

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Guilherme de Paula Campos

Estudo da atividade antinitrosante, antioxidante e inibição enzimática por extratos hidroetanólicos de *Baccharis crispa* Spreng.(*Asteraceae*) por eletroforese capilar de zona

Juiz de Fora

2022

Guilherme de Paula Campos

Estudo da atividade antinitrosante, antioxidante e inibição enzimática por extratos hidroetanólicos de *Baccharis crispa* Spreng. (Asteraceae) por eletroforese capilar de zona

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de concentração:
Produtos Naturais e
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 26 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke - Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Diogo Alexandre Siebert
Fundação Universidade Regional de Blumenau



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 02/06/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ademar Alves da Silva Filho, Professor(a)**, em 02/06/2022, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Alexandre Siebert, Usuário Externo**, em 14/06/2022, às 08:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Amadeu Micke, Usuário Externo**, em 21/06/2022, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0804911** e o código CRC **2970CC60**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Nilo de Araújo Campos e Hilda Rezende Paula e ao meu irmão Marcelo de Paula Campos, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em tudo, incondicionalmente, me oferecendo todo o suporte necessário, sempre ao meu lado. Eu amo vocês! Juntamente a eles, agradeço a Deus e todos os seres de luz que me guiaram e me guiam por todo caminho que percorro, me protegendo e me iluminando.

Ao meu orientador Marcone Augusto Leal de Oliveira, por me proporcionar grandes momentos de aprendizados e oportunidades, e que mesmo nas horas mais difíceis, pôde me trazer tranquilidade (principalmente durante a disciplina de quimiometria). Muito obrigado Mestre, por acreditar em meu potencial e estar sempre à disposição para conversarmos, você fez toda a diferença em minha caminhada neste capítulo da minha vida.

Ao pessoal do GQAQ, em especial Jéssica, Olívia, Maria Patrícia, Tatiane, Nerilson e Luiz Henrique pela companhia e suporte durante minha trajetória, a companhia de vocês tornaram os dias mais animados e os desafios menos solitários. Teremos que marcar uma reunião do clube da coxinha com coca para comemorarmos depois!

Ao meu coorientador Gustavo Amadeus Micke, pela acolhida em seu laboratório na UFSC, por me proporcionar grandes aprendizados e vínculos que levarei para toda vida e pela oportunidade de desenvolver meu lado científico.

Ao pessoal do LabEC, em especial a Ana, Kheyti, Samantha, Carolina, Victor e Riani, vocês são amigos que carrego bem no meu coração, obrigado pela companhia e por toda ajuda que me deram durante os três maravilhosos e inesquecíveis meses em Floripa. Em breve estarei chegando aí para ficar. Mal posso esperar para matar a saudade de vocês!

Aproveitando que estou passando por Floripa, deixo meus agradecimentos também ao meu querido amigo Michel e Escobar (o gato), pela acolhida em sua casa durante estes três meses, obrigado amigo pela ótima convivência e companhia, e pelas noites de cerveja e “músicas de humanas”. À minha segunda família também, Joh, Heitor, Marcelo, Bruna, Bia, André, Ariane, Davi, Sandra e Pernambuco, vocês são muito especiais para mim, agradeço muito pela nossa amizade e por cada momento juntos!

Voltando para Minas agora, não poderia deixar de agradecer por toda amizade, alguns de muitos anos, aos meus amigos, muito obrigado pela companhia de vocês, mesmo não tendo uma participação direta no meu mestrado, sem vocês, sem os nossos momentos juntos de diversão, de descontração, de papo sério, de suporte, eu não teria chegado longe. São as melhores companhias, confiáveis e sei que posso contar com vocês para qualquer coisa. Colegas nós temos aos montes, mas amigos de verdade, a gente conta nos dedos e guarda no coração, não citarei nomes, pois não é necessário, quem é sabe que este espaço é dedicado para você.

Por fim gostaria de agradecer a FAPEMIG pela disponibilização da bolsa durante o período previsto do mestrado, é gratificante e engrandecedor poder receber por aquilo que inspiramos e transpiramos para desenvolver.

