

Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar

(Saccharum officinarum L.)

Fabiana Cristina Vila

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Harumi Yariwake

São Carlos
2006

Ao Grupo de Análise Fitoquímica, principalmente a professora Janete, por ter

acreditado em mim e me confiado este trabalho.

A Malu, Tati, Éder e Benê, pela companhia de todo este tempo que passamos

juntos, pelas inúmeras manifestações de carinho recebidas, pela felicidade de

ter vocês perto de mim e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A Deus, pela realização deste sonho.

Aos meus pais, pela colaboração.

Ao meu irmão João Ricardo e sua esposa Giseli pela felicidade que me deram com a chegada do meu primeiro sobrinho.

A Dr^a. Renata Colombo, pela amizade e principalmente pela disposição em ajudar no desenvolvimento deste trabalho, não se limitando à distância, finais de semana ou feriados.

Ao Prof. Luis Alberto Avaca, pelas concessões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Joãozinho que me recebeu no GMEME e me auxiliou no início deste trabalho.

A Cidinha pela concessão do laboratório de ensino, onde parte do trabalho foi realizada.

As meninas da biblioteca: Bernadete, Regina e Eliana.

Aos meus amigos Ariane, Diana, Kátia e Wendel pelas horas de alegria e desabafo e pelo incentivo a continuar a caminhada.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei em ombros de gigantes”

Isaac Newton

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

I – INTRODUÇÃO.....	13
I.1- Radicais Livres	13
I.2- Antioxidantes	16
I.3- Compostos fenólicos - Flavonóides	18
I.4- Alimentos Funcionais ou Nutracêuticos	21
I.5- Cana-de-açúcar	22
I.5.1- Estudo dos flavonóides presentes na cana-de-açúcar	23
I.6- Cromatografia em Camada Delgada	25
I.6.1- Reagentes Reveladores em CCD.....	26
I.6.1.1- DPPH.....	26
I.6.1.2- β -caroteno.....	27
I.6.1.3- Difenilborato aminoetanol/PEG400	27
I.7- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	29
II – OBJETIVOS.....	32
III – MATERIAIS E MÉTODO.....	33
III.1- Material vegetal.....	33
III.2- Materiais	33

III.3-Extração dos flavonóides das folhas da cana-de-açúcar e da garapa.....	35
III.4- Condições de análise por CLAE.....	35
III.4.1- Método overloading.....	37
III.5- Condições de análise por CCD.....	37
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
IV.1- Detecção e identificação dos flavonóides com atividade antioxidante das folhas da cana-de-açúcar.....	39
IV.2- Detecção e identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da garapa.....	50
V – CONCLUSÕES GERAIS.....	59
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química geral de um flavonóide.....	19
Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides identificados na cana-de-açúcar.....	23
Figura 3. Captura/seqüestro de radicais pelos flavonóides.....	27
Figura 4. Reação de derivatização de um flavonóide (1) com o difenilborato-aminoetanol ..	28
Figura 5. Esquema de um cromatógrafo CLAE.....	29
Figura 6. Esquema de um detector de UV por arranjo de diodos.....	31
Figura 7. Esquema de extração de flavonóides das folhas da cana-de-açúcar e da garapa.....	35
Figura 8. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,4 mL/min	39
Figura 9. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,2	40
Figura 10. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,0 mL/min.....	40
Figura 11. Representação esquemática da análise por CCD. Revelador: solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano.....	41
Figura 12. Representação esquemática da análise por CCD. Revelador: solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano.....	42
Figura 13. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extratos das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item III.4, método “overloading”.....	42
Figura 14. Representação esquemática da análise por CCD do extrato das folhas da cana-de-açúcar e das frações coletadas. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1) e revelador difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366$ nm.....	43
Figura 15. Representação esquemática da análise por CCD do extrato das folhas da cana-de-açúcar e das frações coletadas. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366$ nm).....	45
Figura 16. Representação esquemática da análise por CCD. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2%.....	46
Figura 17. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item III.4.....	47
Figura 18. Espectro UV/DAD e estrutura do flavonóide orientina-O-ramnosídeo (1) ($t_R = 15,127$ min)	48

Figura 19. Espectros UV/DAD dos flavonóides presentes nas folhas da cana-de-açúcar. Identificação conforme picos assinalados no cromatograma da Figura 17.....	49
Figura 20. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4.....	50
Figura 21. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4, método “overloading”.....	51
Figura 22. Representação esquemática da análise por CCD das frações do extrato da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366$ nm).....	52
Figura 23. Representação esquemática da análise por CCD das frações do extrato da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2 %.....	53
Figura 24. Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato metanólico da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4.....	54
Figura 25. Espectro UV/DAD e estrutura dos flavonóides presentes na garapa que apresentaram atividade antioxidante. Numeração conforme Figura 24 e Tabela 5.....	55
Figura 26. Espectro UV/DAD e estrutura dos flavonóides presentes na garapa que apresentaram atividade antioxidante. Numeração conforme Figura 24 e Tabela 5.....	56
Figura 27. Espectros UV/DAD dos flavonóides presentes na garapa, correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 24.....	56
Figura 28. Representação esquemática da análise por CCD das frações do microfracionamento da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2 %.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estrutura dos flavonóides identificados na cana-de-açúcar e apresentados na Figura 2	24
Tabela 2. Condições cromatográficas para a análise por CLAE dos flavonóides da cana-de-açúcar.	36
Tabela 3. Teste de sensibilidade dos reagentes de CCD utilizados neste trabalho.....	44
Tabela 4. Flavonóides presentes no extrato das folhas da cana-de-açúcar correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 17.....	47
Tabela 5. Flavonóides presentes no extrato da garapa	54

Lista de Abreviaturas e Símbolos

λ - comprimento de onda

% - porcentagem

°C – graus centígrados

® - marca registrada

CCD – cromatografia em camada delgada

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – detector de arranjo de diodos

EM – espectrometria de massas

MeOH – metanol

min – minuto

PEG – polietilenoglicol

PTFE – politetrafluoretileno

R_F – fator de retenção

t_R – tempo de retenção

UV-vis – ultravioleta-visível

Resumo

No presente trabalho estudou-se por métodos analíticos (CCD e CLAE/UV) a atividade antioxidante dos flavonóides presentes na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), visando sua possível utilização como alimento funcional. As técnicas CLAE/UV e microfracionamento por CLAE permitiram o fracionamento e o isolamento dos flavonóides, os quais foram analisados por CCD utilizando reagentes específicos para detecção de substâncias antioxidantes. Os resultados obtidos permitiram identificar os flavonóides da cana-de-açúcar (folhas e garapa) com atividade antioxidante, através da comparação dos espectros de UV/DAD e tempo de retenção: orientina-O-ramnosídeo nas folhas e schaftosídeo, isoschaftosídeo, diosmina-8-C-glicosídeo, orientina e 4',5'-di-O-metil-luteolina-8-C-glicosídeo na garapa. Estes resultados justificam estudos nutricionais e/ou farmacológicos mais aprofundados a fim de classificar (ou não) a cana-de-açúcar como alimento funcional

Abstract

In the present study, analytical methods (TLC and HPLC/UV) were used to evaluate the antioxidant activity of the flavonoids of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) regarding to its possible use as a functional food. HPLC/UV and HPLC micro-fractionation techniques allowed fractionation and isolation of the flavonoids, which were evaluated by TLC using specific reagents to detect the antioxidant compounds. The results allowed to identify the flavonoids of sugar cane with antioxidant activity, based on comparison of UV-DAD spectra and retention time: orientin-O-rhamnoside in the leaves and schaftoside, isoschaftoside, diosmetin-8-C-glycoside, orientin and 4'-5'-dimethyl-luteolin-8-C-glycoside in the juice. These results justify more detailed nutritional and pharmacologic studies to classify (or not) sugar cane as a functional food.

I – Introdução

I.1 - Radicais

É comum encontrarmos em textos científicos a expressão “radical livre”, a qual vem da tradução do inglês *free radical*. Esta expressão não é quimicamente correta, pois todo radical apresenta em sua última camada elétrons livres. Para podermos entender o que é um radical, devemos lembrar que os elétrons de um átomo estão distribuídos em níveis e em subníveis de energia. Nestes subníveis, os elétrons ocupam orbitais e apresentam spins, isto é, momento magnético, os quais são expressos pelos números quânticos $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. De acordo com o princípio de Pauli, dois elétrons ocupando o mesmo orbital, apresentam spins opostos e, portanto, o momento magnético é zero para espécies com elétrons pareados. Entretanto, nos radicais, existe um saldo no momento magnético, pois estas espécies apresentam número ímpar de elétrons na última camada, tornando-as então espécies paramagnéticas (1). Desta forma, utilizaremos neste trabalho o termo **radical** para se referir a essas espécies.

Portanto, podemos definir radical como toda espécie capaz de existir independentemente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. São instáveis e de meia-vida muito curta (de minutos a nanossegundos), reagindo rapidamente com diversos compostos e alvos celulares, podendo danificar DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos. Por este motivo, os radicais e/ou espécies reativas de oxigênio (ERO) são citados no envolvimento de grande número de doenças que afetam o ser humano, como aterosclerose, isquemia, doenças auto imunes e inflamatórias crônicas além de serem considerados como causa do envelhecimento (1-11). Em muitas destas doenças a natureza da espécie radicalar não é conhecida, tornando-se difícil o desenvolvimento de fármacos com propriedades antioxidantes, impedindo sua reação e evitando a propagação de lesões.

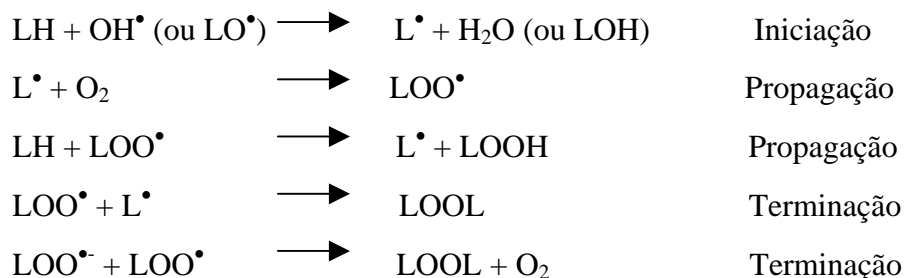
Os radicais podem ser gerados através de várias fontes como radiação solar, metabolismo de oxigênio, respiração mitocondrial e reações metabólicas intra e extracelulares.

O elétron livre que caracteriza o radical pode estar localizado em um átomo de oxigênio, nitrogênio, carbono ou enxofre, os quais podem ser encontrados na natureza como poluentes atmosféricos e também sintetizados pelo organismo, podendo ser classificados como agente oxidante fraco ou como potentes oxidantes (2-5). A formação de radicais *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante o processo de transferência de elétrons que ocorre no metabolismo celular aeróbio. O oxigênio sofre redução tetravalente resultando na formação de água. Durante este processo são formados intermediários reativos como o radical superóxido (O_2^{\bullet}), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Portanto a toxicidade do oxigênio decorre da formação dessas espécies reativas que podem interagir e lesar diversas biomoléculas e estruturas celulares. Em condições normais, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa devido à existência de enzimas antioxidantes que as removem ou impedem sua formação.

O radical superóxido isoladamente é pouco reativo em solução aquosa e seus efeitos nocivos estão mais relacionados aos seus derivados principalmente ao peróxido de hidrogênio e ao radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio é um potente oxidante, mas suas reações com compostos orgânicos são lentas. O radical hidroxila pode ser formado a partir de radiações ionizantes ou de interações entre o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e metais de transição, podendo reagir rapidamente com compostos orgânicos e inorgânicos.

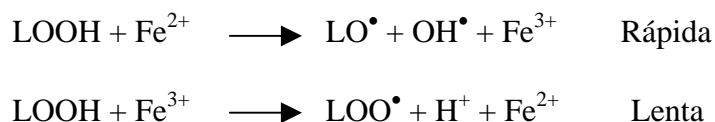
Um dos efeitos mais destrutivos das ERO é a iniciação da peroxidação lipídica, que pode levar à destruição da membrana celular, com graves repercussões metabólicas, sendo este um dos eventos oxidativos mais frequentes em nosso organismo (2-8).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão representadas nas reações a seguir onde L representa o lipídeo (2,4,7):



A iniciação ocorre com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Este seqüestro pode ser realizado pelos radicais hidroxila (OH^\bullet) ou alcoxila (LO^\bullet) formando o radical lipídico (L^\bullet). A propagação da reação se dá quando o radical lipídico reage com oxigênio formando o radical peroxila (LOO^\bullet) que por sua vez reage com uma nova molécula de ácido graxo formando novo radical lipídico. O término desta reação ocorre quando dois radicais reagem entre si ou com um agente antioxidante formando compostos eletricamente neutros.

A lipoperoxidação pode ainda ser catalisada por íons ferro, presentes no organismo, convertendo o hidroperóxido lipídico (LOOH) em radicais altamente reativos como alcoxila (LO^\bullet) e peroxila (LOO^\bullet) que por sua vez iniciam uma nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações podem ser rápidas ou lentas dependendo da valência do ferro (2-5,8,9):



I.2 - Antioxidantes

Uma ampla definição para antioxidante pode ser: “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidante, retarda ou inibe o processo de oxidação”(12,13).

Do ponto de vista biológico, define-se antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra efeitos potencialmente lesivos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares (2,3,17).

Os antioxidantes são classificados quanto ao modo de ação, podendo reagir com radicais ou íons metálicos capazes de catalisar a oxidação lipídica ou reagir com oxigênio (3,4,7). Podem pertencer ao sistema de defesa primário, formado por substâncias como enzimas, quelantes e proteínas, as quais impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas, bloqueando a etapa de iniciação radicalar. Podem também pertencer ao sistema de defesa secundária, formada por compostos fenólicos como tocoferóis, tocotrienóis e flavonóides, os quais bloqueiam a etapa de propagação, reagindo com radicais intermediários como peroxil e alcoxil. O sistema de defesa terciário atua reparando as lesões oxidativas do DNA, proteínas ou lipídeos por proteases e lípases (2,3,14-16)

As enzimas antioxidantes, representadas por superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase e catalase, entre outras, participam das reações responsáveis por manter as ERO em baixas concentrações intracelulares. Quando há um excesso de radicais no organismo causados pelo desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, ocorre o estresse oxidativo.

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser exemplificados pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathione, melatonina, α -tocoferol (vitamina E), tocotrienóis, carotenóides e polifenóis, entre outros (2-5, 9)

A glutatona é um tripeptídeo formado por resíduos da glicina, cisteína e ácido glutâmico. Atua diretamente como antioxidante sequestrando radicais hidroxila (OH^\bullet) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O α -tocoferol é importante na proteção das membranas celulares. Ele suprime o oxigênio singlete, e sequestra radical hidroxila e radicais superóxido (O_2^\bullet). Entretanto, sua principal ação antioxidante consiste em interromper a fase de propagação da lipoperoxidação lipídica, doando um H^+ para o radical alcóxila e peróxila, derivados da oxidação dos ácidos graxos, interrompendo assim a cadeia radicalar (13,17).

Os carotenóides fazem parte de um grupo de substâncias com várias características estruturais e atividades biológicas, como precursores pró-vitamina A (retinol) e supressores do oxigênio singlete. Como antioxidante, os carotenóides atuam na fase de propagação da lipoperoxidação lipídica e são obtidos pelo organismo humano através da dieta alimentar (3,15-18).

