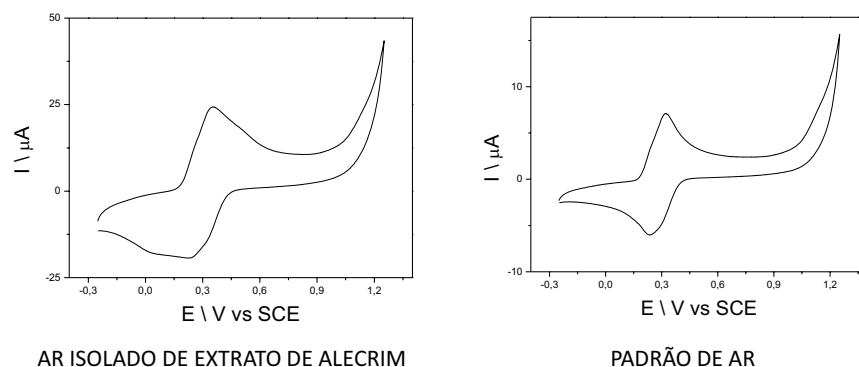


Figura 23: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pasta de carbono preparados com AR isolados e raspados de cromatoplaça de vidro confeccionada sem fluoresceína, após CCDs de amostra autêntica de alecrim e padrão de AR. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹

As placas confeccionadas sem a presença de fluoresceína reforçaram a hipótese do segundo pico como sendo do fluoróforo, porém apresentaram falta de uniformidade na espessura e maior porosidade, características que as tornariam desaconselhadas ao desenvolvimento de técnica analítica, porém as mesmas poderão ser adquiridas comercialmente em investigações futuras.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que descreve que enquanto para flavonóides a oxidação se dá de fato em cascata, sendo que a principal região ativa da molécula é o anel B (BRETT; GHICA, 2002; GHICA; BRETT, 2004; JANEIRO; BRETT, 2004), o ácido fenólico AR, apresenta capacidade quase idêntica em doar H (H-abstraction reaction) em ambos os anéis (CAO et al., 2005). Assim, descartou-se a possibilidade do segundo pico ser consequência de oxidação de parte da sua molécula; fazendo crer que o pico 2 seja realmente, resultado da oxidação de outra substância presente na sílica das cromatoplaças.

Já a ausência do segundo pico, em EPC preparados com placas de alumínio, mesmo quando se ampliou a faixa de potencial de varredura, assim como a expressiva redução do 1º pico (Figura 24), poderia estar associada à oxidação destes compostos fenólicos na superfície do metal; fato que justifica também a perda de sensibilidade para AR nas mesmas e opção pelas placas de vidro, pois as estas demonstram melhor sensibilidade e ótimo desempenho quando se analisa o pico correspondente ao AR (pico 1), como mostrado anteriormente na Figura 18.

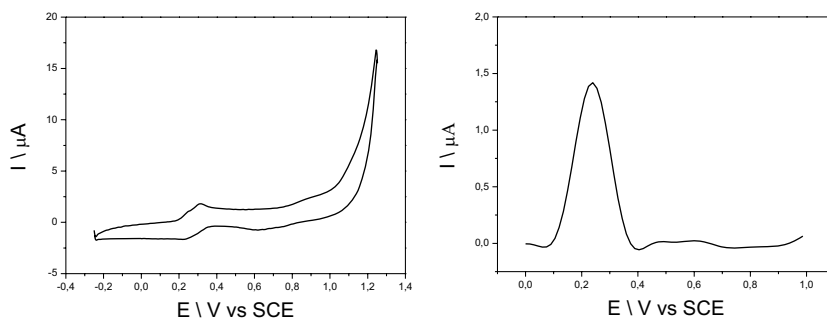


Figura 24: Voltamogramas cíclico e de pulso diferencial do ponto mais concentrado da curva padrão (0,8mg/ml) de AR, em EPC modificados com manchas de cromatoplaças de alumínio, mostrando a ausência do segundo pico. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 m e -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹.

4.6 Estudo preliminar de validação

O parâmetro seletividade foi avaliado comparando os perfis voltamétricos de diferentes fitoantioxidantes como mostra a Figura 25, onde observa-se que cada um apresenta características distintas.

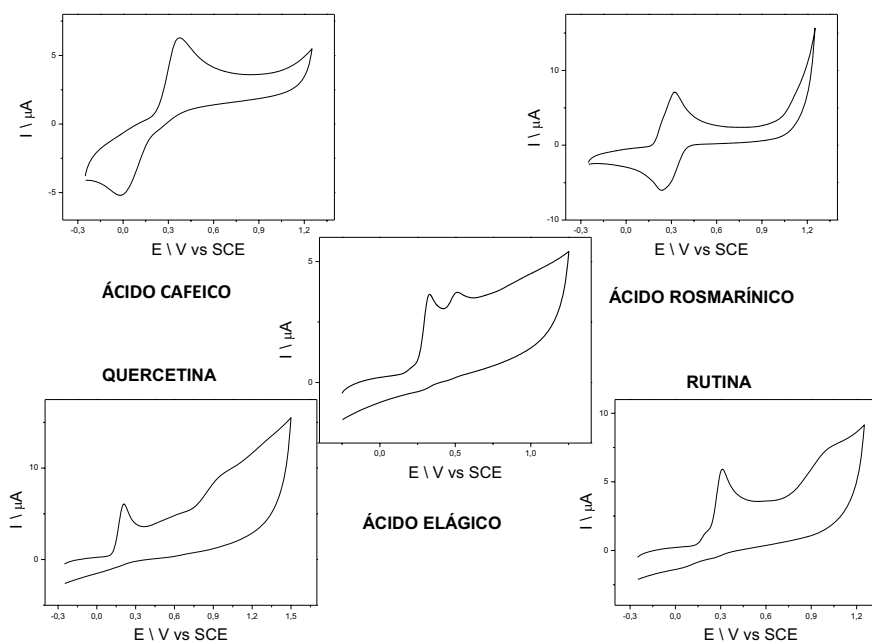


Figura 25: Voltamogramas cíclicos de diferentes fitoantioxidantes em solução, obtidos com eletrodo de carbono vítreo KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0-0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹

Nas condições analisadas, o ácido elágico apresentou dois picos anódicos e pico catódico pouco evidente, os ácidos rosmarínico e caféico apresentaram apenas um pico anódico e um catódico, porém em potenciais diferentes; a quercetina

apresentou apenas três dos quatro picos normalmente apresentados na sua oxidação eletroquímica (BRETT; GHICA, 2003); e a rutina apresentou seus dois picos anódicos e pico catódico pouco evidente (GHICA; BRETT, 2004) (Tabela 6)

Tabela 6: Potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) para diferentes fitoantioxidantes. Voltametria cíclica, eletrodo de carbono vítreo, KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0.