RESUMO

A eletroforese capilar destaca-se como uma das técnicas analíticas mais promissoras devido ao seu caráter automatizado e confiável, além de ser uma técnica de separação flexível, precisa, altamente eficiente e requerer apenas pequenas quantidades de amostra para análise. Assim, a eletroforese capilar também foi reconhecida como uma técnica adequada para estudar reações enzimáticas e de radicais, incluindo a atividade de inibição enzimática de extratos de produtos naturais e fitoquímicos. Neste trabalho, aplicamos três métodos estabelecidos usando eletroforese capilar para analisar a capacidade de extratos de *Baccharis crispa* por maceração com etanol a 70% e etanol a 96% durante 5 dias, que possam inibir as enzimas acetilcolinesterase e α -glicosidase, e que também possam desempenhar atividade antinitrosante e antioxidante. No teste antinitrosante, foi avaliada a capacidade dos extratos em capturar as espécies nitrosantes, observando sua presença nos eletroferogramas. Para esta análise, nitrito, nitrato e tiocianato foram usados como uma mistura de padrões. A avaliação da atividade antinitrosante consiste na captura do nitrito pela amostra, reduzindo sua concentração inicial. O teste antioxidante foi realizado utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e quercetina como padrão antioxidante. Nesta análise, observou-se a área do pico do DPPH que representa a quantidade capturada pela amostra e pelo padrão interno. Para a análise da inibição das duas enzimas, a reação dos extratos com as mesmas ocorreu no interior do capilar através de múltiplas injeções. A quantidade de produto final dos substratos de cada enzima, permitiu calcular a capacidade de inibição dos extratos. Neste estudo, demonstramos a utilidade da eletroforese capilar como ferramenta para a avaliação das propriedades farmacológicas de plantas medicinais, utilizando a *Baccharis crispa*, e relatamos que é possível utilizar diferentes modos de eletroforese capilar como ferramenta de análise de reações e atividade inibitória. Além disso, a eletroforese capilar apresenta vantagens como redução da quantidade de solventes, amostras e padrões utilizados, tempo de análise reduzido e automação. No desenvolvimento da atividade antinitrosante, não foi possível utilizar os extratos macerados devido à interferência do metanol utilizado na diluição dos resíduos e por isso optou-se em utilizar a infusão como método de extração. Nesta análise houve 27,19% de captura do nitrito pela infusão. As amostras extraídas com etanol a 70% e 96% na concentração de 1 mg L, obtiveram capacidade antioxidante de 50,30% (equivalente a 34,84mg de quercetina por grama de extrato) e 42,22% (equivalente a 28,29mg de quercetina por grama de extrato) respectivamente quando incubadas e 58,40% (equivalente a 29,7,0mg de quercetina por grama de extrato) e 38,98% (equivalente a 18,71mg de quercetina por grama de extrato) respectivamente com incubação. Nas análises de reações enzimáticas, a enzima acetilcolinesterase foi inibida em 7,80% pelo extrato de maceração a 70% e 6,89% com o extrato de maceração a 96%. A enzima α -glicosidase foi inibida em 0,51% pelo extrato de maceração a 70%, porém o extrato de maceração a 96 não foi capaz de apresentar atividade inibitória para esta enzima. Neste estudo podemos observar a versatilidade de diferentes métodos empregando a eletroforese capilar para analisar três tipos de atividades, juntamente com as vantagens que esta técnica pode proporcionar.

Palavras chave: eletroforese capilar, antinitrosante, antioxidante, inibição enzimática, *Baccharis crispa*