Os antioxidantes naturais estão recebendo maior atenção por poderem representar uma alternativa às substâncias sintéticas como o BHT (butilhidroxitolueno) ou BHA (butilhidroxianisol), usadas como conservantes alimentares (1,15,22,23) e como modelos para o desenvolvimento de novas drogas com o propósito de auxiliar o tratamento de doenças graves (1,2,17). Além disso, estudos recentes vêm demonstrando que há um grande interesse nos antioxidantes naturais, principalmente nos polifenóis presentes em plantas medicinais e alimentícias, pois são eficientes no combate e prevenção das doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo (17-21).

I.3 – Compostos Fenólicos - Flavonóides

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e também da tirosina. Quimicamente, os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, incluindo seus derivados. Existe uma grande variedade de compostos fenólicos, incluindo os fenóis simples, derivados do ácido benzóico, ligninas e flavonóides entre outros. (24).

Os flavonóides são uma classe muito extensa de produtos naturais distribuída no reino vegetal. Estão presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células. Ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos). Muitos são coloridos (amarelos), atuando na atração de insetos para a polinização das plantas. Essa ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, possui importantes propriedades farmacológicas que atuam sobre o sistema biológico, tais como ação antioxidante, antiinflamatória, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (25-28).

Os flavonóides são derivados das flavonas e ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, isto é, são dois anéis aromáticos, ligados por três carbonos que podem ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes.

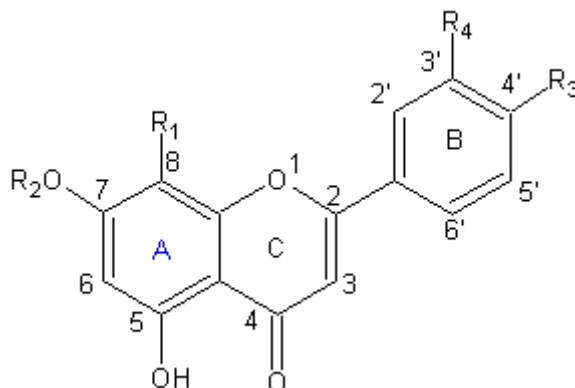


Figura 1 – Estrutura química geral de um flavonóide.

Na biossíntese das várias classes de flavonóides, eles podem sofrer várias modificações: adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonóides, dimerização (produzindo biflavonóides), glicosilação de grupos hidroxila (produzindo *O*-glicosídeos) ou do núcleo dos flavonóides (produzindo *C*-glicosídeos) (25,26).

Os flavonóides são classificados em 10 classes de compostos, de acordo com seu processo de formação: antocianinas, leucoantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavanonas e isoflavonas. Possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligadas à sua estrutura (25-30). São levemente ácidos e como são compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água. Podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio. Apresentam intensa absorção no UV, exibindo duas bandas: banda I (320-385 nm) representando a absorção do anel B e banda II (250-285 nm), correspondente à absorção do anel A. (25,28).

Dentre os interesses farmacêuticos, os flavonóides têm lugar de destaque devido às propriedades antitumorais, antialérgicos, antiinflamatórios e antivirais, sendo atualmente estudados no combate à AIDS (21,25-29).

Devido à capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os flavonóides tem sido considerado potentes antioxidantes naturais. Isto se deve aos grupos hidroxila ligados à estrutura do anel. A atividade antioxidante dos flavonóides geralmente aumenta com o aumento dos grupos hidroxilas e diminui nas glicosilações. Isso porque os flavonóides são doadores de elétrons/ H^+ devido à redução dos diversos grupos hidroxila presentes em sua estrutura. Outro fator que aumenta o potencial antioxidante do flavonóide é a presença da estrutura o-di-hidroxila no anel B, a presença da ligação dupla 2-3 em conjugação com a função oxo no C4 do anel C e a presença de grupos OH no C3 e C5 e função oxo no C4 nos anéis A e C. Estes fatores favorecem a deslocalização de elétrons nos núcleos aromáticos, permitindo assim a estabilidade da molécula (21,25,31,32)

Acredita-se que os flavonóides, quando ingeridos de forma regular através da alimentação diária, podem auxiliar na prevenção de doenças do sistema cardiovascular. Esses compostos são muito importantes para o sistema circulatório, uma vez que regulam a permeabilidade capilar, impedindo a saída de proteínas e células sanguíneas, permitindo o fluxo constante de oxigênio, dióxido de carbono e de nutrientes essenciais (25,29).

As classes de flavonóides mais abundantes na cana-de-açúcar são as flavonas e seus derivados metilados e glicosilados, estando presentes tanto os *O*-glicosídeos como os *C*-glicosídeos (33,34).

I.4 – Alimentos Funcionais ou Nutraceuticos

A nomenclatura “alimentos funcionais” foi criada no Japão em 1980, e foi definida como qualquer alimento que tenha impacto positivo na saúde individual, na performance física ou no estado mental, em adição aos seus valores nutritivos (35).

Conceituar alimentos funcionais e nutraceuticos é difícil e polêmico. É possível, porém, adotar uma definição de trabalho que permita a comunicação e estabelecer idéias centrais sobre o assunto. Assim, a mídia, pesquisadores e consumidores têm seguido os termos criados pelo “International Food Information Council” em 1995, que atribuiu as seguintes definições (36):

-**Nutraceutico**: qualquer substância que pode ser considerado um alimento ou parte de um alimento e que possui benefícios para a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças.

-**Alimento funcional**: qualquer alimento modificado ou ingrediente do alimento que possuem benefícios para a saúde, além dos nutrientes tradicionais que eles contém.

A dieta alimentar da população está hoje em dia cada vez mais rica em alimentos funcionais e/ou nutraceuticos, que atuam na prevenção de doenças, além de propiciar uma vida mais saudável. Esses alimentos são um promissor campo de estudo, importante social e economicamente, pois permite a identificação de componentes que possuem ações farmacológicas, como por exemplo os flavonóides, e o seu conhecimento permitirá explorar com embasamento científico todo o potencial de saúde de alimentação (37).

I.5 - Cana-de-açúcar

As diversas espécies de cana-de-açúcar conhecidas mundialmente possuem origens diferentes, sendo algumas espécies originárias da Oceania e outras do continente asiático. Pelo seu enorme valor econômico e sua notável difusão geográfica, a cana-de-açúcar se constitui no suporte da maior indústria agrícola do mundo.

A cana-de-açúcar é uma planta alimentícia, perene, da família Gramineae, gênero *Saccharum*. Sua propagação é feita por meio de pedaços dos colmos, contendo 2-3 gemas. O colmo é cilíndrico, ereto, fibroso e rico em açúcar segundo a variedade cultivada. As folhas saem das bases dos nós, são alternas, de coloração verde, compreende uma bainha invaginante com pelos lignificados (38).

Na atualidade a cana-de-açúcar possui uma variedade altamente diversificada. Das seis espécies reconhecidas pelos botânicos (*Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barbari*, *S. robustum*, *S. edule*), a mais plantada no Brasil é a *S. officinarum*, por apresentar baixo conteúdo de fibras e alto conteúdo de sacarose (38,39).

O bagaço é um resíduo fibroso, resultante do caule da cana após a extração do suco. É composto de celulose, hemicelulose e lignina como principais polímeros naturais. É utilizado como combustível na indústria açucareira pelo seu valioso potencial energético e devido à grande quantidade de fibras, tem sido empregado na produção de polpa, papel e produtos aglomerados, além da relevante importância na alimentação animal (40,41).

A cana-de-açúcar vem sendo alvo de pesquisas por ser um produto versátil e possuir um potencial variado e complexo a ser muito explorado em diversas áreas (40).

I.5.1– Estudo dos flavonóides presentes na cana-de-açúcar

No Grupo de Análise Fitoquímica do IQSC-USP, foi anteriormente desenvolvido um trabalho intitulado “Extração e análise cromatográfica (CLAE/UV e CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)”(42). O seu objetivo foi a avaliação do conteúdo de flavonóides presentes nos resíduos de cana-de-açúcar (folha e bagaço), além da garapa, visando a sua extração e possível aplicação na indústria farmacêutica, e para isso foram desenvolvidas técnicas para a extração dos flavonóides das folhas e do bagaço da cana, preparo de amostras e análise cromatográfica.

As amostras obtidas foram submetidas à análise quantitativa por CLAE e apresentaram grande quantidade de flavonóides nas folhas e na garapa, e menor quantidade no bagaço (43).

Através dos métodos cromatográficos CL/EM, CL/EM/EM e CL/UV (44) foram propostas as estruturas dos flavonóides encontrados (Tabela I e Figura 2), concluindo-se a existência de aproximadamente 50 flavonóides em cada amostra estudada (flavonóides glicosilados e agliconas), sendo a principal classe encontrada a das flavonas do tipo C-glicosídeos e O-glicosídeos.

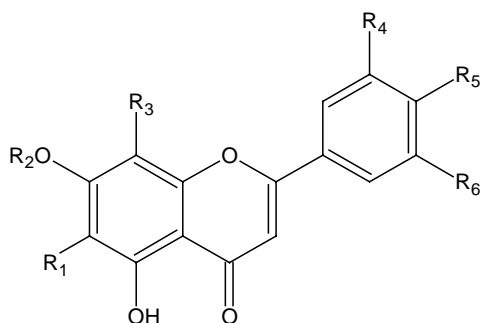
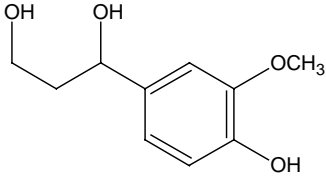


Figura 2: Estrutura geral dos flavonóides identificados na cana-de-açúcar e apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Estrutura dos flavonóides identificados na cana-de-açúcar e apresentados na Figura 2.

Flavonóide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Tricina-7-O-neoesperidosídeo	H	Glicose-Ramnose	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Tricina-4'-O-(treo-glicerilguaiacila) éter-7-O-glucopiranosídeo	H	Glicose	H	OCH ₃		OCH ₃
Tricina-4'-O-(eritro-glicerilguaiacila) éter-7-O-glucopiranosídeo	H	Glicose	H	OCH ₃	Guaiacil gliceril éter	OCH ₃
Tricina-4'-O-(treo-glicerilguaiacila) éter	H	H	H	OCH ₃	Guaiacil gliceril éter	OCH ₃
Tricina-4'-O-(eritro-glicerilguaiacila) éter	H	H	H	OCH ₃	Guaiacil gliceril éter	OCH ₃
Tricina-7-O-glicosídeo	H	Glicose	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Tricina-7-O-ramnosilgalacturonídeo	H	Ramnose - ác.galacturônico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Orientina-8-O-ramnosídeo	H	H	Glicose-ramnose	OH	OH	H
Orientina	H	H	Glicose	OH	OH	H
Vitexina	H	H	Glicose	H	OH	H
Schaftosídeo	Glicose	H	Arabinose	H	OH	H
Isochaftosídeo	Arabinose	H	Glicose	H	OH	H
Diosmetina-8-C-glicosídeo	H	H	Glicose	OH	OCH ₃	H
Diosmetina-8-C-glicosídeo -O-arabinosídeo	H	H	Glicose-arabinose	OH	OCH ₃	H
4',5'-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo	H	H	Glicose	OH	OCH ₃	OCH ₃

I.6 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cromatografia é um método de separação de substâncias em mistura, no qual a amostra interage com duas fases: uma estacionária e outra móvel. Pode ser classificada quanto à natureza física da fase móvel em gás, líquido ou fluido supercrítico; quanto à fase estacionária em tubular ou planar, ou quanto ao mecanismo de separação em adsorção, partição, exclusão ou troca iônica (45,46).

A cromatografia em camada delgada (CCD) substituiu a técnica da cromatografia em papel (CP), apresentando algumas vantagens tais como maior rapidez, melhor resolução, maior sensibilidade e versatilidade, permitindo utilizar uma maior variedade de reagentes de detecção (30, 45,46).

O processo de separação em CCD está fundamentado principalmente no fenômeno de adsorção. A técnica consiste na separação dos compostos de uma mistura através da migração diferencial dos mesmos, sobre uma camada delgada de um adsorvente retido numa superfície plana, geralmente uma placa de vidro (30,45,46). Atualmente existem disponíveis comercialmente placas de vidro ou folhas de alumínio já revestidas com o adsorvente de interesse. Silicagel é o adsorvente mais comum empregado na separação de misturas de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcalóides, terpenos e esteróides, devido à presença dos grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície (46-50).

Outro fator importante para esta técnica cromatográfica é a escolha do sistema de solvente para eluição das placas. Misturas de dois ou três solventes de diferente polaridade, freqüentemente resultam em melhor separação do que solventes quimicamente homogêneos (48,51,53).

A identificação do composto de interesse pode ser realizada através da comparação com um padrão e do fator de retenção R_f . O fator de retenção pode ser definido como a distância percorrida pela amostra sobre a distância percorrida pelo eluente (46,47,49, 51).

Esta técnica cromatográfica é muito utilizada em análises preparativas e como um importante instrumento para isolamento de compostos naturais com atividade biológica ou para a separação e purificação de produtos sintéticos (30,48,52,54).

No presente trabalho a CCD foi utilizada para a análise qualitativa (identificação) dos flavonóides com atividade antioxidante presentes na cana-de-açúcar, através da co-migração com substâncias de referência (padrões) e a reação com o reagente DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (30,54-56) e o β -caroteno (57,58), ambos utilizados para a detecção de substâncias antioxidantes.

1.6.1 – Reagentes Reveladores em CCD

1.6.1.1 - DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O DPPH é um radical estável, disponível comercialmente, e muito utilizado em testes para determinar a potência antioxidante de polifenóis presentes em bebidas e em alimentos (7,20,59-61). Nestes testes, a solução metanólica de DPPH é misturada com a amostra e a reação é monitorada num espectrofotômetro em 515 nm, observando-se o decrescimento da absorvância. O decrescimento de 50% da concentração inicial de DPPH é definido com EC_{50} (20,62,63)

Os testes antioxidantes realizados neste trabalho consistiram na pulverização das placas de CCD com solução 0,2% de DPPH em metanol. A reação entre um flavonóide e um radical, envolve transferência de hidrogênio (H^+) e está representada na Figura 3 (63).

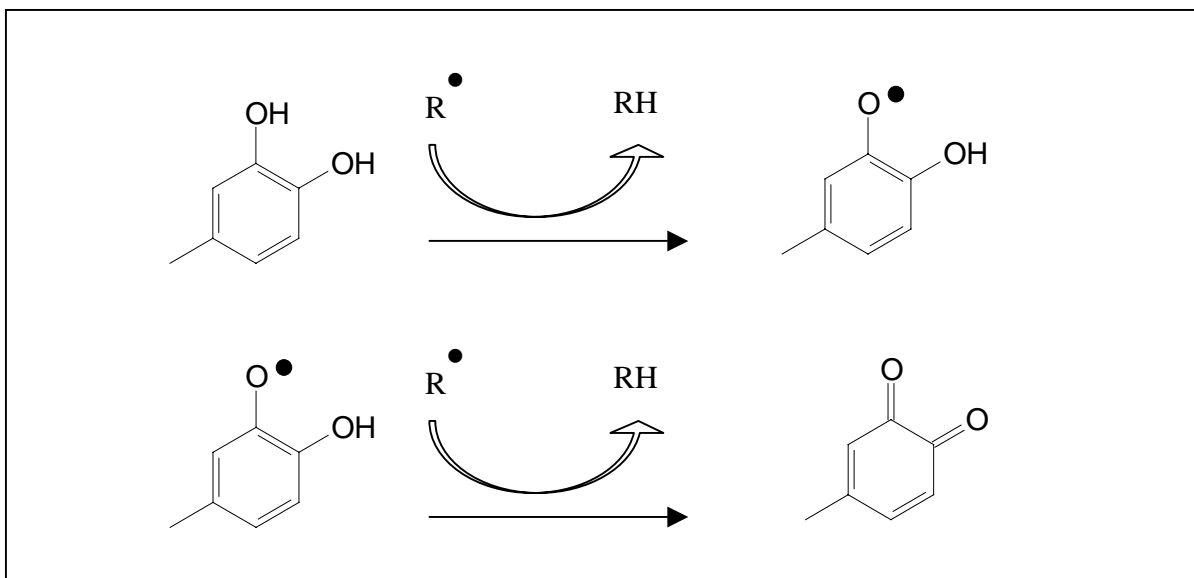


Figura 3: Captura/sequestro de radicais pelos flavonóides.