FITOANTIOXIDANTES	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)
Ácido Elágico	pico 1 = 0,37 pico 2 = 0,51	0,28
Ácido Cafeico	pico 1 = 0,37	-0,02
Ácido Rosmarínico	pico 1 = 0,33	0,23
Quercetina	pico 1 = 0,21 pico 3 = 0,62 pico 4 = 0,97	-
Rutina	pico 1 = 0,31 pico 2 = 1,06	0,26

O uso de eletrodos modificados com o analito isolado por CCD mostrou-se eficiente, e a voltametria em estado sólido aplicada neste estudo demonstrou ser uma técnica capaz de realizar medidas quantitativas de AR. Assim, a aplicabilidade do método foi testada em amostras comerciais, bem como amostras de alecrim preparadas em nosso laboratório, e em amostras de diferentes plantas, que também apresentam AR em sua composição, como pode ser visto na Figura 26 que mostra a perfeita separação do analito nas cromatoplaças, eliminando interferentes.



Figura 26: Cromatografia de camada delgada de diferentes amostras, observadas sob luz ultravioleta $\lambda=365\text{nm}$; sendo (1) Rosmarinus officinalis fornecedor B, (2) R. officinalis do fornecedor A, (3) R.officinalis do fornecedor C, (4) Melissa officinalis, (5) Origanum vulgare, (6) Apeiba tibourbou, (7) tintura comercial de R.officinalis do fornecedor I, (8) tintura comercial de R. officinalis do fornecedor II, (9) extrato fluido concentrado de R. officinalis, (10) extrato fluido concentrado de Apeiba tibourbou e (11) padrão de ácido rosmarínico.

Na Figura 27 pode-se observar os voltamogramas cíclicos das diferentes amostras vegetais, após extração de 1g do pó da planta em 10 ml de metanol, sob ultrassom por 30 minutos.

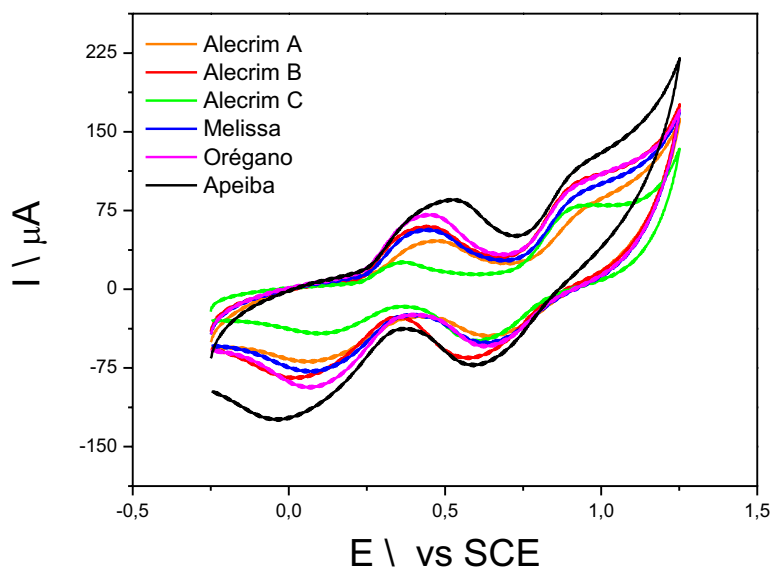


Figura 27: Voltamogramas cíclicos de amostras de extratos dos pós de Rosmarinus officinalis - alecrim de diferentes fornecedores (A e C), R. officinalis - alecrim produzida no LPPN (B); Melissa officinalis -melissa e Origanum vulgare-orégano. KCl $0,1\text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. $-0,25$ a $1,25\text{ V}$, 100mV.s^{-1}

Na Figura 28 observa-se também por voltametria cíclica, análise de diferentes extratos vegetais comerciais na forma de tinturas e de produção própria, na forma de extratos concentrados em rotaevaporador.

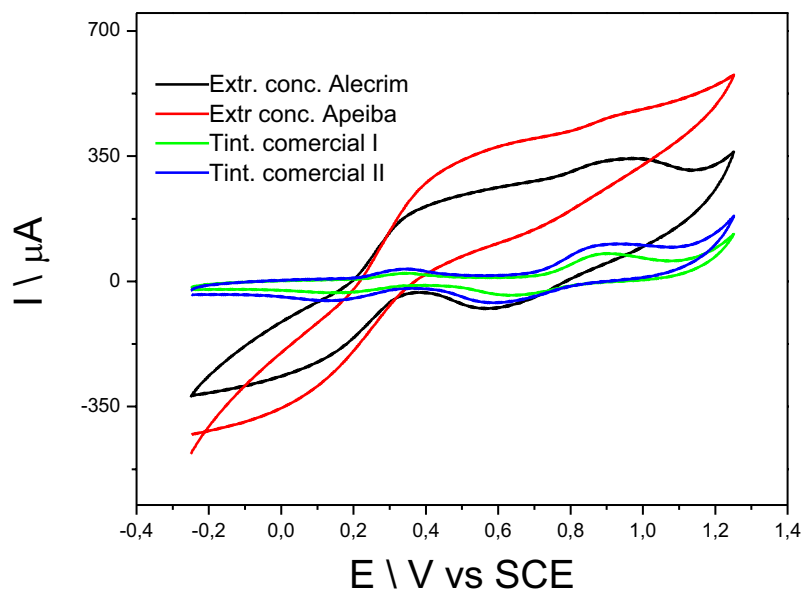


Figura 28: Voltamogramas cíclicos de diferentes amostras comerciais (tinturas de *Rosmarinus officinalis* dos fornecedores I e II) e amostras preparadas no LPPN (extratos concentrados de *Rosmarinus officinalis* -alecrim e Apeiba tibourbou -apeiba. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100 mV.s^{-1}).

Nos voltamogramas cíclicos dos extratos concentrados, observa-se o desaparecimento dos picos (fusão), devido à alta concentração de princípios ativos; o que na VPD, podem ser melhores observados por ser uma técnica mais sensível, vendo que os dois picos são bem evidenciados (Figura 29).