ABSTRACT

Capillary electrophoresis stands out as one of the most promising analytical techniques due to its automated and reliable character, as well as being a flexible, accurate, highly efficient separation technique requiring only small amounts of sample for analysis. Thus, capillary electrophoresis has also been recognized as a suitable technique to study enzyme and radical reactions, including the enzyme inhibition activity of natural product extracts and phytochemicals. In this work, we applied three established methods using capillary electrophoresis to analyze the ability of *Baccharis crispa* extracts by maceration with 70% ethanol and 96% ethanol for 5 days, which can inhibit the enzymes acetylcholinesterase and α -glycosidase, and which can also perform antinitrosant and antioxidant activity. In the antinitrosant test, the ability of the extracts to capture nitrosating species was evaluated by observing their presence in the electropherograms. For this analysis, nitrite, nitrate, and thiocyanate were used as a mixture of standards. The evaluation of the antinitrosative activity consists in the capture of nitrite by the sample, reducing its initial concentration. The antioxidant test was performed using the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and quercetin as antioxidant standard. In this analysis, the area of the DPPH peak was observed, which represents the amount captured by the sample and the internal standard. For the analysis of the inhibition of the two enzymes, the reaction of the extracts with the enzymes occurred inside the capillary through multiple injections. The amount of end product of the substrates of each enzyme, allowed the calculation of the inhibition capacity of the extracts. In this study, we demonstrate the usefulness of capillary electrophoresis as a tool for the evaluation of pharmacological properties of medicinal plants, using *Baccharis crispa*, and report that it is possible to use different modes of capillary electrophoresis as a tool to analyze reactions and inhibitory activity. In addition, capillary electrophoresis has advantages such as reduced amount of solvents, samples and standards used, reduced analysis time and automation. In the development of the antinitrosive activity, it was not possible to use the macerated extracts due to the interference of the methanol used in the dilution of the residues and therefore it was opted to use the infusion as extraction method. In this analysis there was 27.19% nitrite capture by the infusion. The samples extracted with ethanol at 70% and 96% in concentration of 1 mg L, obtained antioxidant capacity of 50.30% (equivalent to 34.84mg of quercetin per gram of extract) and 42.22% (equivalent to 28.29mg of quercetin per gram of extract) respectively when incubated and 58.40% (equivalent to 29.7.0mg of quercetin per gram of extract) and 38.98% (equivalent to 18.71mg of quercetin per gram of extract) respectively with incubation. In enzyme reaction analyses, the enzyme acetylcholinesterase was inhibited by 7.80% by the 70% maceration extract and 6.89% with the 96% maceration extract. The enzyme α -glycosidase was inhibited by 0.51% by the 70% maceration extract, but the 96% maceration extract was not able to show inhibitory activity for this enzyme. In this study we can see the versatility of different methods employing capillary electrophoresis to analyze three types of activities, along with the advantages that this technique can provide.

Key words: capillary electrophoresis, antinitrosive, antioxidant, enzymatic inhibition, *Baccharis crispa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Baccharis crispa</i> Spreng.....	13
Figura 2	- Ocorrência do EOF.....	17
Figura 3	- Perfil de velocidade do fluxo radial e laminar.....	18
Figura 4	- Separação de mistura de analitos de natureza catiônica de acordo com sua mobilidade.....	19
Figura 5	- Esquema representativo do funcionamento de um sistema CE.....	21
Figura 6	- Simulação das soluções A e B dentro de um tubo capilar por difusão transversal de perfis de fluxo laminar.....	22
Figura 7	- Ciclo da ACh.....	26
Figura 8	- 1: Partes aéreas de <i>Baccharis crispa</i> colhidas do horto da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. 2: Partes aéreas de <i>Baccharis crispa</i> cortadas para secagem.....	29
Figura 9	- Maceração.....	30
Figura 10	- Plugues para atividade antioxidante.....	33
Figura 11	- Reação da AThCh com a AChE.....	34
Figura 12	- Reação do p-NPG com a α -GLI.....	35
Figura 13	- Descrição dos plugs para reações enzimáticas na avaliação da atividade inibitória enzimática dos extratos de <i>B. crispa</i> . CN corresponde ao controle negativo e CP corresponde ao controle positivo.....	36
Figura 14	- Eletroferogramas que representam o branco e controle positivo da análise de atividade antinitrosante.....	38
Figura 15	- Eletroferogramas das amostras para análise da atividade antinitrosante.....	38
Figura 16	- Microfiagramas da redução do DPPH das amostras e quercetina, sem incubação.....	42
Figura 17	- Microfiagramas da redução do DPPH das amostras e quercetina, com incubação.....	43
Figura 18	- Curva de distribuição normal teórica e de distribuição das amostras e o QQ Plot da redução das amostras sem incubação do teste de normalidade.....	45
Figura 19	- Curva de distribuição normal teórica e de distribuição das amostras e o QQ Plot da redução das amostras com incubação do teste de normalidade.....	45
Figura 20	- QQ Plot dos resíduos sem incubação do teste de normalidade e a distribuição dos resíduos.....	46
Figura 21	- QQ Plot dos resíduos com incubação do teste de normalidade e a distribuição dos resíduos.....	47
Figura 22	- Eletroferogramas da atividade inibitória da AChE para as duas amostras.....	50