1.6.1.2 - β -caroteno

Este reagente também é muito utilizado em testes de atividade antioxidante. O teste consiste em adicionar à amostra uma mistura de β -caroteno, ácido linoleico e Tween 40 e monitorar o decréscimo da absorção em espectrofotômetro em $\lambda = 470$ nm (56, 64,65). Em placas de CCD o teste pode ser realizado pulverizando-se solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano (55,57,58).

1.6.1.3 - Difenilborato aminoetanol/PEG 400

O revelador difenilborato aminoetanol é descrito na literatura (66-68) para a revelação de flavonóides em CCD, pois apresenta a vantagem de reagir formando complexos fluorescentes, fornecendo informações estruturais. Quando os flavonóides, em contato com este revelador, são expostos a radiação em $\lambda = 366$ nm, os flavonóides fluorescem com cores características, devido à formação do complexo derivado, como mostra a Figura 4. Este revelador é muito utilizado devido a sua sensibilidade e especificidade. O PEG é geralmente

utilizado como intensificador da fluorescência e deve-se esperar pelo menos 30 minutos para analisar as placas, pois só após este tempo é que a total intensidade da fluorescência se desenvolve (69,70).

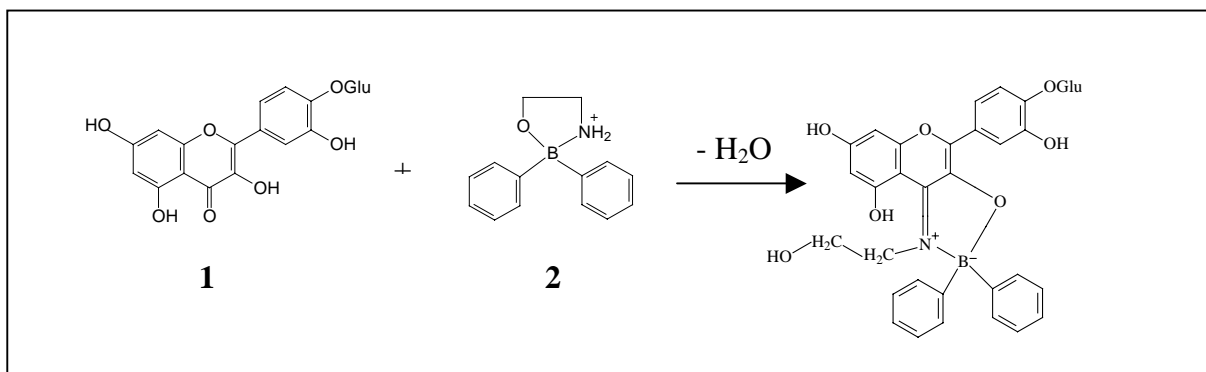


Figura 4: Reação de derivatização de um flavonóide (1) com o difenilborato-aminoetanol (2). (68)

I.7 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida na análise de flavonóides é uma técnica muito utilizada e bastante eficiente na separação destas substâncias, mesmo em misturas complexas (24,45,54).

O equipamento de CLAE consiste de uma bomba de alta pressão, injetor, coluna, detector e um registrador de dados como apresentado na Figura 5. Esta técnica emprega colunas relativamente pequenas (cerca de 2-5 mm de diâmetro interno e comprimento de 3 a 25 cm), operando em temperaturas que chegam até cerca de 75°C e pressões de até 400 atm. Um detector colocado na saída da coluna permite o registro contínuo da composição do efluente, resultando em um cromatograma, no qual torna-se possível identificar e quantificar os flavonóides da amostra (30,46,71).

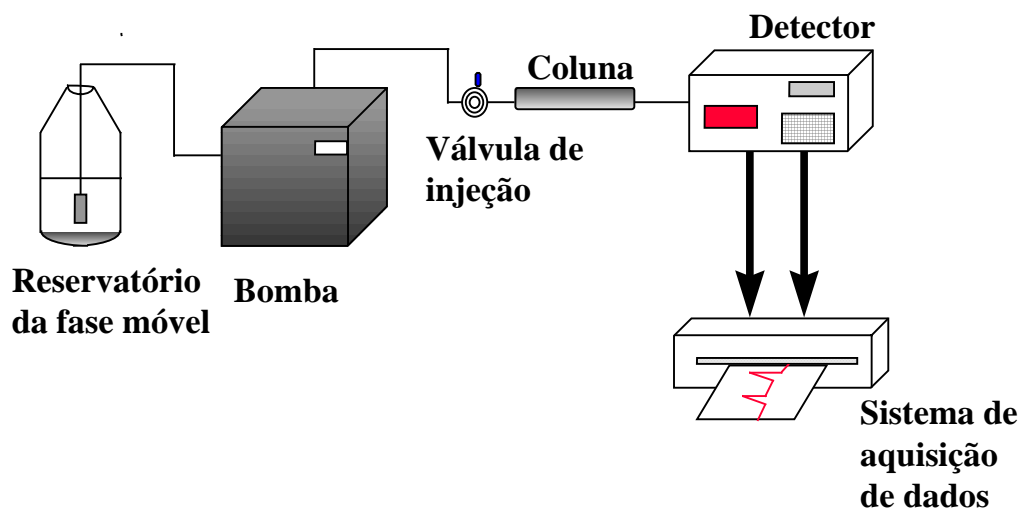


Figura 5: Esquema de um cromatógrafo CLAE

A CLAE pode ser realizada com diferentes tipos de fase estacionária, atuando por adsorção, partição, exclusão ou troca iônica. As colunas mais utilizadas para a análise dos flavonóides são as recheadas com uma fase reversa. Estas fases consistem de cadeias de grupos alquílicos com dezoito átomos de carbono ligados à sílica, que interagem com as moléculas de solvente e soluto, sendo conseqüentemente empregadas com solventes muito polares ou misturas aquosas como metanol/água ou acetonitrila/água. A sílica pode ainda ser tratada com outros grupos que revestem a superfície dos grupos silanóis da sílica, eliminando a forte interação com analitos muito polares e melhorando a separação e a eficiência dos picos (45,71,72).

O modo de eluição dos analitos neste método pode ser realizado de dois modos: isocrático e gradiente. No modo isocrático, a proporção de fase aquosa e de fase orgânica é mantida constante durante toda a análise e é empregada para amostras mais simples. Nos casos em que a amostra é bastante complexa (muitas substâncias), como nos extratos da cana-de-açúcar, é necessário o uso de gradiente de eluição, através de uma programação que altera a proporção de fase aquosa e orgânica durante a análise da amostra, resultando numa melhor separação (45,70,73).

O detector UV-Visível é o mais empregado em CLAE para as análises de flavonóides, especialmente porque estes compostos apresentam duas bandas de absorção bem características no UV (25,28). Existem três tipos diferentes de detectores UV: o detector de comprimento de onda fixo e o detector de comprimento de onda variável e o detector por arranjo de fotodiodos. No primeiro tipo, apenas um comprimento de onda é utilizado, restringindo-se a análises de compostos que absorvam no comprimento de onda que eles trabalham. No detector variável é possível escolher um comprimento de onda mais adequado a cada análise. Estes podem emitir luz ultravioleta por lâmpada de deutério como também na

região do visível, utilizando-se lâmpada de tungstênio, cobrindo uma faixa de 190-800 nm, não havendo necessidade de troca das lâmpadas.

O detector por arranjo de diodos é um tipo de detector de comprimento de onda variável que opera na região do ultravioleta, e torna possíveis análises em diferentes comprimentos de onda simultaneamente, pois possibilitam uma “varredura” na região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, disponibilizando-os mesmo após a análise ter sido realizada.

Neste tipo de detector a grade de refração é alternada e colocada depois da cela de amostra, sendo adicionado um conjunto de fotodiodos onde os comprimentos de onda resultantes são focalizados. Este realiza a varredura do espectro do componente na faixa de 200-800 nm, o qual pode ser armazenado usando um microcomputador. Com este detector, o microcomputador pode produzir um cromatograma a partir de um dado comprimento de onda ou uma série de espectros em intervalos de tempo fixos (45,46,70-73). A Figura 6 representa um esquema do detector de UV por arranjo de diodos utilizado neste trabalho.

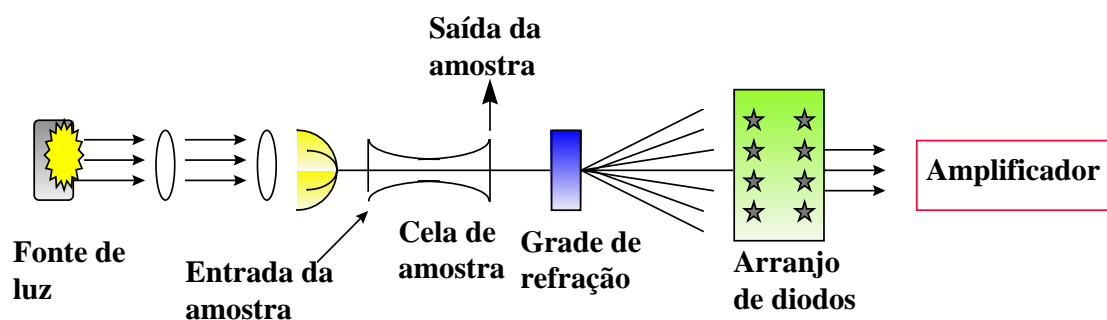


Figura 6: Esquema de um detector de UV por arranjo de diodos.

II – Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a identificação dos flavonóides presentes na cana-de-açúcar (folha e garapa) com atividade antioxidante, utilizando técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV-DAD) combinada com microfracionamento (58,75) e com a técnica de CCD.

As técnicas utilizadas permitiram não só avaliar a atividade antioxidante dos flavonóides como também localizar, dentre os flavonóides já identificados na folha da cana-de-açúcar e na garapa, os que apresentam tal atividade, justificando estudos mais aprofundados com a finalidade de classificar a cana-de-açúcar como possível alimento funcional.

III.1 – Material Vegetal

As folhas da cana-de-açúcar utilizadas neste trabalho são procedentes de uma plantação canavieira de Araraquara-SP, da safra de Janeiro de 1999. São pertencentes à espécie *Saccharum officinarum*, conforme informação obtida pelo engenheiro agrônomo Biaggio Morganti da usina de São Martinho, Pradópolis-SP. A variedade da cana-de-açúcar não pôde ser determinada, por existir uma grande diversidade das variedades cultivadas no Estado de São Paulo.

Todo o material vegetal foi separadamente seco e triturado. A seguir foi peneirado em uma peneira comum e passado por um tamis de 35 mesh, separando-se o material com a granulometria de 0,5 a 1,0 cm. O material vegetal foi estocado em potes de plásticos protegidos da umidade, luz e calor.

A amostra de garapa utilizada é proveniente de uma cultura de cana-de-açúcar sem tratamento com herbicida na Embrapa Agropecuária Sudeste – São Carlos – SP, obtida em novembro de 2005. A garapa foi separada em formas de gelo e estocada no freezer.

III.2 – Materiais

- **Solventes e reagentes:**

Acetato de etila grau p.a (Mallinckrodt Baker), acetonitrila grau HPLC (Tedia), ácido fórmico grau p.a (Merck), água grau HPLC preparada usando sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation), metanol grau HPLC (J.T.Baker), clorofórmio grau p.a (Mallinckrodt Baker), diclorometano grau p.a (J.T.Baker), β -caroteno grau p.a (Sigma), difenilboratoaminoetanol (Aldrich), polietilenoglicol (PEG 400), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Aldrich).

- **Adsorventes:**

Cartucho de extração em fase sólida Oásis HLB[®], da Waters; cromatoplasmas de sílicagel 60 (sem indicador fluorescente), espessura de 0,25 mm (Merck), artigo 5626; cromatofolhas em alumínio de sílicagel 60 (sem indicador fluorescente), espessura de 0,2 mm (Merck) artigo 105553.

- **Colunas:**

Coluna SymmetryShield[®] (Waters) RP-18, dimensões: 250 mm x 4,6 mm x 5 µm e pré-coluna SymmetryShield[®] (Waters) RP-18, dimensões: 12,5 mm x 4,6 mm x 5 µm.

- **Membranas:**

Membrana FH (fluoropore) PTFE 0,5 µm, hidrofóbica (Millipore), membrana PTFE 0,45 µm, hidrofóbica (Waters).

- **Padrões:**

Quercetina – (Sigma), Rutina – (Sigma), Diosmina – (Sigma). Os padrões foram utilizados em solução (100 µg/mL em metanol).

- **Reveladores:**

Como reveladores para as análises de CCD foram utilizadas soluções do reagente difenilboratoaminoetanol e polietilenoglicol (PEG 400) em metanol (66-68), soluções de β-caroteno grau p.a 0,02% em diclorometano (57,58), soluções de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0,2% em metanol (55,58).

III.3 – Extração dos flavonóides das folhas da cana-de-açúcar e da garapa

O método de extração dos flavonóides utilizado neste trabalho foi desenvolvido anteriormente neste grupo, pela Dra. Renata Colombo, em sua tese de doutorado (42) e está esquematizado na Figura 7:

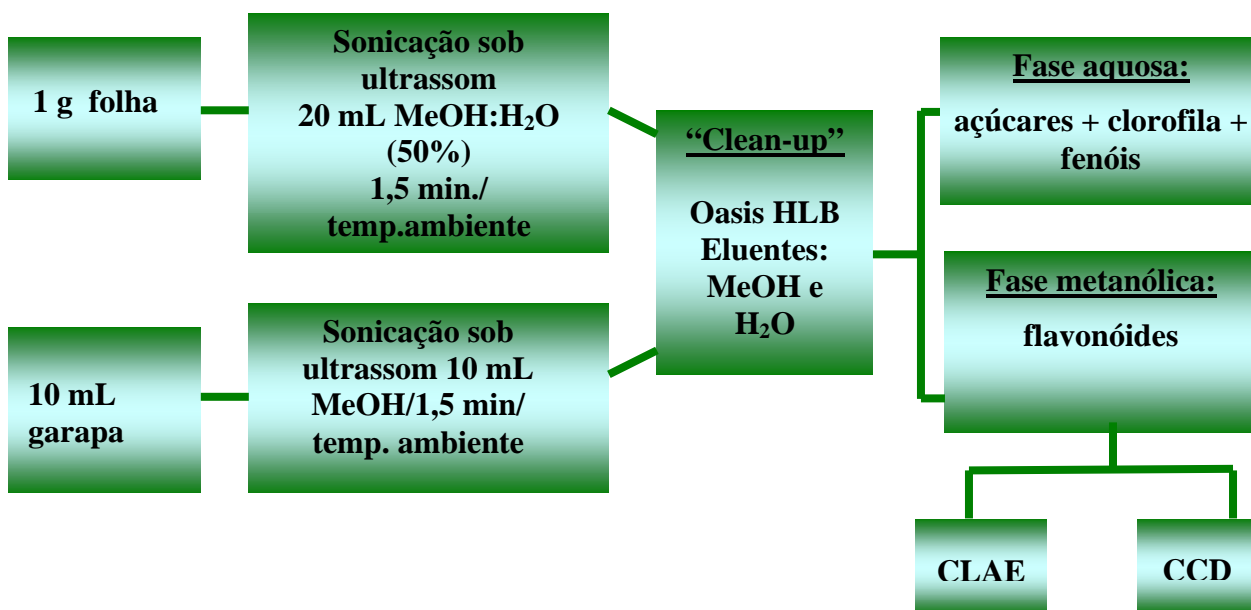


Figura 7: Esquema de extração de flavonóides das folhas da cana-de-açúcar e da garapa.