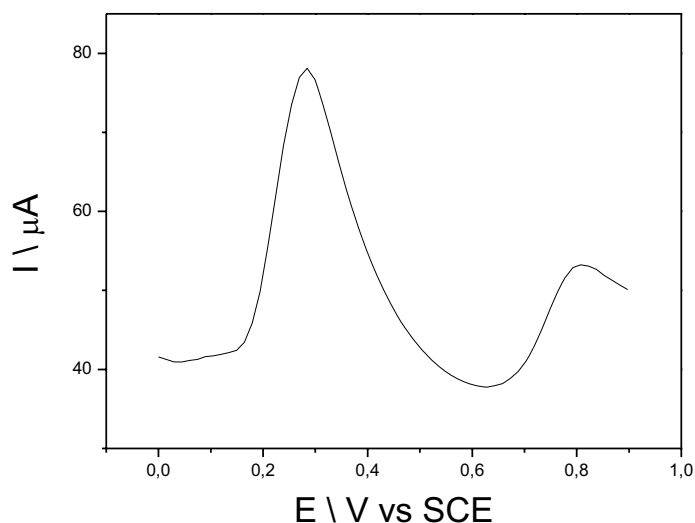


Figura 29: Voltamograma de pulso diferencial de EPC modificado com extrato concentrado de alecrim, após isolamento por CCD em cromatoplaça de vidro. KCl 0,1 molL⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV.

Adotando a nova técnica CCD - VC / VPD, obteve-se uma curva padrão linear em intervalos de concentração de 0,05 a 0,8 mg.mL⁻¹, coeficiente de correlação $r = 0,995$ e a seguinte equação da reta (Equação 3):

$$I = -0,4958 + 32,50269 \cdot 10^{-6} \cdot C \quad (3)$$

Onde I é a intensidade de corrente, C a concentração de AR em mg.mL⁻¹. Com relação aos outros parâmetros de validação avaliados, foram observados limites de detecção e quantificação de 0,014 mg.mL⁻¹ e 0,045mg.mL⁻¹, respectivamente.

A Figura 30 mostra os voltamogramas e a correspondente curva obtida para eletrodos de pasta de carbono preparados com diferentes proporções de AR, tendo sido separado anteriormente por CCD em cromatoplaças de vidro, submetidos à VPD.

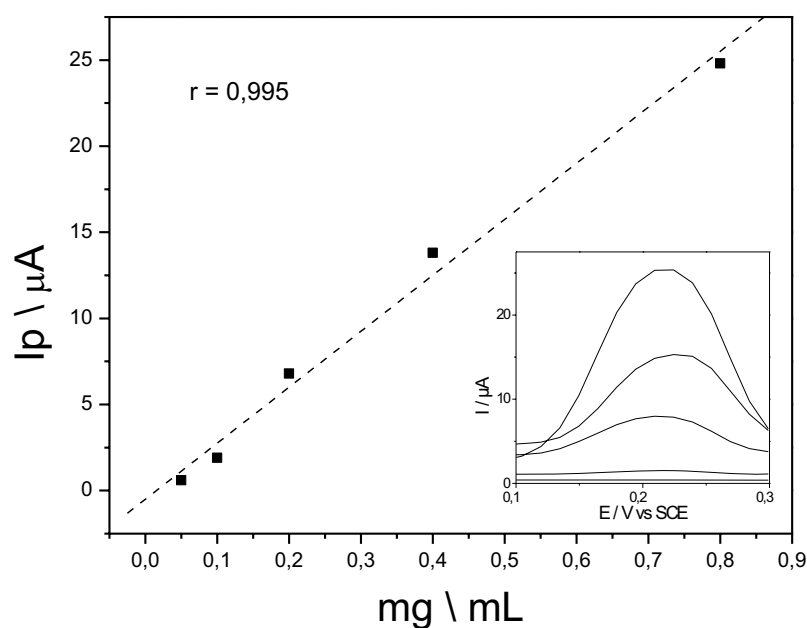


Figura 30. Curva Padrão (A) obtida a partir de voltametria de pulso diferencial (B) para pastas elaboradas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico ($0,05\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). KCl $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura de $30\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; amplitude de pulso de 50 mV .

A Figura 31 mostra voltamogramas e respectiva curva padrão de diferentes concentrações de AR (pico 1) quando submetidos à VC.

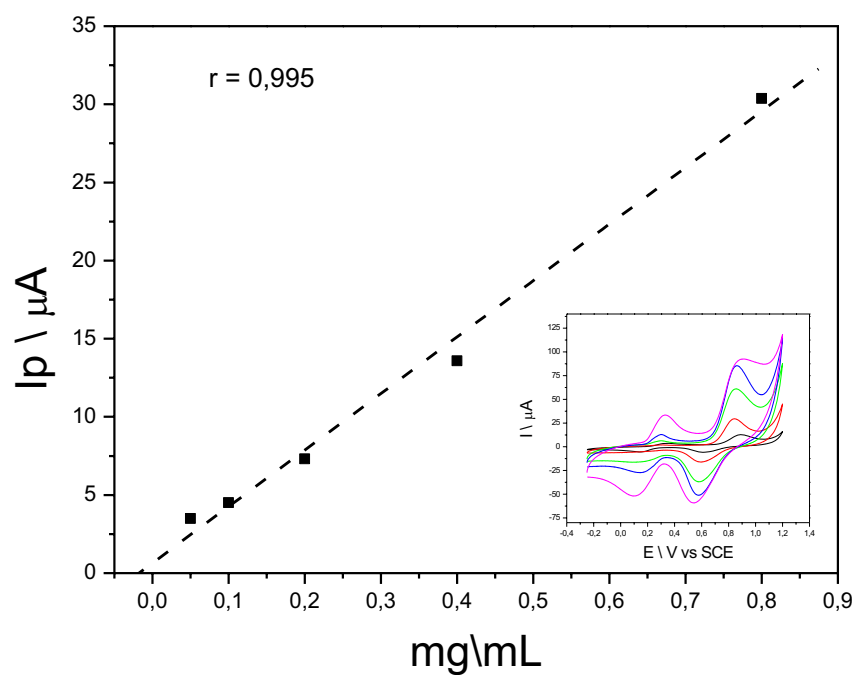


Figura 31: Curva Padrão obtida a partir de voltametria cíclica para pastas elaboradas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico – primeiro pico ($0,05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0,8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). KCl $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0. - $0,25$ a $1,25\text{ V}$, $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A mesma técnica foi empregada para elaboração de curva padrão de outros fitoantioxidantes, como o ácido caféico (Figura 32), onde obteve-se uma curva padrão linear com $r = 0,995$, e a seguinte equação da reta (Equação 4):

$$I = 0,1146 + 0,574 \cdot 10^{-6} \cdot C \quad (4)$$

Mostrando assim ser possível a quantificação do ácido caféico em amostras vegetais, também pela técnica aqui apresentada.