Figura 23 - Controles negativos e positivo para atividade inibitória da AChE.....	51
Figura 24 - Eleroferogramas da atividade inibitória da α -GLI da amostra da extração hidroetanolica a 70%.....	52
Figura 25 - Eleroferogramas da atividade inibitória da α -GLI da amostra da extração hidroetanolica a 96%.....	52
Figura 26 - Eletroferogramas dos controles negativos do padrão interno e produto das duas amostras.....	53
Figura 27 - Eletroferogramas do controle positivo do padrão interno e produto.....	53

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1	- Áreas dos picos de nitrito das amosras e seus respectivos brancos.....	39
Tabela 2	- Atividade antinitrosante de infusão de <i>Baccharis crispa</i>	39
Tabela 3	- Atividade antioxidante de extratos de <i>Baccharis crispa</i> , sem incubação.....	42
Tabela 4	- Atividade antioxidante de extratos de <i>Baccharis crispa</i> , com incubação	43
Tabela 5	- Concentração das diluições da quercetina expressos em mgL^{-1} e a porcentagem referente à redução do DPPH. Sem a incubação da quercetina.....	44
Tabela 6	- Concentração das diluições da quercetina expressos em mgL^{-1} e a porcentagem referente à redução do DPPH. Com a incubação da quercetina.....	44
Tabela 7	- Áreas de pico de triplicatas dos produtos e padrões internos dos controles positivos, controles positivos e ensaios de duas esferas enzimáticas.....	54
Tabela 8	- Atividade de inibição das enzimas AChE e α -GLI pelos extratos de <i>Baccharis crispa</i>	54
Gráfico 1	- Curva da redução do DPPH sobre a concentração da quercetina sem incubação, para a obtenção da equação da reta.....	48
Gráfico 2	- Curva da redução do DPPH sobre a concentração da quercetina com incubação, para a obtenção da equação da reta.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISAO DE LITERATURA.....	16
3.1	ELETROFRESE CAPILAR.....	16
3.1.1	Princípios e Fundamentos.....	16
3.1.2	Modo de Separação em Eletroforese Capilar.....	19
3.1.3	Instrumentação.....	20
3.1.4	Difusão Transversal de Perfis de Fluxo Laminar.....	21
3.1.5	Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar.....	23
3.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
3.2.1	Espécies Reativa de Oxigênio.....	24
3.2.2	Espécies Reativa de Nitrogênio.....	25
3.3	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	26
3.3.1	Acetilcolinesterase.....	26
3.3.2	α-Glicosidase.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	28
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	29
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES E MÉTODOS.....	30
4.3.1	Atividade Antinitrosante.....	30
4.3.2	Atividade Antioxidante.....	32
4.3.3	Inibição Enzimática.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	ATIVIDADE ANTINITROSANTE.....	37
5.2	ATIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	40
5.3	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	50
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A *Baccharis crispa* Spreng é uma planta medicinal pertencente à família *Asteraceae*, da tribo *Astereae*, popularmente conhecida como carqueja. O gênero *Baccharis* possui mais de 500 espécies, sendo a carqueja utilizada na medicina tradicional e no preparo de medicamentos fitoterápicos (KARAM et al, 2013; BORELLA et al, 2006).

Nativa da região sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina, é um arbusto que pode atingir o tamanho entre 0,5 cm a 1,0 metro de altura e possui três alas descontínuas com largura de 0,5 a 1,3 cm, que estão dispostas de modo equidistantes no eixo caulinar. Suas partes aéreas são utilizadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais, hepáticos e renais, diabetes, reumatismo, circulação sanguínea e processos antiinflamatórios nas formas de infusão, decocção e maceração (KARAM et al., 2013; MINTEGUIAGA et al., 2017; SABIR et al., 2017; BUDEL; DUARTE, 2009).

Figura 1 - *Baccharis crispa* Spreng.



Fonte: RABELO; COSTA (2018).

A carqueja foi escolhida para este trabalho por ser uma planta de uso popular, estando presente em farmácias na forma de extratos, formulações e de suas partes aéreas desidratadas para o preparo de chás.

Estudos descrevem a presença de flavonoides e outros compostos fenólicos na planta, assim como óleos essenciais e saponinas (KARAM et al, 2013). Os compostos fenólicos possuem a capacidade de combater espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS, do inglês *reactive oxygen and nitrogen species*). Estes compostos também podem combater estas espécies reativas, inibindo as enzimas responsáveis pelas suas formações (HUSSAIN et al., 2016; RABELO; COSTA, 2018) desempenhando assim, atividades antioxidante e antinitrosante. As RONS provocam reações dentro do organismo que como consequência produzem espécies radicalares e/ou não radicalares, que estão relacionados a causa de doenças e danos em nosso organismo (RABELO; COSTA, 2018).