III.4 – Condições de análise por CLAE

Para este trabalho foi utilizado um cromatógrafo a líquido da Waters Alliance 2695 com detector UV/DAD 2996. As condições de análise por CLAE foram desenvolvidas em trabalho anterior (42) e estão apresentadas na Tabela 2. Houve, porém, necessidade de alteração da vazão da fase móvel devido à mudança do equipamento utilizado neste trabalho.

Tabela 2: Condições cromatográficas para a análise por CLAE dos flavonóides da cana-de-açúcar.

Pré-coluna	Condição
	SymmetryShield® RP18 (12,5 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Coluna	SymmetryShield® RP18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Vazão	1,0 mL/ min.
Temperatura	40 °C
Comprimento de onda (λ)	350 nm
Fase móvel	acetonitrila (B) e ácido fórmico 0,2% em água (A)
Gradiente	0-8 min.: 10-13% B 8-25 min.: 13-20% B 25-40 min.: 20-40% B 40-45min.: 40-60% B 45-50 min.: 60-10% B 50-60 min.: 10% B

Visando um estudo detalhado dos flavonóides da cana-de-açúcar, o efluente da coluna foi coletado manualmente em tubos de ensaio utilizando a técnica do microfracionamento por CLAE (55,58,75), primeiramente a cada 1 (um) minuto e em análises posteriores a cada 5 (cinco) minutos. Segundo Hostettmann (58), este método, juntamente com a técnica de CCD, permite localizar a região do cromatograma de maior concentração das substâncias de interesse, no caso os flavonóides que apresentam atividade antioxidante. As frações obtidas foram concentradas em um rotaevaporador Büchi até evaporação total da fase móvel,

resuspendidas em MeOH e em seguida aplicadas nas placas de CCD.

III.4.1- Método “overloading”

Este método foi utilizado para analisar em CLAE os extratos das folhas da cana-de-açúcar e da garapa devido à baixa concentração de flavonóides presente nas amostras. Para isso, após a extração e clean-up conforme a figura 7, o extrato foi concentrado no rotaevaporador até obter $\frac{1}{4}$ do volume inicial (75).

III.5 – Condições de análise por CCD

As placas de CCD utilizadas inicialmente neste trabalho eram elaboradas manualmente no laboratório, com sílica gel e ativadas em estufa a 110 °C por uma hora. Posteriormente, passou-se a usar placas comerciais (Merck). Rutina e quercetina foram utilizadas como padrão por apresentar atividade antioxidante (21,31) e também baixo custo de aquisição.

Para a análise dos extratos da folha da cana-de-açúcar, foram aplicados com o uso de capilares graduados, 2 μ L do padrão (rutina), 2 μ L do extrato bruto e 5 μ L das frações obtidas por microfracionamento após concentradas no rotaevaporador. Para a análise da garapa, foram aplicados com o uso de capilares graduados, 3 μ L do padrão (rutina) e 8 μ L das frações obtidas por microfracionamento após concentradas no rotaevaporador.

A fase móvel foi constituída de acetato de etila, ácido fórmico e água na proporção 6:1:1 (42) e comparou-se ao R_F e também a tonalidade da mancha das amostras com o padrão utilizado. Foi avaliada ainda uma segunda fase móvel, constituída de clorofórmio/metanol/água na proporção 65:35:10 (48).

Após a eluição, as placas foram secas ao ar livre e em temperatura ambiente, e borrifadas com os reagentes reveladores (55-58, 66-68).

Para os testes de sensibilidade dos reagentes reveladores utilizados em CCD foi preparada uma solução estoque do padrão rotina 100 µg/mL, a qual foi utilizada para preparar soluções nas concentrações de 75 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL.

Foram aplicados em placas de CCD 2 µL de cada solução, eluídas em fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (6:1:1) e após secagem, reveladas com os reagentes.

IV.1 – Detecção e identificação dos flavonóides com atividade antioxidante das folhas da cana-de-açúcar

Após a extração e clean-up dos extratos das folhas, foi realizada análise cromatográfica por CLAE, utilizando as condições cromatográficas citadas no item III.4, exceto a vazão que inicialmente era de 1,4 mL/min. O cromatograma resultante foi comparado aos cromatogramas obtidos em trabalho anterior (42) a fim de reproduzir o mesmo resultado. Entretanto, observou-se que apesar de utilizar a mesma coluna, houve uma diferença no tempo de retenção dos picos devido à diferença do equipamento utilizado.

O padrão diosmina foi co-injetado com o extrato das folhas na análise por CLAE, para comparação do tempo de retenção desta substância com os dados obtidos na literatura (42) como mostra a Figura 8. Desta forma, percebeu-se a necessidade de alteração na vazão da fase móvel para se obter t_R semelhante ao trabalho anterior (42) e também melhor separação dos picos. Assim, foram realizados testes utilizando vazão de 1,2 mL/min e também 1,0 mL/min. As Figuras 9 e 10, respectivamente, mostram os resultados obtidos.

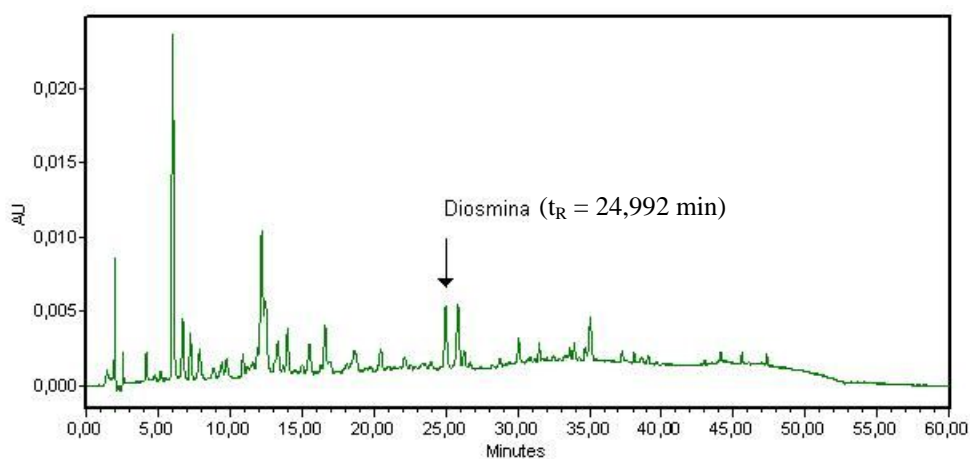


Figura 8: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,4 mL/min.

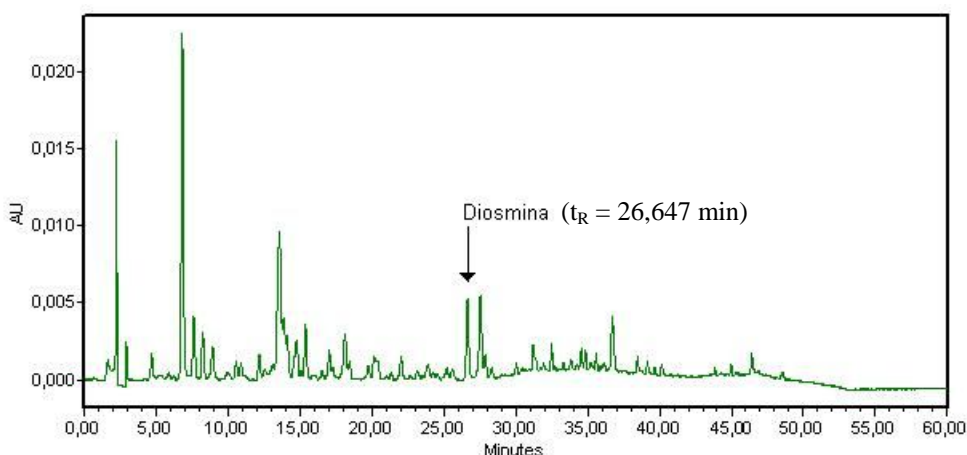


Figura 9: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,2 mL/min.

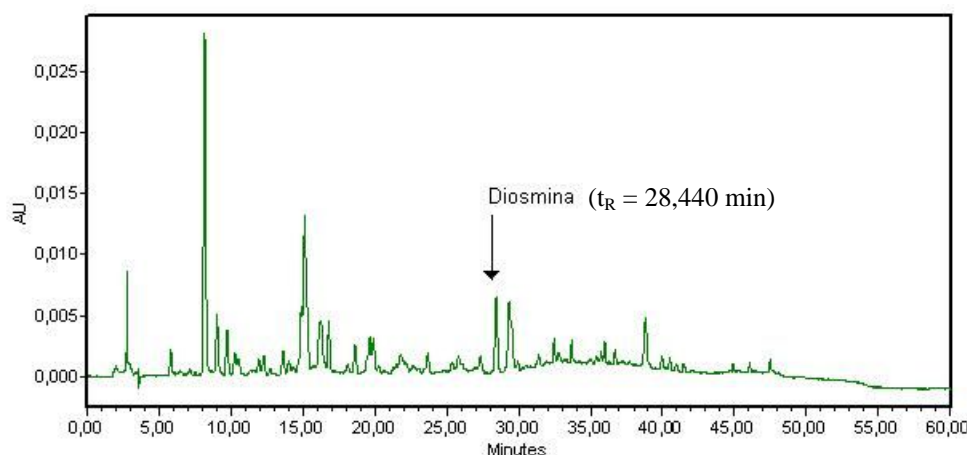


Figura 10: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item II.4, vazão de 1,0 mL/min.

Verificou-se um melhor resultado utilizando a vazão de 1,0 mL/min (Figura 10), a qual foi adotada como padrão para as análises deste trabalho, além de facilitar o microfracionamento do efluente da coluna.

O microfracionamento consiste na coleta sistemática do efluente da coluna em tempos determinados para um exame detalhado das substâncias separadas por CLAE (55,58,75). Inicialmente foi feito o microfracionamento do extrato das folhas da cana-de-açúcar coletando frações a cada um minuto de análise. Devido à grande quantidade de frações com baixa concentração de flavonóides, passou-se então a coletar frações a cada cinco minutos.

As frações foram preparadas para análise em CCD, utilizando as condições descritas no item III.5. Pôde-se observar claramente as manchas referentes aos padrões, porém em nenhuma placa observou-se mancha referente às amostras aplicadas. Os resultados obtidos na revelação com solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano estão esquematizados na Figura 11.

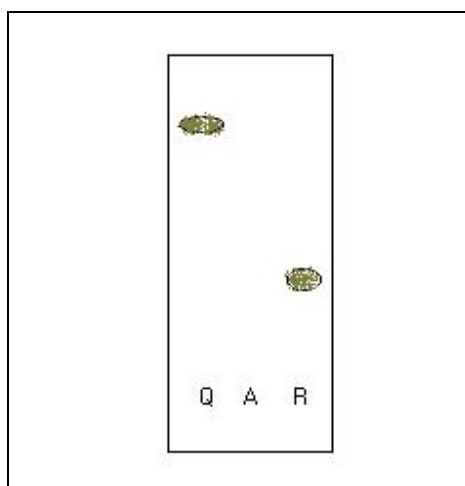


Figura 11: Representação esquemática da análise por CCD. Revelador: solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano. Q - quercetina, A – amostra do microfracionamento das folhas da cana-de-açúcar, R – rutina.

Vários testes do procedimento por CCD foram realizados e decidiu-se analisar o extrato bruto das folhas da cana-de-açúcar, comparando-se o R_F com os padrões quercetina e rutina após revelação com solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano. Pôde-se observar as manchas referentes aos padrões e também um “arraste” referente ao extrato como mostra a Figura 12. Verificou-se a presença de substâncias com atividade antioxidante no extrato bruto, levando a novos testes de microfracionamento por CLAE.

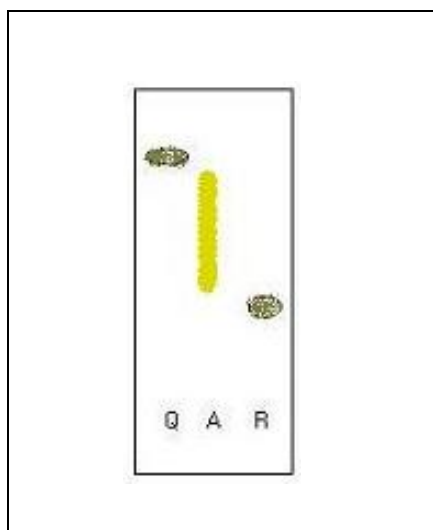


Figura 12: Representação esquemática da análise por CCD. Revelador: solução 0,02% de β -caroteno em diclorometano. Q - quercetina, A – extrato bruto das folhas da cana-de-açúcar, R – rutina.

Novos extratos das folhas da cana-de-açúcar foram preparados e fracionados pelo método “overloading” (75) e o efluente da coluna foi coletado em frações a cada cinco minutos. A injeção do extrato concentrado aumentou em 10 vezes a absorbância das substâncias presentes no extrato das folhas (Figura 13), comparada com a absorbância obtida inicialmente (Figura 10), facilitando também as análises por CCD e conseqüentemente a identificação das substâncias de interesse.

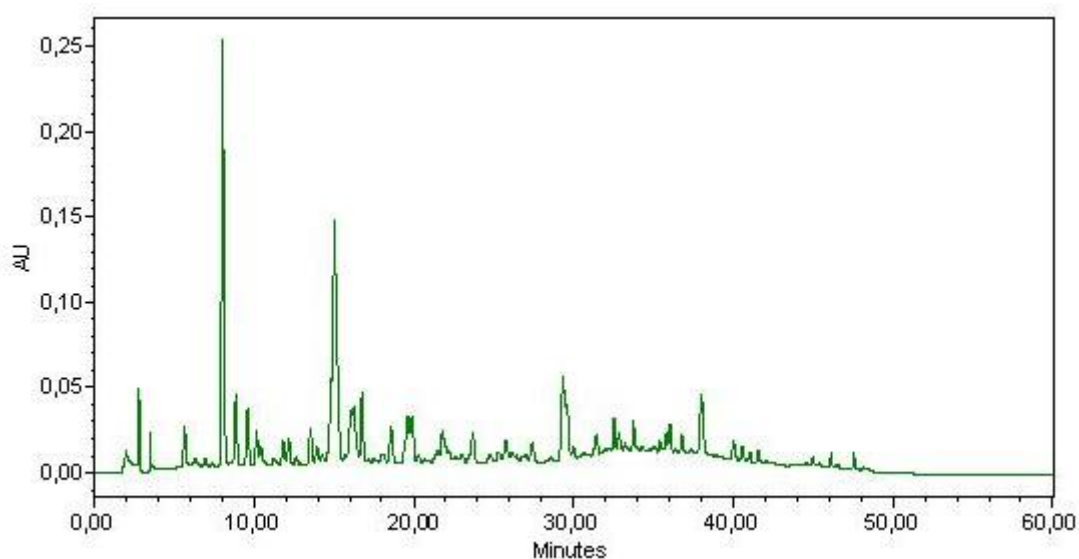


Figura 13: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extratos das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item III.4, método “overloading”.