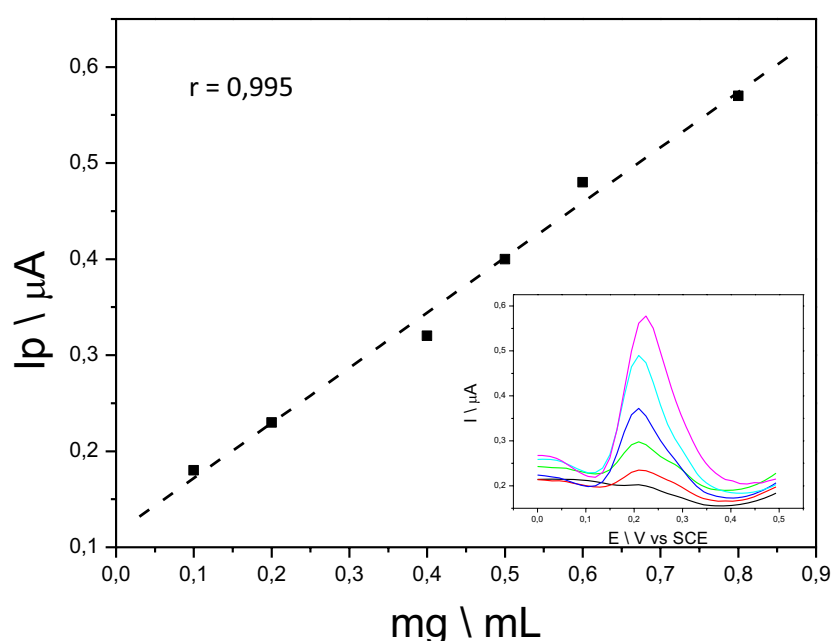


Figura 32: Curva padrão de ácido caféico, e correspondentes voltamogramas, obtida em placas de alumínio. KCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s^{-1} ; amplitude de pulso de 50 mV.

Quando os pontos de baixa média e alta concentração da curva foram avaliados (P1, P3 e P5), todos em triplicata, em dias diferentes e analistas diferentes, o método apresentou boa repetibilidade inter-ensaios com coeficiente de variação (CV) de 3,03% e repetibilidade intra-ensaios com $\text{CV} = 2,2 \%$, estando todos estes indicadores de qualidade cumprindo os requisitos propostos pela legislação vigente (BRASIL,2003).

A partir de cálculos baseados nos dados da curva padrão, obtivemos concentrações de AR para diferentes amostras vegetais (Tabela 7).

Tabela 7: Concentrações de AR calculadas com base na curva padrão em diferentes amostras vegetais determinadas por CCD-VPD.

AMOSTRA	I_{pa} (μA ou $\times 10^{-6}$)	E_{ox} (V vs SCE)	CONCENTRAÇÃO AR (mg/mL)
Alecrim Fornecedor A (pó)	31,242	0,302	0,9765
Fornecedor B (pó)	35,040	0,290	1,0933
Fornecedor C (pó)	24,181	0,278	0,7441
Melissa officinalis(pó)	33,439	0,296	1,0289
<i>Origanum vulgari</i> (pó)	37,160	0,286	1,1434
<i>Apeiba tibourbou</i> (pó)	87,140	0,313	2,6811
Extrato conc. de <i>Rosmarinus officinalis</i>	331,805	0,399	10,223
Extrato concentrado de <i>Apeiba tibourbou</i>	351,780	0,485	10,838
Tintura comercial I	24,849	0,277	0,7646
Tintura comercial II	32,260	0,263	0,9926

Onde: I_{pa} = corrente de pico anódico e E_{ox} = potencial de oxidação

Quando resultados obtidos por CCD – VC / VPD foram comparados a métodos tradicionais como CLAE em três amostras selecionadas, observou-se que os resultados foram adequados (Tabela 8); sendo que a CLAE apresentou linearidade em intervalos de concentração de 2,5-50 $\mu g/mL$, com $r = 0.999$, e os tempos de retenção das amostras de padrão de AR em diferentes concentrações e nas amostras de extratos de alecrim foram de 11.26 ± 0.03 e 11.33 ± 0.07 , respectivamente;

Tabela 8. Taxas de recuperação para método proposto (CCD-DPV) frente a método CLAE obtidos na análise de diferentes amostras de tintura de alecrim.

Amostra	Concentração de AR por CCD-VPD (mg/ml)	Concentração de AR por CLAE (mg/ml)	Taxa de recuperação (%)
Alecrim Fornecedor A	0,97	0,97	100,0%
Alecrim Fornecedor B	1,09	1,11	98,2%
Extrato fluido concentrado de alecrim	10,22	10,68	95,7%

Nas condições ideais propostas para o acondicionamento das pastas, foram avaliados materiais isolados de placas de alumínio, os quais apresentaram perfis voltamétricos praticamente idênticos com até 30 dias após o preparo (Figura 33).

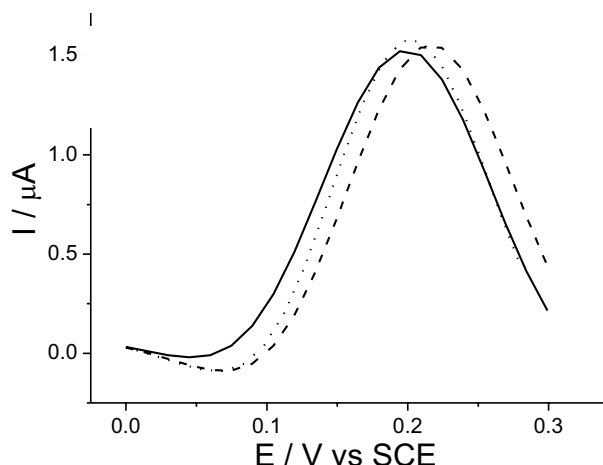


Figura 33: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhidos de CCDs realizadas em placas de alumínio, e lidos imediatamente após isolamento da fração cromatográfica contendo AR (- - -) e com a pasta devidamente acondicionada em geladeira após 7 (____) e 30 (. . . .) dias. KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV.