Além das atividades antioxidante e antinitrosante, é possível que os extratos da carqueja tenham a capacidade de inibir reações enzimáticas devido aos compostos fenólicos presentes e por isto, foram escolhidas as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e α -glicosidase (α -GLI) para este estudo. Com inibição da AChE poderia ser possível a utilização do extrato da planta para o tratamento de doenças como o Alzheimer, e a inibição da α -GLI, auxiliar o tratamento de pessoas com diabetes (RABELO; COSTA, 2018; RUANI; VITALI; MICKE, 2018; RUANI, 2019; SIEBERT et al., 2019).

A eletroforese capilar é uma ferramenta analítica que tem apresentado grandes vantagens para a análise e identificação de compostos, além de ser possível qualificação e quantificação dos mesmos, em curto período de tempo de análise, com a utilização de quantidades reduzidas de solventes, reagentes e amostras. É possível mediar e monitorar as reações dentro dos tubos capilares, obter a quantificação dos produtos gerados, assim como realizar micro ensaios enzimáticos (TAVARES, 1996; SPUDEIT et al., 2012).

O foco deste estudo será em demonstrar os diferentes métodos utilizados como alternativa para as análises propostas demonstrando as vantagens mencionadas anteriormente ao utilizar a eletroforese capilar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Utilizar a eletroforese capilar, como técnica analítica alternativa de triagem para o estudo da atividade antinitrosante, antioxidante e inibição enzimática de extratos de *Baccharis crispa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Preparar os extratos por maceração com etanol a 70% e a 96% de *B. crispa*.
- Calcular a capacidade de captura de nitrito pelos extratos de *B. crispa*.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *B. crispa* pelo cálculo da porcentagem de redução do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e calcular a sua equivalência em quantidade de quercetina em miligrama por grama de extrato.
- Calcular a quantidade em porcentagem da inibição das enzimas acetilcolinesterase e α -glicosidase, pelos extratos da *B. crispa*.
- Demonstrar as vantagens do uso da eletroforese capilar.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ELETROFORESE CAPILAR:

3.1.1 Conceito, Princípios e Fundamentos:

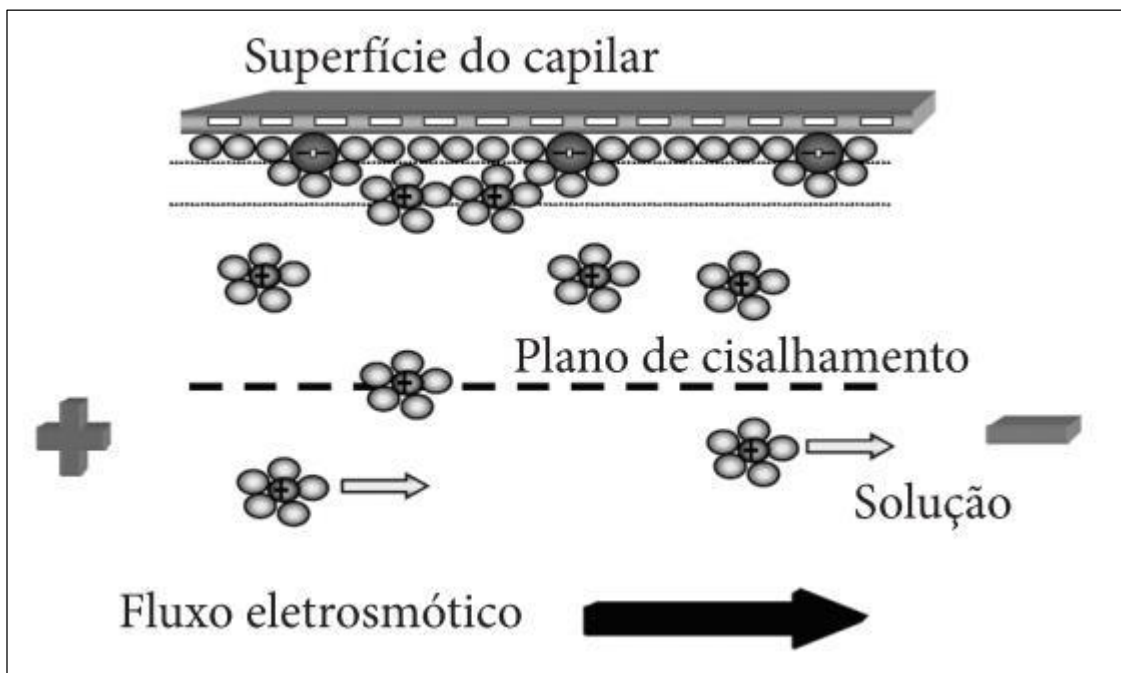
A partir da década de 80, houve a implementação de uma sofisticada técnica de separação, a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) (TAVARES, 1997). A CE pode ser definida como uma técnica em que a separação é baseada na diferença de migração entre compostos ionizáveis, neutros e íons solvatados, que quando introduzidos ao tubo capilar de sílica fundida de micro volume interno, contendo em seu interior uma solução eletrolítica, estão sujeitos a aplicação de alta tensão contínua da ordem de quilovolts e portanto, a ação de um campo elétrico elevado, porém com amperagem da ordem de microampéres (TAVARES, 1996; SPUDEIT et al., 2012, TAGLIARO et al., 1998).