Após preparo das frações para análise em CCD, conforme o item III.5, as placas foram reveladas com solução de β -caroteno e também com solução de difenilborato aminoetanol/PEG 400. Os resultados obtidos na revelação com NP/PEG 400 estão apresentados na Figura 14.

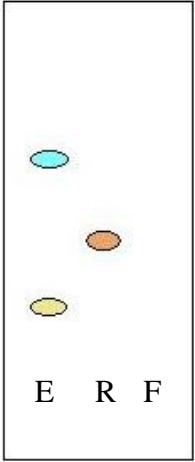
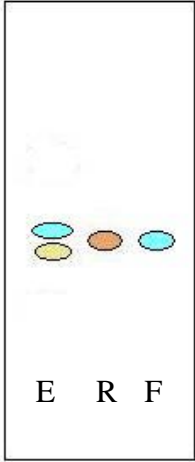
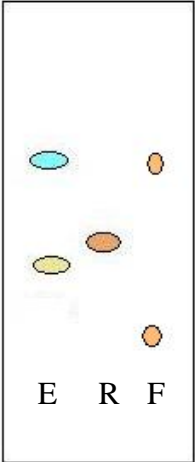
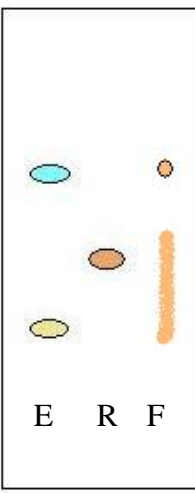
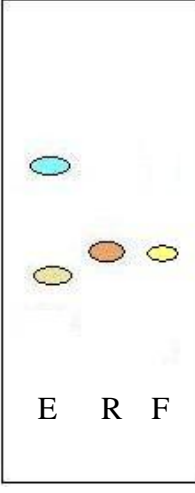
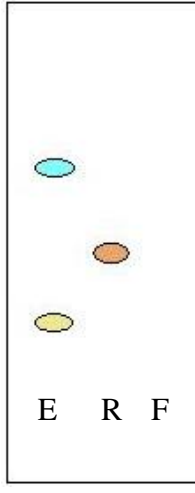
<p style="text-align: center;">Placa 1</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>	<p style="text-align: center;">Placa 2</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>	<p style="text-align: center;">Placa 3</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>
<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 0-5 minutos</p>	<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 5-10 minutos</p>	<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 10-15 minutos</p>
<p style="text-align: center;">Placa 4</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>	<p style="text-align: center;">Placa 5</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>	<p style="text-align: center;">Placa 6</p>  <p style="text-align: center;">E R F</p>
<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 15-20 minutos</p>	<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 20-25 minutos</p>	<p>E = Extrato Bruto R = Rutina F = Fração 25-30 minutos</p>

Figura 14: Representação esquemática da análise por CCD do extrato das folhas da cana-de-açúcar e das frações coletadas. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1) e revelador difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366$ nm).

O revelador difenilborato aminoetanol/PEG 400, sob irradiação a $\lambda = 366$ nm, permitiu observar em todas as placas a fluorescência dos flavonóides derivatizados, presentes no extrato bruto e nas frações coletadas conforme as placas 2,3,4 e 5 (Figura14). O ganho de fluorescência após a aplicação do revelador é determinado pelo número e posição dos substituintes dos flavonóides: a fluorescência de cor verde indica a presença de um grupo OH na posição 4'; a cor amarela indica a presença do grupo OH nas posições 3' e 4'; a presença de três grupos OH nas posições 3', 4' e 5' produz uma fluorescência de cor alaranjada (29). Pôde-se observar manchas alaranjadas nas placas 3 e 4 e mancha amarela na placa 5.

A mancha azul presente na fração 5-10 minutos indica a presença de substâncias fenólicas, as quais ocorrem freqüentemente em plantas com flavonóides (29).

Nas placas reveladas com solução de β -caroteno observou-se apenas a banda referente ao padrão, levando a iniciar os testes com o reagente DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (58), já que foi constatada a presença de flavonóides nas frações e o β -caroteno não apresentou resultados positivos. Devido à grande dificuldade de detectar a presença dos flavonóides nas frações coletadas, foi realizado um teste de sensibilidade dos reagentes utilizados neste trabalho, nas condições descritas no item III.5. Os resultados estão representados na Tabela 3:

Tabela 3: Teste de sensibilidade dos reagentes de CCD utilizados neste trabalho.

Reagentes	Concentração mínima de rutina detectada
NP/PEG	50 $\mu\text{g/mL}$
DPPH	75 $\mu\text{g/mL}$
β -caroteno	100 $\mu\text{g/mL}$

Observou-se que o β -caroteno é um reagente pouco sensível e por isso não foi utilizado em análises posteriores, devido à baixa concentração dos flavonóides presentes nas frações coletadas.

A fase móvel clorofórmio/metanol/água (65:35:10) utilizada nos testes para atividade antioxidante, não apresentou boa separação das bandas comparada com a fase acetato de etila/ácido fórmico/água (6:1:1), descartando-se sua utilização no decorrer deste trabalho.

Novas análises em CCD reveladas com NP/PEG foram realizadas e os resultados estão apresentados na Figura 15.

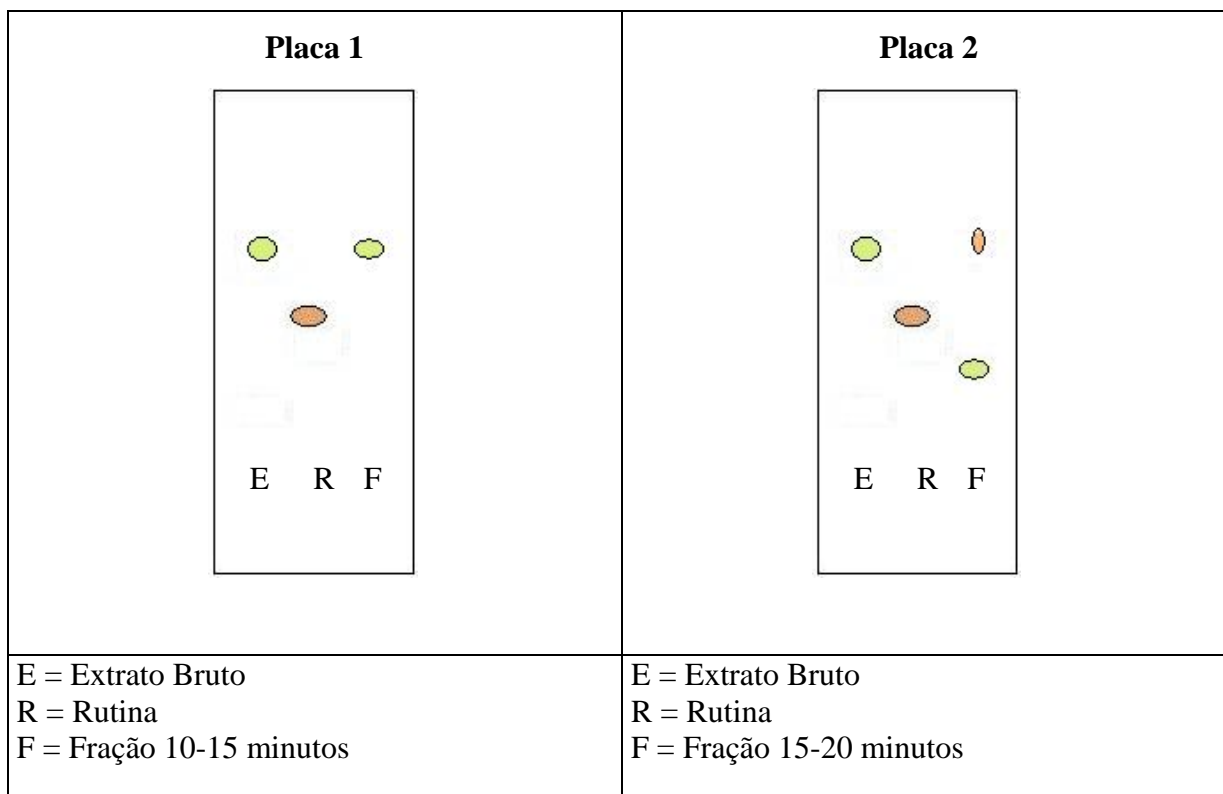


Figura 15: Representação esquemática da análise por CCD do extrato das folhas da cana-de-açúcar e das frações coletadas. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366$ nm)

Na placa 1 e 2 observa-se fluorescência de cor amarelo esverdeada no extrato bruto e nas frações 10-20 minutos. Na fração 15-20 minutos pôde-se observar também fluorescência de cor alaranjada. Estes resultados mostram a presença dos flavonóides com grupos OH na posição 4' e na posição 3' e 4' (placa 1 e 2) e flavonóides com grupo OH nas posições 3', 4' e 5' (placa 2). Já nos testes da atividade antioxidante com o reagente DPPH, obteve-se resultado positivo somente na fração 10-15 minutos (placa 1), como mostra a Figura 16.

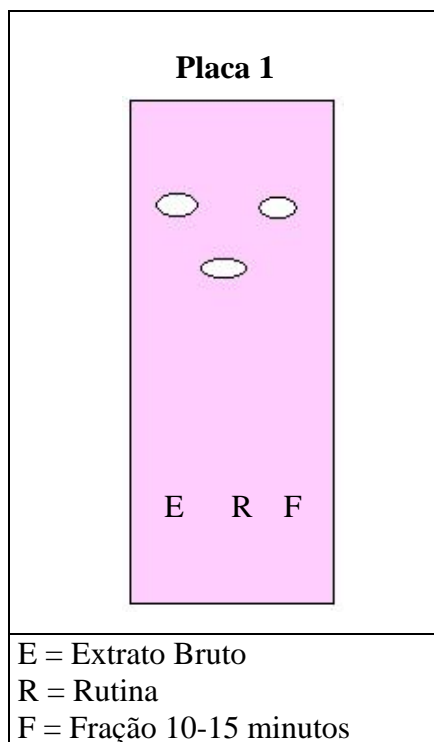


Figura 16: Representação esquemática da análise por CCD. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2%.

Através dos resultados apresentados na literatura (42-44) e com base nos resultados obtidos, pôde-se localizar os picos referentes aos flavonóides já identificados na folha da cana-de-açúcar, inclusive os que apresentam atividade antioxidante, conforme indicado na Figura 17 e Tabela 4. A identificação dos picos foi feita através de comparação do t_R e do espectro UV/DAD (42-44).

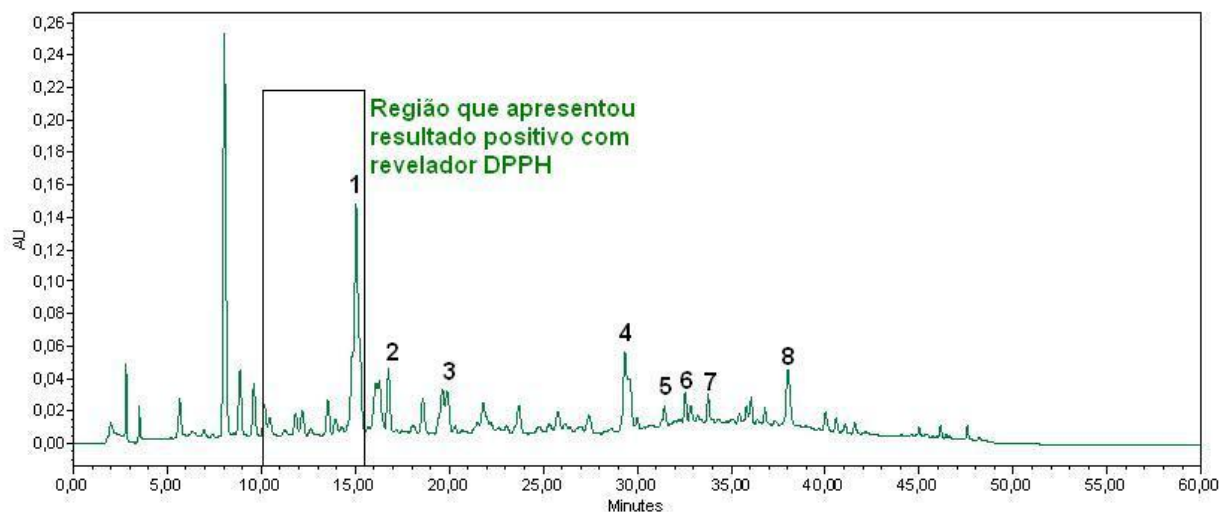


Figura 17: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato das folhas da cana-de-açúcar, utilizando as condições descritas no item III.4.

Tabela 4: Flavonóides presentes no extrato das folhas da cana-de-açúcar correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 17.

Pico	t_R (min)	Dados UV/DAD(nm)		Identificação
		Banda I	Banda II	
1	15,127	337,0	270,4	orientina-8-O-ramnose
2	16,838	345,4	271,6	diosmetina-8-C-glicosídeo
3	19,943	331,0	270,4	vitexina
4	29,395	349,0	266,9	tricina-7-O-neoesperidosídeo
5	31,482	331,0	271,6	tricina-7-O-glicosídeo
6	32,578	328,7	271,6	tricina-4'-O-(eritro- β -glicerilguaiacila)éter-7-O- β -glucopiranosídeo ou tricina-4'-O-(treo- β -glicerilguaiacila)éter-7-O- β -glucopiranosídeo
7	33,795	327,5	271,6	tricina-4'-O-(eritro- β -glicerilguaiacila)éter-7-O- β -glucopiranosídeo ou tricina-4'-O-(treo- β -glicerilguaiacila)éter-7-O- β -glucopiranosídeo
8	38,065	343,0	269,2	tricina-4'-O-(eritro- β -glicerilguaiacila)éter ou tricina-4'-O-(treo- β -glicerilguaiacila)éter

A região do cromatograma que apresentou resultado positivo com o reagente revelador DPPH (figura 17) representa 31,93 % em área dos picos identificados como flavonóides presentes no extrato das folhas da cana-de-açúcar e inclui o flavonóide orientina-O-ramnosídeo, que representa aproximadamente 23% da área total dos flavonóides. O seu espectro UV/DAD assim como sua estrutura estão apresentados na Figura 18. Os espectros UV/DAD dos demais flavonóides presentes nas folhas da cana-de-açúcar estão apresentados na Figura 19 e suas estruturas na Figura 2 e Tabela 1.