Pastas com material isolado de placas de vidro, acondicionadas em geladeira e ao abrigo da luz também foram avaliadas, demonstrando que o AR permanece estável nas condições ideais (Figura 34).

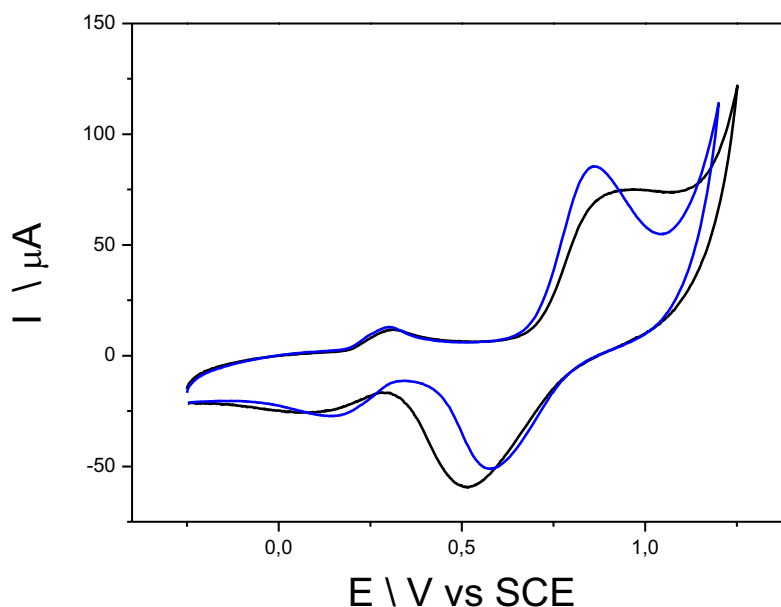


Figura 34. Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhidos de CCDs realizadas em placas de vidro, e lidos imediatamente após isolamento da fração cromatográfica contendo AR (azul) e com a pasta devidamente acondicionada em geladeira após 7 dias (preto). KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. -0,25 a 1,25 V, 100mV.s⁻¹

Eletrodos preparados com manchas colhidas no mesmo dia da CCD e manchas que foram colhidas após uma semana, sem os cuidados especiais de

conservação; ou seja, só foram raspadas das cromatoplasacas após 7 dias, sendo que estas permaneceram guardadas a temperatura ambiente; também foram avaliados; onde observou-se a perda do analito neste período de estocagem (Figura 35).

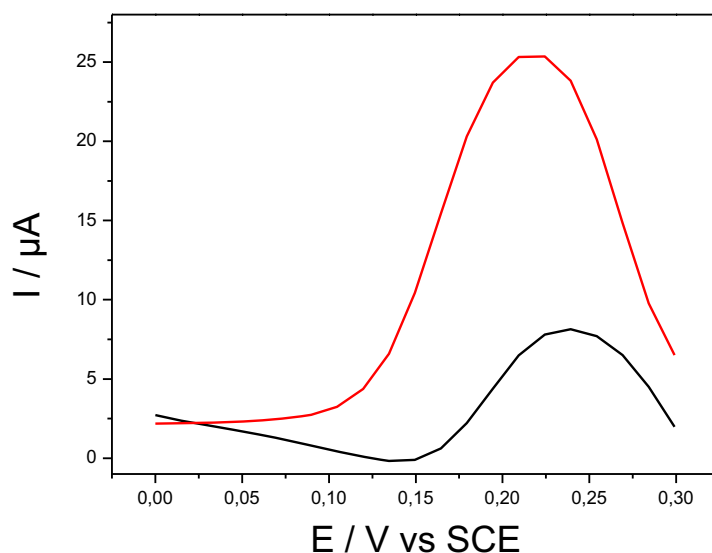


Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos de materiais raspados de CCDs realizadas em placas de vidro na mesma concentração, sendo que um foi preparado um dia após a realização da cromatografia (vermelho) e o outro, após uma semana, sem nenhum cuidado de conservação (preto). KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV

Quando o comportamento do eletrodo foi observado frente diferentes eletrólitos suporte, pode-se observar pequenas diferenças, sem implicação ao processo (Figura 36).

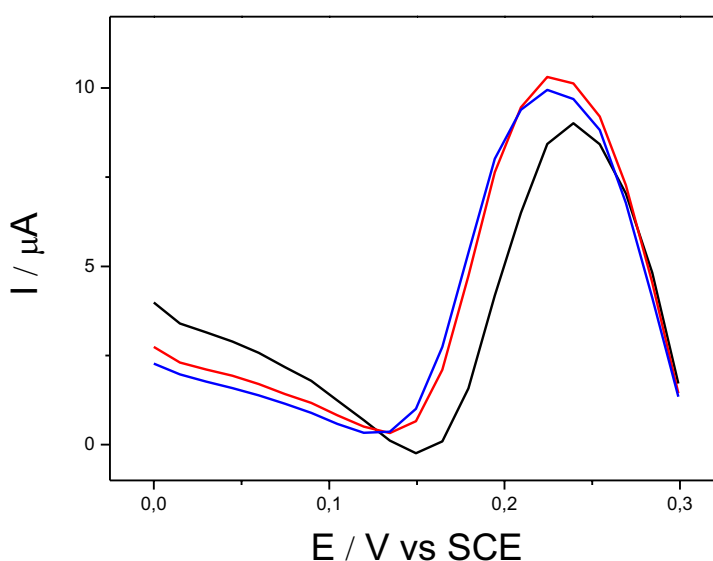


Figura 36: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhido de placas de vidro, com diferentes eletrólitos suporte: KCl 0,1M pH7,0 (vermelho), Na₂SO₄. 0,1M pH7, (preto) e NaCl 0,1M pH7 (azul). KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV.

Foram investigadas condições de pH próximos ao do eletrólito de escolha, sem alterações relevantes (Figuras 37); e, sabendo-se que processos de oxidação de compostos fenólicos tais como quercetina, rutina, resveratrol e catequinas de modo geral são dependentes do pH, sendo que geralmente o mecanismo de transferência eletrônica ocorre com maior facilidade em condições de pH próximos do neutro (BRETT; GHICA, 2003; JANEIRO; BRETT, 2004; GHICA; BRETT, 2005; CORDUNEANU et al., 2006); torna a escolha do KCl 0,1M pH7,0 como eletrólito suporte do método, uma escolha apropriada.