O efeito Joule, é o fenômeno que ocorre pelo calor gerado, devido a passagem da corrente elétrica pelo meio condutor. Este aumento de temperatura induz gradientes de densidade e, conseqüentemente, gera fluxos convectivos que são responsáveis pela mistura de bandas já separadas. É a maior limitação presente na técnica de eletroforese (TAVARES, 1996). Para dissipar o calor gerado pelo efeito Joule, foi empregado o uso de colunas capilares na eletroforese devido a sua grande área superficial externa e diâmetros na ordem de micrômetros, dando assim a origem do nome da técnica. De acordo com as dimensões e geometria do capilar, além da dissipação do calor gerado pelo efeito Joule, surgiram outras vantagens na utilização desta técnica, como a utilização de campos elétricos elevados de 100 a 1000 V cm⁻¹, a redução do tempo das análises e a utilização reduzida de volume de amostras e solventes, na escala de 1 a 10 nano litros (nL) (TAVARES, 1996; SPUDEIT et al., 2012). De maneira geral, as dimensões das colunas capilares utilizadas em CE podem variar de 10 a 100 cm de comprimento e 25 a 75 µm de diâmetro interno (GAŠ, 2009; SPUDEIT et al., 2012).

Os capilares geralmente são feitos de sílica fundida, podendo ser revestidos externamente com polímeros (poliimida ou poliacrilato são os mais comuns), que proporcionam maior flexibilidade e resistência ao tubo capilar. Quando se utilizam capilares com revestimento externo, deve-se remover uma fração do revestimento polimérico externo para a abertura da janela de detecção (GAŠ, 2009; SPUDEIT et al., 2012).

Os capilares de sílica fundida possuem grupos silanóis (-SiOH) e siloxanos (Si₂O) em sua parede interna, os quais são responsáveis pela geração do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*), um fenômeno formado pela interação entre os grupos silanóis com o solvente utilizado. Estes grupos possuem perfil de caráter ácido, que ao entrar em contato com o meio aquoso são parcialmente ionizados, tornando a superfície carregada negativamente e ao aplicar o campo elétrico tangencialmente à superfície do capilar, é obtido um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta (TAVARES, 1996; SPUDEIT et al., 2012; VAZ, 2015).

Figura 2 - Ocorrência do EOF.



Fonte: SPUDEIT et al., 2012.

Um EOF normal, ocorre quando os íons solvatados, por transferência de momento, transportam moléculas de água que, por sua vez, acabam induzindo o fluxo da solução em direção ao polo negativo (cátodo). A velocidade do EOF pode ser calculada pela seguinte equação:

$$V_{\text{EOF}} = (\epsilon \zeta / \eta) E$$

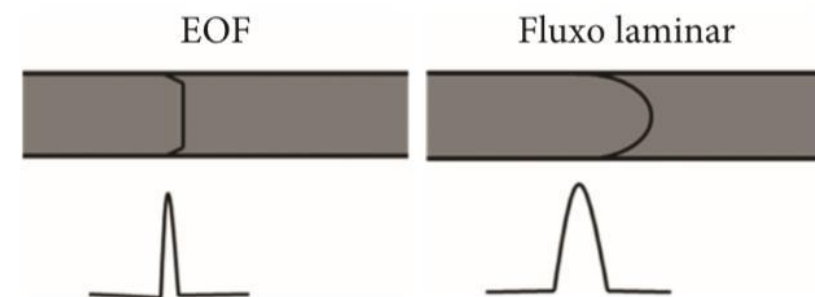
Equação 1

onde ϵ é a constante dielétrica; η é a viscosidade do eletrólito; E é o campo elétrico aplicado e ζ é o potencial zeta que é determinado pela carga na superfície do capilar (SPUDEIT et al., 2012).