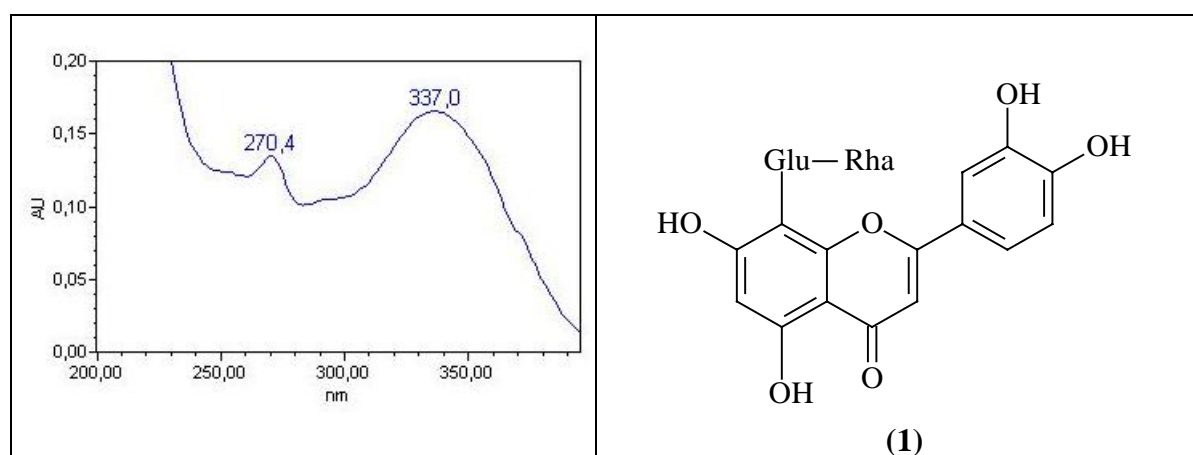


Figura 18: Espectro UV/DAD e estrutura do flavonóide orientina-O-ramnosídeo (1) ($t_R = 15,127$ min)

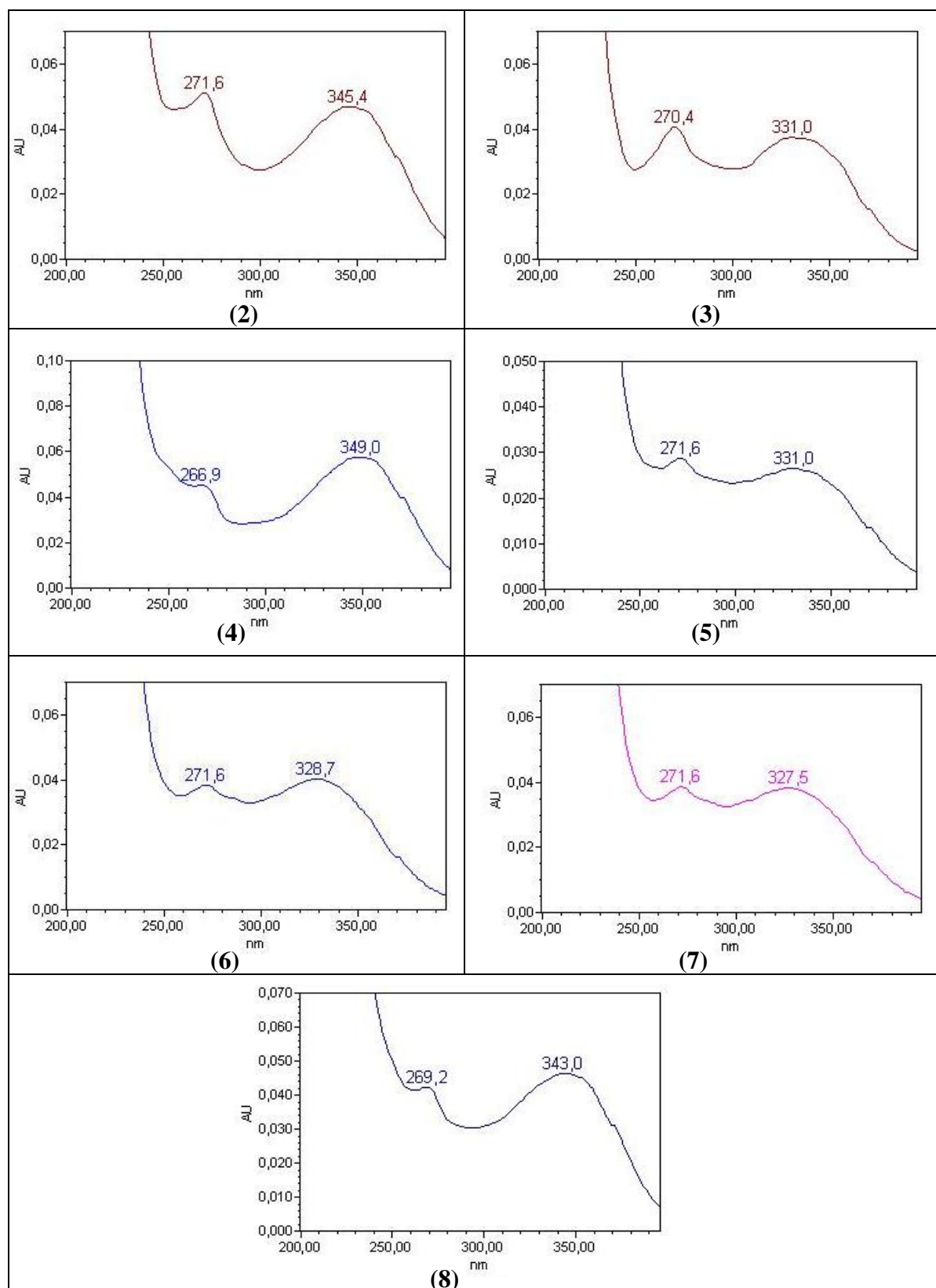


Figura 19: Espectros UV/DAD dos flavonóides presentes nas folhas da cana-de-açúcar. Identificação conforme picos assinalados no cromatograma da Figura 17; estruturas na Figura 2 e Tabela 1.

IV.2 – Detecção e identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da garapa.

Após a extração e clean-up, o extrato metanólico da garapa foi analisado por CLAE utilizando as condições cromatográficas descritas no item III.4. O perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao obtido em trabalho anterior (42). A vazão de 1,0 mL/min, utilizada também nas análises do extrato das folhas da cana-de-açúcar permitiu boa separação dos picos e t_R das substâncias próximo aos obtidos na literatura (42) como mostra a Figura 20.

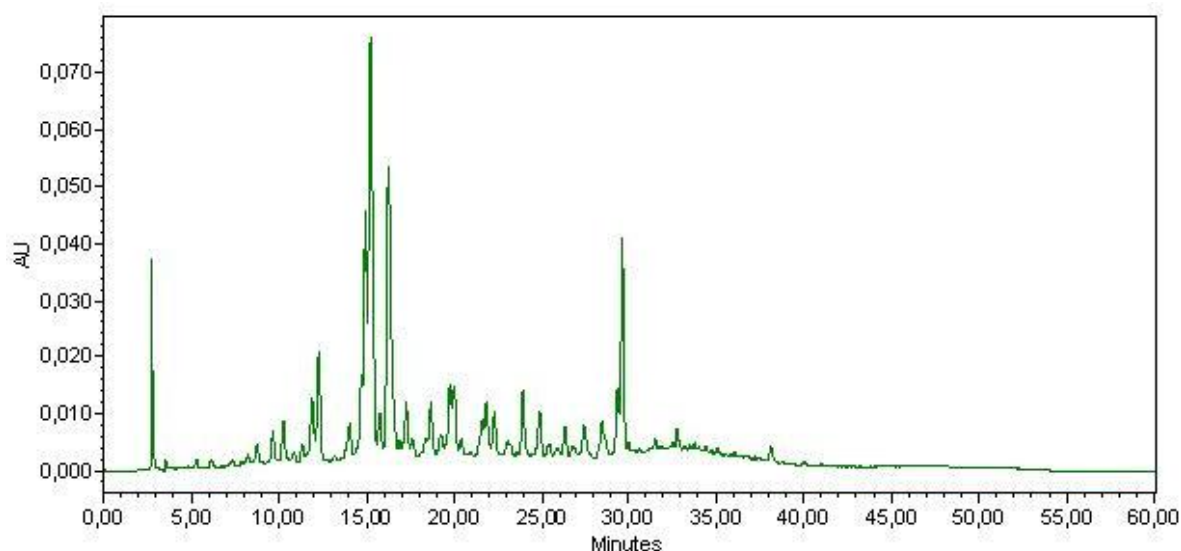


Figura 20: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4.

Comparando a absorvância dos picos da folha (0,25 AU) e da garapa (0,070 AU), observou-se que a quantidade de flavonóides presentes no extrato metanólico da garapa era pequena para ser detectada por CCD utilizando revelador DPPH. Portanto a garapa também foi submetida ao método “overloading” descrito no item III.4 (75), resultando numa absorvância 5 vezes maior (Figura 21).

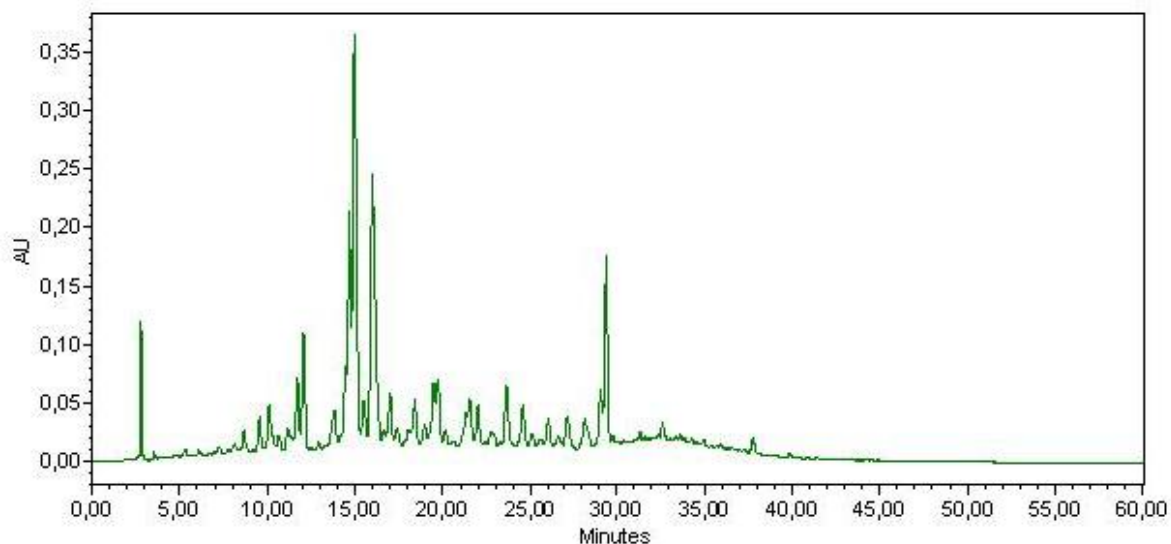


Figura 21: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4, método “overloading”.

Inicialmente foi realizado microfracionamento do efluente da coluna a cada 5 minutos. As frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando os reagentes difenilborato aminoetanol/PEG 400 e DPPH, conforme descrito no item III.5. Os resultados estão apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

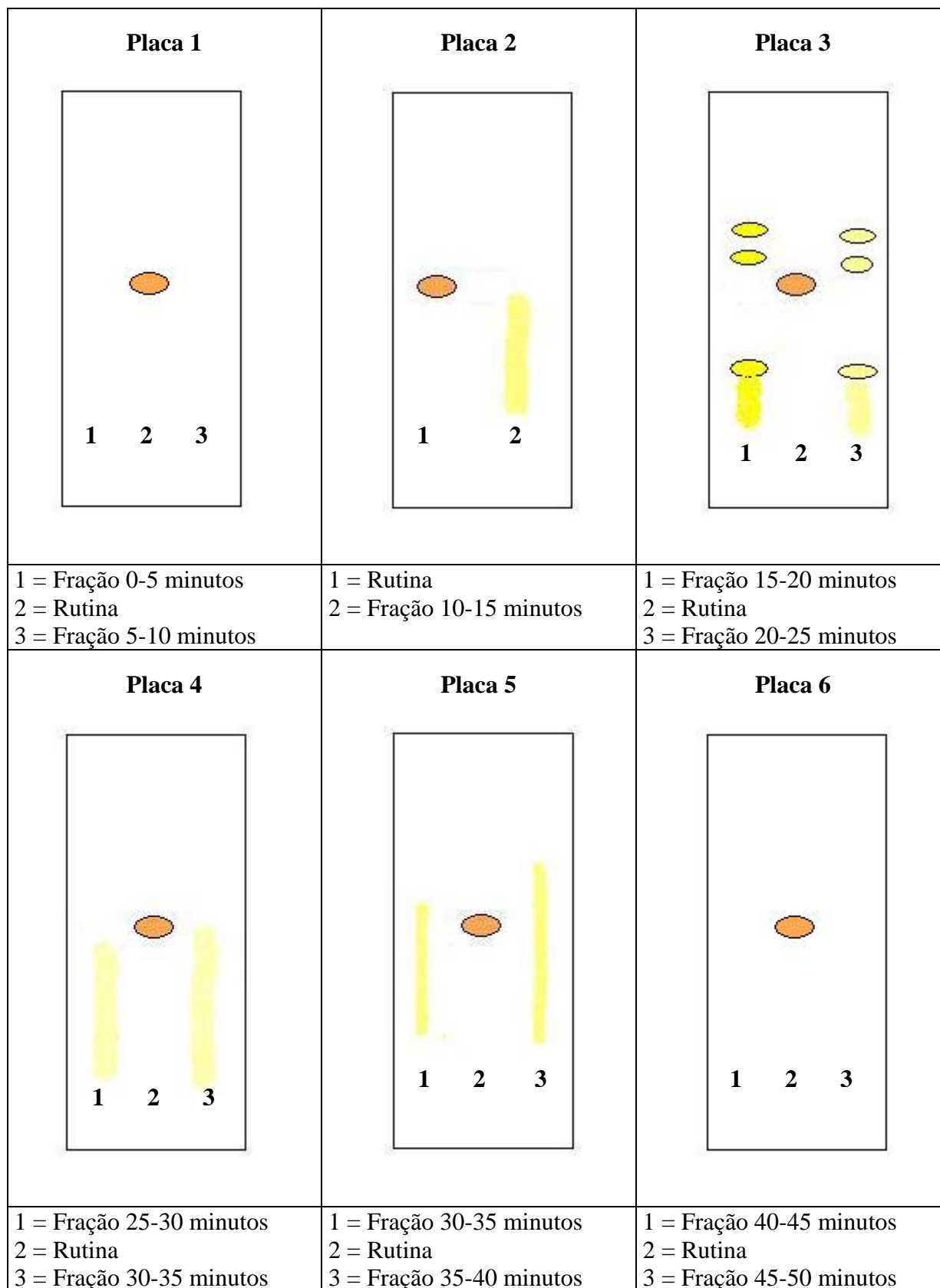


Figura 22: Representação esquemática da análise por CCD das frações do extrato da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: difenilborato aminoetanol/PEG 400 ($\lambda = 366 \text{ nm}$).

O reagente revelador difenilborato aminoetanol/PEG, sob irradiação a $\lambda = 366$ nm, permite observar a fluorescência de cor amarela nas placas 2,3,4 e 5 (Figura 22), indicando predominância dos flavonóides com grupo OH nas posições 3' e 4' (29) presentes nas frações coletadas.