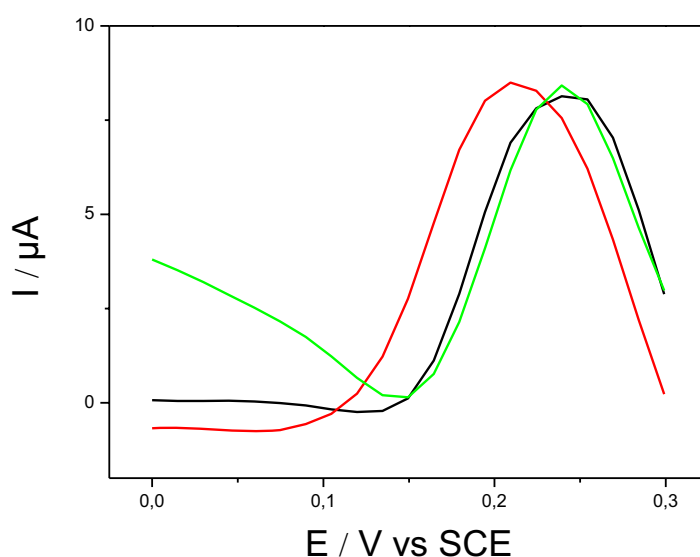


Figura 37: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em eletrodos de pasta de carbono preparados com material recolhido de placas de vidro, com diferentes pHs: pH5,0 (preto); pH 7,0 (vermelho) e pH 8,0 (verde). . KCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV.s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV

5 CONCLUSÃO

Dentre as observações feitas nesse estudo, destacam-se: cromatoplasmas de alumínio são impróprios para a execução do método proposto, uma vez que a sensibilidade é bastante comprometida pela provável interferência do material da placa que provoca a oxidação do analito; os solventes que compõem a fase móvel da CCD não interferem nos ensaios voltamétricos; o uso de líquidos iônicos pode, após ajustes das proporções destes em relação ao aglutinante da pasta, aumentar a sensibilidade do eletrodo; os eletrodos, quando acondicionados adequadamente, mantêm-se estáveis por até 30 dias, e que, a presença de fluoróforos pode interferir no método, uma vez que são substâncias eletroativas.

O acoplamento de CCD – VC / VPD proposto neste trabalho demonstrou excelente potencial analítico, uma vez que apresentou características desejáveis como baixo custo, rapidez e facilidade de execução, linearidade, além de possibilitar a eliminação do efeito de interferentes, o que culminou no aumento da seletividade do método, o qual pode ainda ser aplicado a outros fitoantioxidantes em práticas de controle de qualidade de fitoterápicos.

Ademais, estes fatores nos permitem concluir que o método proposto, após pequenos ajustes e aperfeiçoamentos, tais como aquisição de cromatoplasmas sem indicador de fluorescência e definição das proporções ideais de aglutinantes e coadjuvantes que melhorem condução intra-pasta, *i.e.* líquidos iônicos, polímeros eletrocondutores, mediadores, etc; estes podendo ainda ser aplicados no sentido de melhorar sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade; poderá ser usado não apenas para a quantificação do ácido rosmarínico em produtos a base de alecrim ou outros fitoterápicos que o contenham, mas também para quantificação de outros marcadores; contribuindo para a avaliação e garantia da qualidade de produtos vegetais; vindo a atender exigências e suprir necessidades do setor, tão carente de metodologias que facilitem e agilizem suas rotinas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, S.M.L.; Villamil, R.F.V.; Neto, A.A.; Aranha, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processo de eletrodo. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.813-817. 2004.
- Albu, S.; Joyce, L.; Paniwnyk, L. Lorimer, J.P.; Mason, T.J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrason. Sonochem.**, v.11, p.261-265. 2004.
- Almela, L.; Sánchez-Muñoz, B.; Fernández-López, J. A.; Roca, M. J.; Rabe, V.; J. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **J.Chromatogr., A.**, v.1120, n. 1-2, p.221-229. 2006.
- Al-Sereiti, M. R.; Abu-Amer, K. M.; Sen, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutical potential. **Indian J. Exp. Biol.**, v.37, n.1, p.124-131, 1999.
- Andrade, C.A.; Costa, C.K.; Bora, K.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Kerber, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.2, p.231-235, 2007.
- Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutat. Res., Fundam. Mol Mech. Mutagen.**, v.523-524, p.9-20, 2003.
- Bara, M. T. F.; Ribeiro, P. A. M.; Arantes, M. C. B.; Amorim, L. L. S. S.; Paula, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, n.6, p. 211-215. 2006
- Bara, M. T. F.; Serrano, S. H. P.; Asquieri, E. R.; Lúcio, T. C.; Gil, E.S. Medida del potencial anódico en estado sólido: una herramienta para La determinación Del potencial antioxidante de fitoterápicos. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.27, n.1, p.89-92, 2008.
- Baskan, S.; Oztekin, N.; Erim, F. B. Determination of carnosic and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. **Food Chem.**, v.101, n.1, 1748-1752, 2007.

Box, M.; Gordon, W.; Hunter, J. S.; In: **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. John Wiley & Sons, New York, 1978.

BRASIL, **Decreto nº 5813** de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22681&word=> > Acesso em 20/05/2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – **RDC nº 14** de 05 de abril de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em :< <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=> > Acesso em 28/05/2010

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – **Resolução nº 899** de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil], Brasília, DF. Disponível em :< <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=> > Acesso em 20/05/2010.

Brett, A.M.O.; Brett, C.M.A. Técnicas de Degau e Impulso. In **Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações**. 1 ed. , Coimbra, Portugal, Almedina, 1996, Cap.10.

Brett, A.M.O.; Ghica, M.E. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, v.15, n.22, p.1745-1750. 2003.

Brito, N.M.; Junior, O.P.A.; Polese, L.; Ribeiro, M.L. Validação de método analítico: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146. 2003.

Brown, G.N.; Birks, J.W.; Koval, C.A. On plate electrochemical detection for thin layer chromatography. **Anal. Lett.**, v.22, no.2, p.507-518, 1989.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutical agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.2, p.179-189. 2000.

Canelas, V.; Costa, C. T. Quantitative HPLC analysis os rosmarinic acid in extracts of *Melissa officinalis* and spectrophotometric measurements of their antioxidant activities. **J. Chem. Educ.**, v.84, n.9, p.1502-1504, 2007.