A velocidade do EOF dependerá do pH do meio, devido ao fato de os grupos silanóis dependerem do pH para ionizar. Como os grupos silanóis possuem caráter ácido, na presença de uma solução de eletrólito com pH alcalino, a velocidade do EOF gerado será maior do que em pH ácido, por haver maior desprotonação na parede do capilar (GERVASIO, 2003).

Um perfil radial eletrosmótico, característico da técnica de CE, permite separações com maior eficiência, diferente de um perfil de velocidade parabólico, presente em técnicas de cromatografia por exemplo que possuem um fluxo gerado por pressão (laminar). A Figura 3 ilustra os dois tipos de fluxo, radial e laminar (GAŠ, 2009).

Figura 3 - Perfil de velocidade do fluxo radial e laminar.



Fonte: SPUDEIT et al. (2012).

A mobilidade efetiva (μ_{ef}) é um termo utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. Ela pode ser calculada pela definição de Tiselius, onde qualquer substância “i” presente em uma solução em diferentes formas “j”, relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base, poderá migrar em um campo elétrico como um único soluto (TAVARES, 1996). Esta equação pode ser representada da seguinte forma:

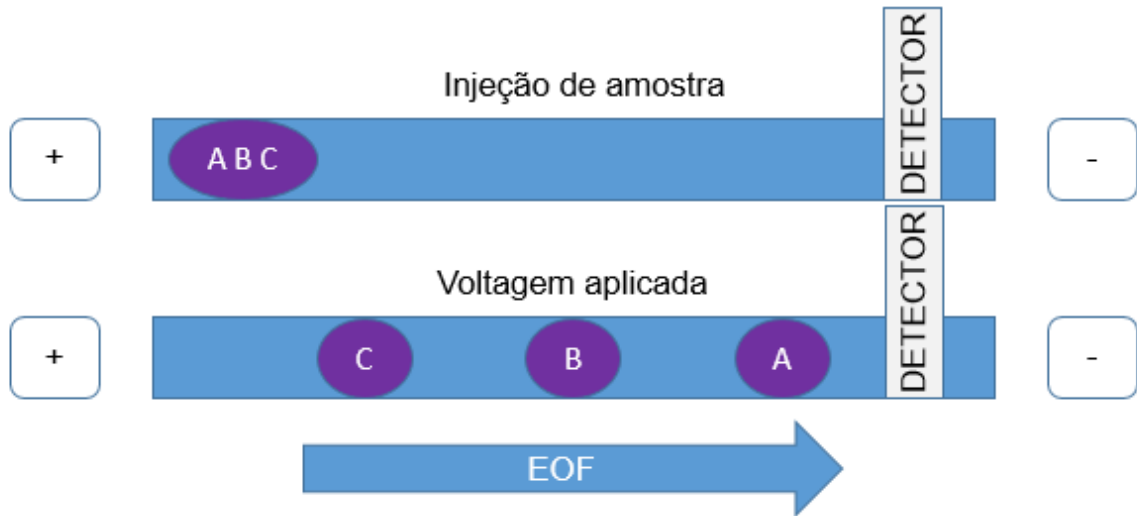
$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_i \alpha_j)$$

Equação 2

onde α_j é a fração molar ou função de distribuição, e μ_i a mobilidade iônica de cada espécie.

Na Figura 4 é apresentada uma separação hipotética por CE de uma amostra contendo mistura de analitos (cátions). Nela podemos observar a migração em direção ao cátodo e o estabelecimento do EOF no momento em que é aplicada a voltagem. Juntamente com a diferença de mobilidade dos analitos, é possível observar a separação dos analitos injetados.