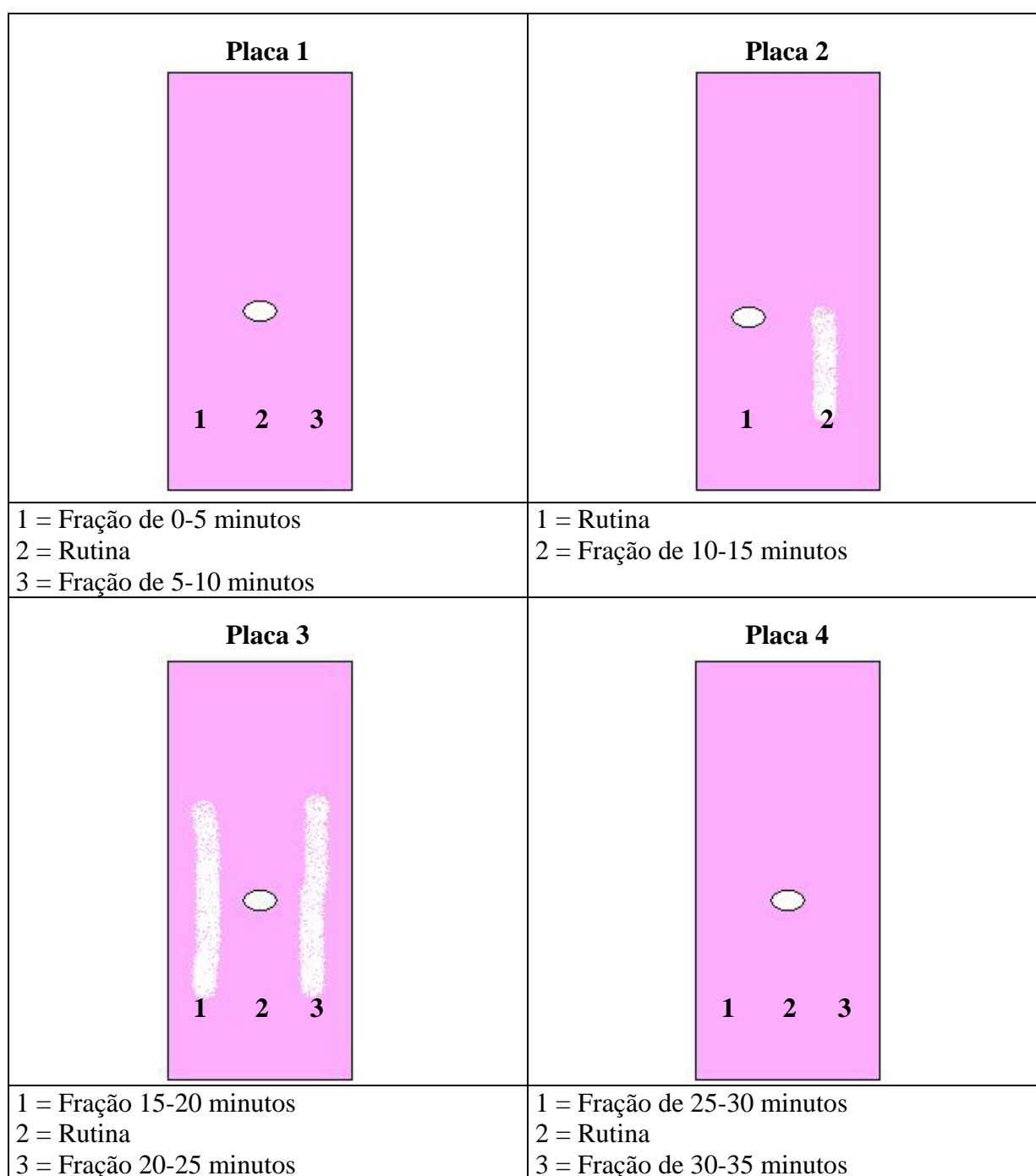


Figura 23: Representação esquemática da análise por CCD das frações do extrato da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2 %.

A revelação com reagente DPPH, mostra atividade antioxidante somente nas placas 2 e 3 referente as frações de 10-25 minutos (Figura 23), comprovando a atividade antioxidante para os flavonóides **9-13** (Figura 24). Com base na literatura (42-44), alguns dos flavonóides presentes na garapa foram identificados através de comparação de t_R e espectro UV/DAD (42-44), como mostra a Tabela 5 e Figuras 25-27.

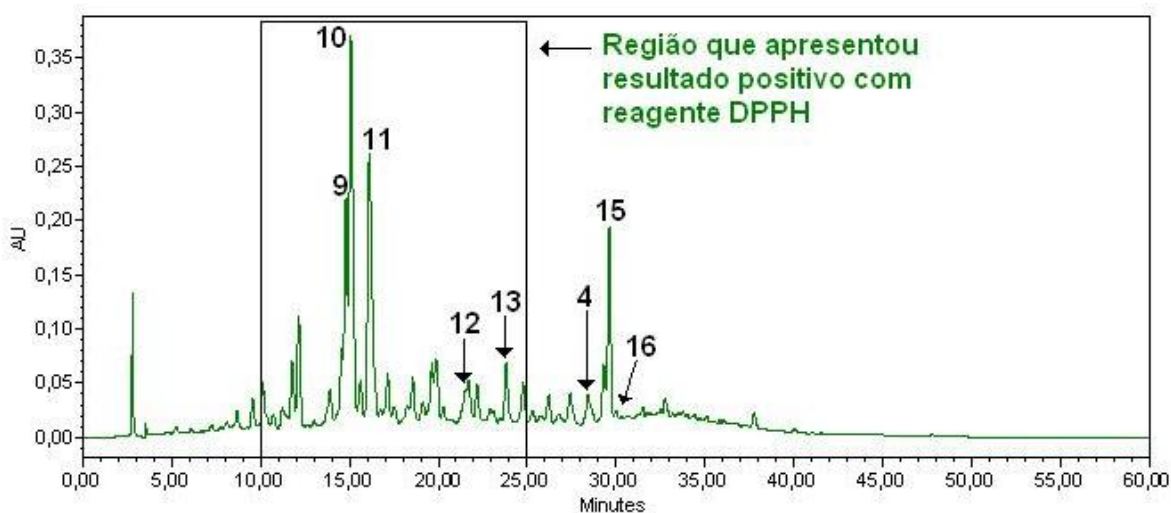


Figura 24: Cromatograma CLAE ($\lambda = 350$ nm) do extrato metanólico da garapa, utilizando as condições descritas no item III.4.

Tabela 5: Flavonóides presentes no extrato da garapa (42)

Pico	t_R (min)	Dados UV/DAD(nm)		Identificação
		Banda I	Banda II	
9	14,797	335,8	270,4	schaftosídeo
10	15,082	335,8	270,4	isochaftosídeo
11	16,118	346,6	268,1	diosmetina-8-C-glicosídeo
12	21,522	329,8	271,0	orientina
13	23,820	345,4	270,4	4',5'-di-O-metil-luteolina-8-C-glicosilada
4	28,440	351,3	264,5	tricina-O-neoesperidosídeo
15	29,627	350,1	266,9	tricina-O-glicosídeo
16	29,997	337,0	270,4	tricina-O-ramnosilgalacturonídeo

O espectro UV-DAD dos flavonóides majoritários que apresentaram atividade antioxidante, assim como sua estrutura, estão apresentados nas Figura 25 e 26 respectivamente. Os espectros UV/DAD dos demais flavonóides presentes na garapa estão apresentados na Figura 27 e suas estruturas na Figura 2 e Tabela 1.

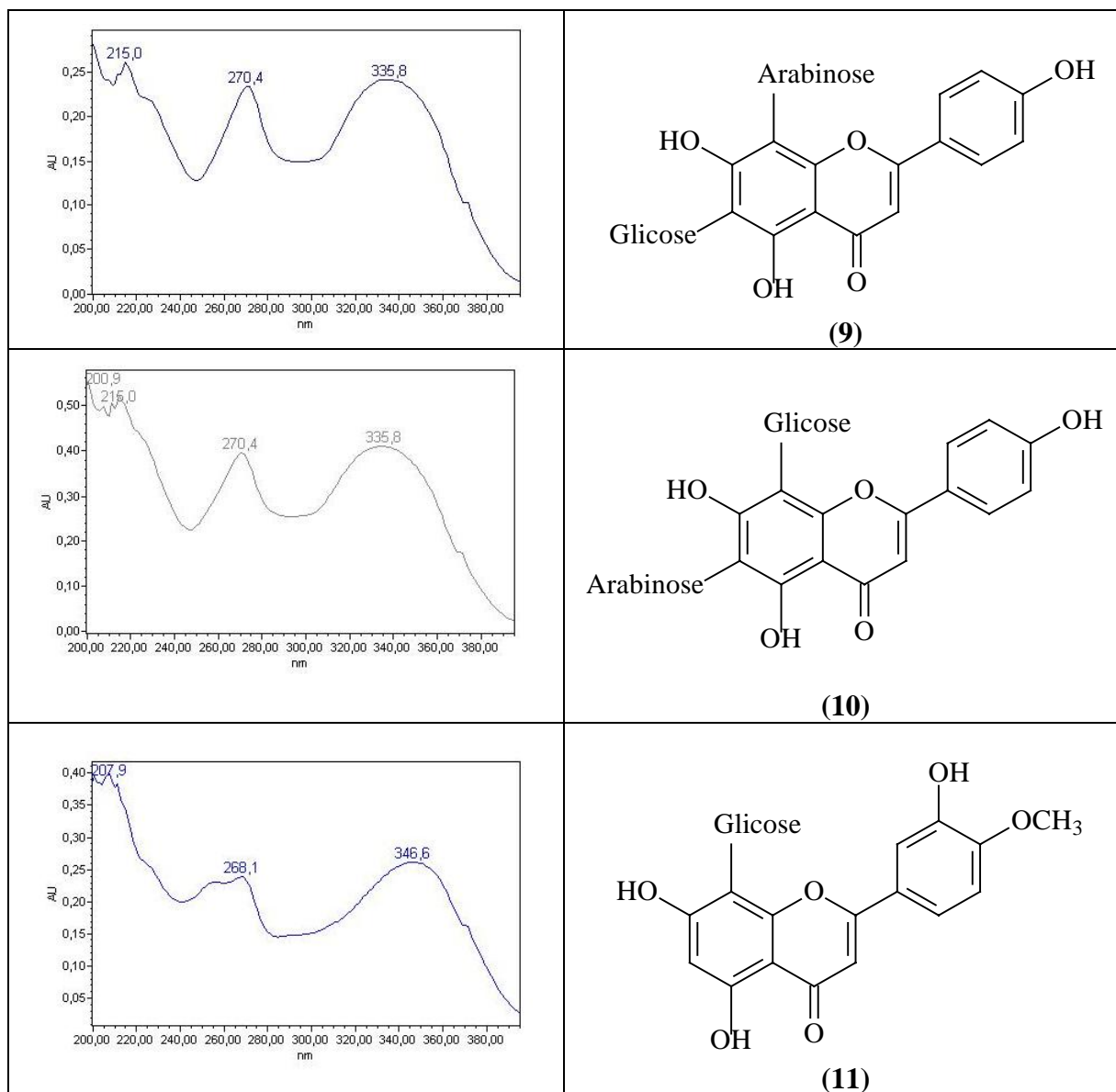


Figura 25: Espectro UV/DAD e estrutura dos flavonóides presentes na garapa que apresentaram atividade antioxidante. Numeração conforme Figura 24 e Tabela 5.

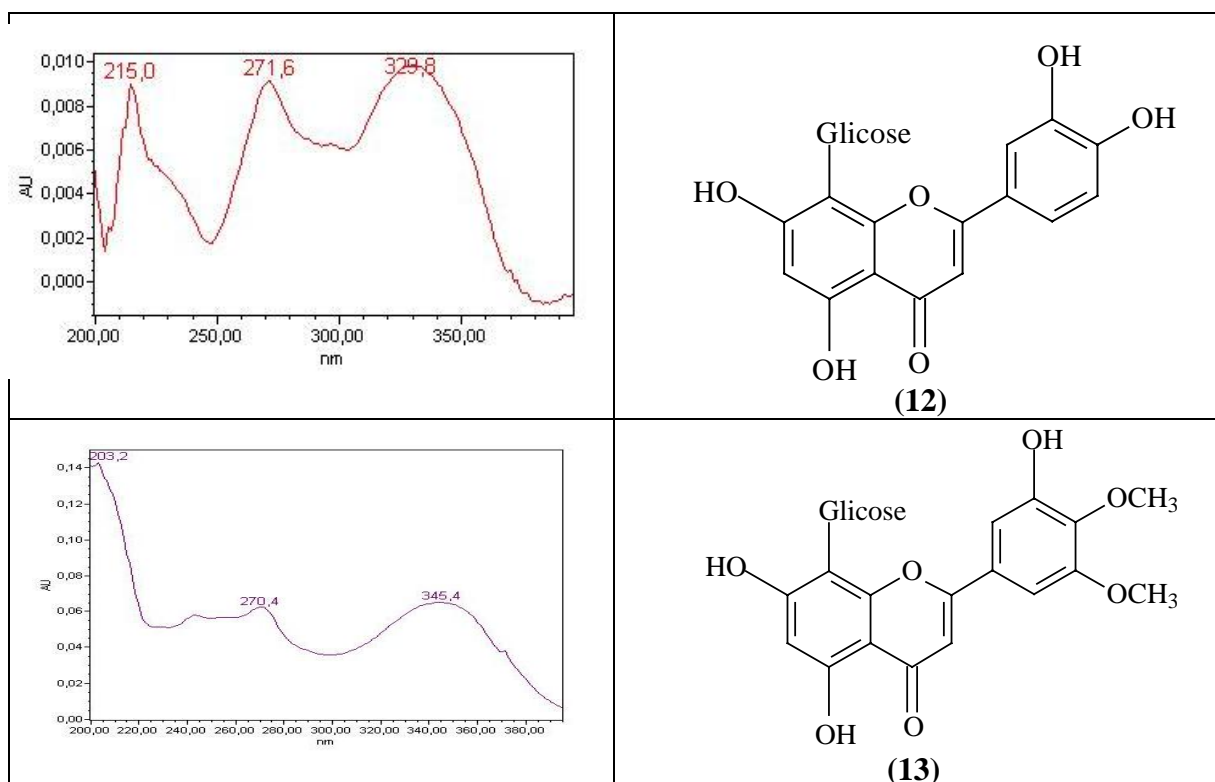


Figura 26: Espectro UV/DAD e estrutura dos flavonóides presentes na garapa que apresentaram atividade antioxidante. Numeração conforme Figura 24 e Tabela 5.