Cao, H.; Cheng, W.X.; Li, C.; Pan, X.L.; Xie, X.G.; Li, T.H. DTF study on the antioxidant activity os rosmarinic acid. *Journal of Molecular Structure*. **THEOCHEM.**, v.79, n.1, p.177-183, 2005.

Celiktas, O.Y.; Bedir, E.; Sukan, F.V. *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. **Food Chem.**, v.101, p.1457-1464. 2007.

Centeno, L.M.M. Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (romero). **Stud. bot.**, v.21, n.1, p.105-118. 2002.

Chevion, S.; Berry, E.; Kitrossky, N.; Kohen, R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. **Free Radical Biol. Med.**, v.22, n.1, p.411-421, 1997

Chevion, S.; Or, R.; Berry, E. M. The antioxidant status of patients subjected to total body irradiation. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v.47, n.1, p.1019-1027, 1999.

Chevion, S.; Roberts, M.; Chevion, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biol. Med.**, v.28, n.6, p.860-870, 2000.

Consorti, C.S.; Souza, R.F.; Dupont, J. Suarez, P.A.Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Quim. Nova**, v.24, n.6. 2001.

Corduneanu, O.; Janeiro, P.; Brett, A.M.O. On the electrochemical oxidation of resveratrol. **Electroanalysis**, v.18, n.8, p.757-762. 2006.

Corsino, J.; Silva, D. H. S.; Zanoni, M. V. B.; Bolzani, V. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**. v.7, n.8, p. 913-916, 2003.

Cosio, M.S.; Buratti, S.; Mannino, S.; Benedetti, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. **Food Chem.**, v.97, p. 725-731, 2006.

Del Baño, M.; Lorente, J.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Del Rio, j.; Ortuño, A.; Quirin, K. W.; Gerard, D. Phenolic diterpenes, Flavones and rosmarinic acid distribution during development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.1, p.4247-4253. 2003

Dubois, M.; Bailly, F.; Mbemba, G.; Mouscadet, J. F.; Debyser, Z.; Witvrouw, M. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. **J. Med. Chem.**, v.51, n.8, p.2575-2579. 2008.

Erkan N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chem.**, v. 110, p.76-82, 2008.

Fan, X.H.; Cheng, Y.Y.; Ye, Z.L.; Lin, R.C.; Qian, Z.Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Anal. Chim. Acta**, v.555, p.217-224, 2005.

Farmacopéia Portuguesa, 8 ed.; Lisboa, Infarmed, p.765-766. 2005

Fecka, I.; Raj, D.; Krauze-Baranowska, M. Quantitative determination of four compounds in herbal drugs from Lamiaceae using different chromatographic techniques. **Chromatographia**, v.66, n.1-2, p.87-93. 2007a.

Fecka, I.; Turek, S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.10908-10917. 2007b.

Ferenczi-Fodor, K.; Végh, Z.; Nagy-Turak, A. Validation and quality assurance of planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.84, n.4, p.1265-1276, 2001.

Franzoi, A.C.; Dupont, J.; Spinelli, A.; Vieira, I.C. Biosensor based on laccase and na íon liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta**, v.77, n.4, p.1322-1327, 2009.

Genena, A. K.; Hense, H.; Smânia-Junior, A.; Souza, S. M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities af extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v.28, n.2, p. 463-469, 2008.

Ghica, M.E.; Brett, A.M.O. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis**, v.17, n.4, p.313-318. 2004.

Gil, E. S.; Serrano, S. H. P.; Bara, M. T. F.; Lucio, T. C.; Gonçalves A. L. S.; Matos, J. R. Sistema Eletroanalítico para Identificação de Matérias-Primas Vegetais Pulverizadas. Patente *Br. PI 106048846*, 2006.

Gonçalves, D.; Couto, R. O.; Conceição, E. C.; Reis, N. S.; Gil, E. S. Voltametria de pulso diferencial (vpd) em estado sólido de manchas de cromatografia de camada delgada (ccd): um novo método de análise para fitoativos antioxidantes. **Quim. Nova**, v.210, n.10. 2010.

Goodrich, G. A.; Burrell, H. R.; Micromeasurement of nucleoside 5'-triphosphates using coupled bioluminescence. **Anal. Biochem.**, v.127, n.2, p. 395-401. 1982.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Aruoma, O.I. The characterization of antioxidants. **Food. Chem. Toxicol.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

Halliwell, Barry. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem. J.**, v.401, n.1, p.1-11, 2007.

Harbone, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. **Nat. Prod. Rep.**, v.18; p.361-379. 2001.

Heath, D. Herbal monographs: Rosemary. In **Physitian's Desk References: PDR for Herbal Medicines**, 4 ed. Thompson, EUA, 2000.

Hernández-Hernández, E.; Ponce-Alquicira, E.; Jaramillo-Flores, M.E.; Legarreta, I.G. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v.81, p.410-417, 2009.

Herrero, M.; Arraéz-Román, D.; Segura, A.; Kenndler, E.; Gius, B.; Raggi, M.A.; Ibañez, E.; Cifuentes, A. Pressurized liquid extraction – capillary electrophoresis – mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in Rosemary extracts. **J. Chromatogr., A.**, v.1084, n.1, p.54-62, 2005.

Herrero, M.; Plaza, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-

performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **J. Chromatogr., A.**, v.1217, p.2512-1220, 2010.

Huang, S. S.; Zheng, R. L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer Lett.**, v.239, n.2, p. 271-280, 2006.

Janeiro, P.; Brett, A.M.O. Catechin electrochemical oxidation mechanism. **Anal. Chim. Acta.**, v.518, p.109-115. 2004.

Janicsák, G.; Mahté, I. Parallel determination of rosmarinic and caffeic acids by TLC-densitometry. **Chromatographia**, v.46, n.5/6, p.322–324, 1997.

Justo, O.R.; Moraes, A.M.; Barreto, G.P.M.; Mercadante, A.Z.; Rosa, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Quim Nova**, v.31, n. 7, p.1699-1705, 2008.

Kivilompolo, M.; Hyötyläinen, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterization and quantification of antioxidant phenolic acid. **J. Chromatogr., A.**, v.1145, n.1-2, p.155-164. 2007.

Komorsky-Lovric, S.; Horvat, A. J. M.; Ivankovic, D. Characterization of bronzes by abrasive stripping voltammetry and thin layer chromatography. **Croatica Chemica Acta CCACAA.**, v.79, n.1, p.33-39, 2006.