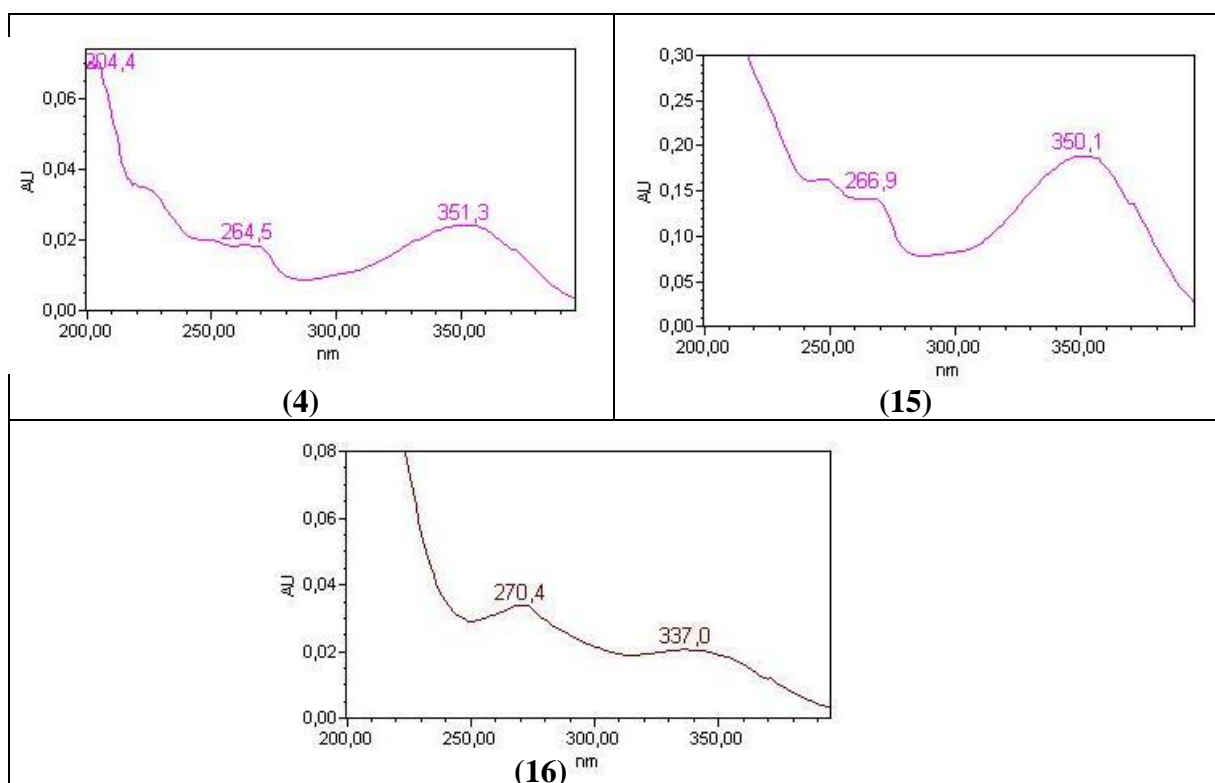


Figura 27: Espectros UV/DAD dos flavonóides presentes na garapa, correspondentes aos picos assinalados no cromatograma da Figura 24.

Comparando-se os flavonóides identificados nas folhas da cana-de-açúcar (Figura 17) e os flavonóides identificados na garapa (Figura 24), observa-se que todos diferem entre si, com exceção da tricina-O-neoesperidosídeo (pico 4).

Tentou-se isolar por microfracionamento os picos 9-13 (Figura 24), para testar a atividade antioxidante de cada um. Os resultados da análise por CCD estão apresentados na Figura 28.

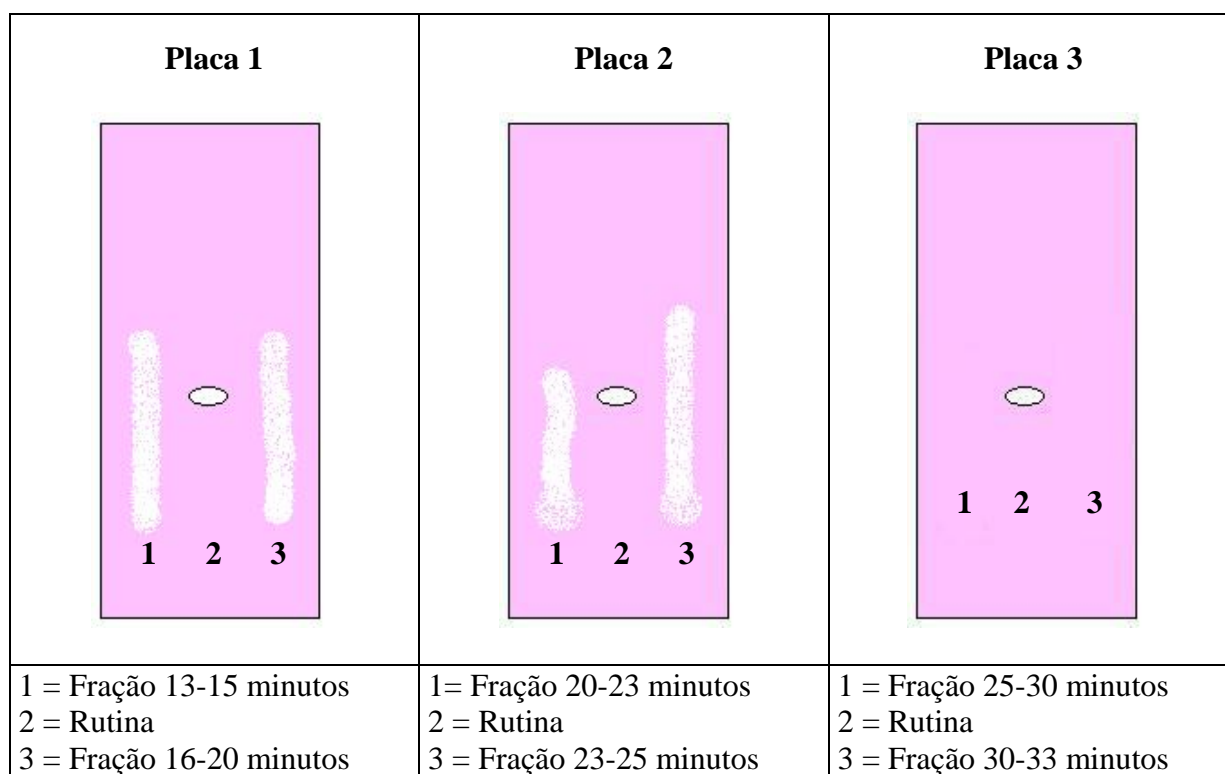


Figura 28: Representação esquemática da análise por CCD das frações do microfracionamento da garapa. Eluente: acetato etila/ácido fórmico/água (6:1:1). Revelador: solução de DPPH 0,2 %.

A placa 1 mostra resultado positivo com o reagente DPPH para a fração contendo os picos **9** e **10** (fração 13-15 minutos) e para a fração contendo o pico **11** (fração 16-20 minutos). Na placa 2 observa-se resultado positivo para a fração que contém o pico **12** (fração 20-23 minutos) e para a fração que contém o pico **13** (23-25 minutos). A placa 3 não apresenta resultado positivo com o reagente DPPH. Os flavonóides contidos na região do cromatograma (Figura 24) que apresentou atividade antioxidante ($t_R = 10-25$ minutos) correspondem a 81,8% da área total dos flavonóides presentes na garapa, sendo que os picos **9-13** representam aproximadamente 58,28% da área dos flavonóides.

V – Conclusões Gerais

Considerando o objetivo deste trabalho, classificar a cana-de-açúcar como possível alimento funcional, foi testada a atividade antioxidante dos flavonóides anteriormente identificados nas folhas da cana-de-açúcar e também na garapa.

Os extratos metanólicos da folha e da garapa foram obtidos e analisados utilizando método anteriormente desenvolvido (42) o qual apresentou boa repetibilidade. O método de injeção “overloading” e a técnica do microfracionamento por CLAE foram uma ferramenta de suma importância nas análises por CCD, possibilitando maior concentração e isolamento dos flavonóides.

O reagente NP/PEG permitiu localizar as frações com maior concentração dos flavonóides e o reagente DPPH apresentou maior sensibilidade na revelação das placas comparado com a solução de β -caroteno.

Os resultados obtidos nas análises das folhas da cana-de-açúcar indicaram somente uma fração (10-15 minutos) com resultado positivo utilizando o reagente DPPH, que corresponde a 31,93% da área total dos flavonóides presentes na amostra. Já nas análises da garapa, obteve-se várias frações (10-25 minutos) com resultados positivos para atividade antioxidante, correspondendo a 81,8% da área total dos flavonóides da garapa. Através da comparação do espectro de UV-DAD e do tempo de retenção, pôde-se localizar dentre os flavonóides já identificados na cana-de-açúcar quais apresentam atividade antioxidante: orientina-O-ramnose, presente no extrato das folhas, e schaftosídeo, isochaftosídeo, diosmina-8-C-glicosídeo, orientina e 4',5'-di-O-metil-luteolina-8-C-glicosilada, presentes nas amostras da garapa.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a avaliação química da atividade antioxidante das folhas da cana-de-açúcar e da garapa e justificam estudos nutricionais e/ou farmacológicos mais aprofundados para classificá-la (ou não) como alimento funcional.

VI – Referências Bibliográficas

- 1- MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. 3.ed. New York: Wiley, 1985. 1346p.
- 2- OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 474p.
- 3- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. **Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 143p.
- 4- BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 136, p. 113-126, 2003.
- 5- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- 6- CHOW, C. K. **Cellular antioxidant defense mechanisms**. Boca Raton: CRC, 1988. 222p.
- 7- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- 8- BABER, A. D.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmacy**, v. 34, p. 26-35, 1994.
- 9- YAGI, K. **Active oxygens, lipid peroxides, and antioxidants**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1993. 372p.
- 10- CARPER, J. **Pare de envelhecer agora**. Rio de Janeiro: Campus, 1997. 299p.
- 11- COOPER, K. H. **La Revolución de los antioxidantes**. Barcelona: Martinez Roca, 1995. 254 p.
- 12- SIQUEIRA, F. M. Nutrientes Antioxidantes. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos Campinas**, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

- 13- HALLIWELL, B. Antioxidant Characterization, Methodology and Mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.
- 14- SEN, C. K.; SIES, H.; BAEUERLE, P. A. **Antioxidant and redox regulation of genes**. Boca Raton: Academic Press, 2000. 562p.
- 15- LUNDBERG, W. O. **Autoxidation and antioxidants**. New York: Interscience Publishers, 1962. v. 2.
- 16- KUMPULAINEN, J. T.; SALONEN, J. T. **Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. 465p.
- 17- BIDLACK, W. R.; OMAYE, S. T. **Natural Protectantes Against Natural Toxicants In Food**. Lancaster: Technomic, 1995. v. 1
- 18- SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholoc extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 157-167, 2005.
- 19- SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, p. 277-284, 2006.
- 20- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- 21- PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. Orlando: Academic Press, 1999. 511p.
- 22- ARAÚJO, J. M. A. **Antioxidantes fenólicos sintéticos em alimentos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 13p.
- 23- MAGA, J. A.; TU, A. T. **Food Additive Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. 542 p.
- 24- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC, 2004. 558 p.

- 25- YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.
- 26- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**. New York: Chapman & Hall, 1994. 676 p.
- 27- MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. **Flavonoids in the living system**. New York: Plenum Press, 1998. 278 p.
- 28- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.
- 29- PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci. **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de Passiflora L.** 2002. 273f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- 30- HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984. 288p.
- 31- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- 32- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.
- 33- SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, p. 117-142, 1985.
- 34- MCGHIE, T. K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 107-112, 1993.

- 35- HARDY, G. Nutraceutical and functional Foods: Introduction and meaning. **Nutrition**, v. 16, p. 688-689, 2000.
- 36- BLOCH, A.; THOMSON, C. A. Position of the American Dietetic Association: Phytochemicals and functional foods. **Journal of American Dietetic Association**, v.95, p. 493-496, 1995.
- 37- LAJOLO, F. M. Alimentos Funcionais, **Revista Racine**, v. 62, p. 18-24, 2001.
- 38- GODOY, O. P.; TOLEDO, F. F. **Plantas extrativas**: cana-de-açúcar, amendoim, girassol, mamona, mandioca, soja. Piracicaba: ESALQ, 1972. v.1
- 39- CHEN, J. C. P. **Sugarcane handbook**: a manual for sugarcane manufactures and their chemists. 11.ed. New York: John Wiley, 1985. p.20-82.
- 40- INSTITUTO CUBANO DE PESQUISA DOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR-ICIDCA. **Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar**: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. 474p.
- 41- SOARES, A. R. **Um século de economia açucareira**. São Paulo: Editora Clíper, 2000, 160p.
- 42- COLOMBO, Renata. **Extração e Análise Cromatográfica (CLAE/UV E CLAE/EM) dos Flavonóides da Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*)**. 2003. 166f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 43- COLOMBO, R.; LANCAS, F.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal Chromatography A**, v. 1103, p. 118-124, 2006.

- 44- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography –UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 51-59, 2005.
- 45- LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p.
- 46- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATTO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1990. 279 p.
- 47- TOUCHSTONE, J. C. **Practice of thin layer chromatography**. 3.ed. New York: John Wiley, 1992. 377 p.
- 48- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. **Preparative Chromatography Techniques**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 139 p.
- 49- MAIER, H. G. **Métodos Modernos de Análisis de Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1975. 116p.
- 50- STHAL, E. **Thin-Layer Chromatography**. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1969. 1041 p.
- 51- RANDEPATH, K. **Thin-Layer Chromatography**. 2. ed. New York: Academic Press, 1966. 285 p.
- 52- GEISS, F. **Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography)**. New York: Huethig, 1987. 478p.
- 53- KAISER, R. E. **Planar chromatography**. New York: Huethig, 1970. 265p.
- 54- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003. 151 p.
- 55- HOSTETTMANN, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; POTTERAT, O. The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. **Journal of Planar Chromatography**, v. 10, p. 251-257, 1997.

- 56- KOLEVA, I. I.; BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.
- 57- 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. 17, p. 913-916, 2003.
- 58- CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Use of on-flow LC/¹H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 12, p. 1497-1501, 1998.
- 59- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- 60- ZAPOROZHETS, O. A.; KRUSHYNSKA, O. A.; LIPKOVSKA, N. A.; BARVINCHENKO, V. N. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 21-25, 2004.
- 61- SANCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.
- 62- JIMENEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMENEZ, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; SAURA-CALIXTO, F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1686-1690, 2000.
- 63- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

- 64- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153-161, 2002.
- 65- SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, p. 569-575, 2005.
- 66- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution a L'etude pharmacognostique de la passiflore. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 39, n. 1, p. 15-22, 1984.
- 67- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400. **Journal of Chromatography**, v. 351, p. 351-355, 1986.
- 68- POUKENS-REHWART, P.; TITS, M.; WAUTERS, J. N.; ANGENOT, L. Densitometric evaluation of spiraeoside after derivatization in flowers of *Flipendula ulmaria* (L.) Maxim. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 10, n. 10-12, p. 1085-1088, 1992.
- 69- KARTING, T.; GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 99-107, 1996.
- 70- JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WINNER, H. **Thin-layer chromatography**. Weinheim: VCH, 1990. 464 p.
- 71- KATZ, E. D. **High Performance Liquid Chromatography: principles and methods in biotechnology**. New York: John Wiley, 1996. 522 p.
- 72- SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography for the Analyst**. New York: Marcel Dekker, 1994. 328 p.
- 73- MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 2. ed. Chichester: John Wiley, 1993. 373 p.

74- SIMOES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis species* by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

75- QUEIROZ, E. F.; IOSET, J. R.; NDJOKO, K.; GUNTERN, A.; FOGGIN, C. M.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC-UV-MS and HPLC-UV-NMR, combined with HPLC-micro-fractionation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 166-174, 2005.