Korotkova, E.I.; Avramchik, O.A.; Yusubov, M.S.; Belousov, M.V.; Andreeva, T.I. Determination of the antioxidant activity of plant extracts by means of cathode voltammetry. **Pharm. Chem. J.**, v.37, n.9, p.55-56, 2003.

Lee, J.; Kim, Y.S.; Park, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochem. Pharmacol.**, v.74, n.7, p. 960-968, 2007.

Luis, J.C.; Johnson, C.B. Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in Rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. **Spanish Journal of Agricultural Research.**, v.3, n.1, p.106-112, 2005.

Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

Martinez, S.; Valek, L.; Resetic, J. Ruzic, F. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – comparison with the DPPH and TAS. **Spectrophotometric Methods**, v.588, p.68-73, 2006.

Matkowski, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – a review. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p. 548-560, 2008.

Mayer, A.M.; Staples, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v.60, n.6, p.551-565. 2002.

Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K. Cromatografia em camada fina. In **Vogel – Análise Química Quantitativa**. 6.ed. TC, Rio de Janeiro. 2002

Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; Nakagawa, L. E.; Luchini, L. C. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada. **Quim. Nova**, v.25, n.2, p.196-202, 2002.

Nicola, A. J.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. Direct quantitative analyses from thin layer chromatography plates using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Appl. Spectrosc.**, v.50, n.12, p.1479-1482, 1996.

Oliveira, L.C.P.; Mause, R.; Nunomura, S.M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p. 1439-1442, 2005.

OMS- World Health Organization; **WHO Policy Perspectives on Medicine** 2002, 2, 1.

Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Sanbongi, C.; Kato, Y.; Osawa, T.; Yoshikawa, T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens* reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v.33, n.6, p. 798-806, 2002.

Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Yoshikawa, T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. **Carcinogenesis**, v.25, n.4, p.549-557. 2004.

Paniwnyk, L.; Cai, H.; Albu, S.; Mason, T.J.; Cole, R. The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. **Ultrason. Sonochem.**, v.16, p.287-292, 2009.

Parnham, M.J.; Kesslerling, K. Rosmarinic Acid. **Drugs of the Future**. V.10, p.756-757, 1985.

Peng, Y.; Ye, J.; Kong, J. Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **J. Agric. Chem.**, v.53, n.21, p.8141-8147, 2005.

Peng, Y.; Yuan, J.; Liu, F.; Ye, J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.30, n.1, p.431-437, 2005.

Petersen, M.; Simmonds, M. S.J. Molecules of interest – rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v.62, n.2, p. 121-125, 2003.

Petrovic, S. C.; King, D. F.; Dewald, H. D. Electrochemical detection in thin-layer chromatography (TLC): a review and application of direct on-plate square-wave anodic stripping voltammetry for TLC. **Electroanalysis**, v.10, n.6, p.393-398, 1998.

Rapta, P.; Misik, V.; Stasko, A.; Vrabel, I. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. **Free Radical Biol. Med.**, v.18, n.5, p. 901-908, 1995.

Reis, N.S.; Serrano, S. H. P.; Meneghati, R; Gil, E. S. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.6, p.949-953, 2009.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780. 2004.

Riccardi, C.S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H. Imunossensor amperométrico. **Quim. Nova**, v.25, n.2, p.316-320, 2002.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

Roldán-Gutiérrez, J.; Ruiz-Jiménez, J.; Luque de Castro, M.D. Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. **Talanta**, v.75, p.1369-1375. 2008.

Sánchez-Campillo, M.; Gabaldon, J.A.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Del Baño, M.J.; Alcaraz, M.; Vicente, V.; Alvarez, N.; Lozano. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food Chem. Toxicol.**, v.47, n.2, p.386-392, 2009.

Santhiago, M.; Peralta, R. A.; Neves, A.; Micke, G A.; Vieira, I. C. Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic. **Anal. Chim. Acta**, v.613, n.1, p. 91-97, 2008.

Schenkel, E.P.; Gosman, G.; Petrovick, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões (Coord.) et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre-RS, UFRGS, 2004, p.371-400.

Schibli, A.; Reich, E. Modern TLC: a key technique for identification and quality control of botanicals and dietary supplements. **J. Planar Chromatogr. -Mod.TLC**, v.18, n.101, p. 34-38, 2005.

Serrano, S. H. P.; Machado, S. A. S.; Gil, E. S. In Gil, E.S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3. ed., Pharmabooks, São Paulo 2010 cap.24.

Shaw, P. D.; Ping, G.; Daly, S. L.; Cha, C.; Cronan JR., J. E.; Rinehart, K. L. Detecting and characterizing n-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v.94, n.12, p.6036-6041, 1997

Shimadzu High Performance Liquid Chromatography Workstation, Shimadzu Incorporation, Toquio, Japão, 2008.

Silva, F.A.M.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

Skoog, D.A; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Química eletroanalítica. In: **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed., Artmed S.A., São Pulo, 2002.

Souza, M.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, v.20, n.2, p.191-195. 1997.

Sun, P.; Mirkin, M. V. Electrochemistry of individual molecules in zeptoliter volumes. **J. Am. Chem. Soc.**, v.130, n.26, p.8241-8250. 2008.

Takeda H.; Tsuji, M.; Inazu, M.; Egashira, T.; Matsumiya, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.449, n.3, p.261-267. 2002.

Tawaha, K.; Alali, F.Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; EL-Elmat, T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. **Food Chem.**, v.104, n.4, p.1372-1378. 2007.

Tepe, B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. **Bioresour. Technol.**, v.99, n.6, p.1584-88. 2008.

Thorsen, M.A.; Hildebrandt, K.S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts Aspects of accurate quantification. **J. Chromatography, A**. Brabrand, Dinamarca, v.995, n.1, p.119-125. 2003.

Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v.140, p.19-26. 1994.

Tóth, J.; Mrlianová, M.; Tekel'ová, D.; Kerenová, M.; Tomus L. Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, v.50, p.139-146. 2003.

Troncoso, N.; Sierra, H.; Carvajal, L.; Delpiano, P. Gunther, G. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh Rosemary. **J. Chromatography, A**, v.1100, n.1, p.20-25. 2005.

Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chem.**, v.87, n.1, p.307-311. 2004.

Wen, D.; Li, C.; Di, H.; Liao, Y.; Liu, H. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.17, p.6624-6629. 2005.