Figura 4 - Separação de mistura de analitos de natureza catiônica de acordo com sua mobilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Cada analito possui sua própria mobilidade eletroforética (μ_{ep}), e a diferença das mobilidades de cada um deles fará com que ocorra a separação. A μ_{ep} depende do número de cargas em sua forma iônica (z), carga elementar (e), campo elétrico aplicado (η) e do raio esférico (r) (VAZ, 2015; JAGER; TAVARES, 2001). Sendo assim, a mobilidade eletroforética de um analito pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\mu_{ep} = ze/6\pi\eta r$$

Equação 3

Antes de ser realizada a análise por CE é necessário que seja feito o condicionamento do capilar. Inicialmente é realizada uma limpeza (*flush*) em seu interior utilizando uma solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, injetada por pressurização positiva, para que os íons OH⁻ removam os íons H⁺ dos grupos silanóis e rompam as ligações dos siloxanos. Após a passagem de NaOH é realizado *flush* com água para remover os íons Na⁺, deixando a interface capilar/solução efetivamente negativa. Somente após esta limpeza, é realizada o condicionamento do capilar, utilizando o eletrólito desejado para a análise (VAZ, 2015).

3.1.2 Eletroforese Capilar de Zona:

Existem diferentes modos de separação por CE. A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997) é o modo de eletroforese de maior utilização devido a sua aplicabilidade na separação

de ânions e cátions presentes em uma amostra de acordo com suas diferenças de massa e carga, com uma única corrida (BAKER, 1995). O tubo capilar é preenchido com eletrólito que geralmente possui características tamponantes e, com o aumento da diferença das mobilidades efetivas dos solutos e a redução das causas de alargamento de zona, é possível realizar a separação utilizando este modo (TAVARES, 1997).

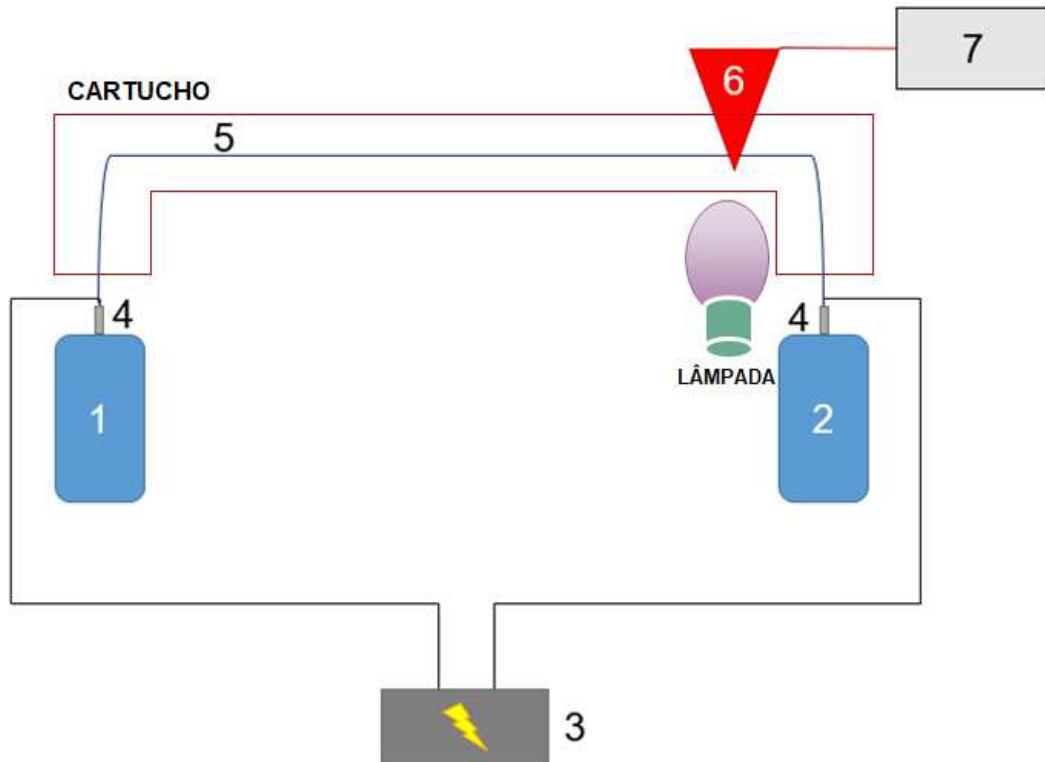
3.1.3 Instrumentação:

Em CE a amostra pode ser introduzida nos capilares através de injeção eletrocinética ou hidrodinâmica. Na injeção eletrocinética, a quantidade de amostra injetada está em função da mobilidade eletroforética do soluto, da condutividade da amostra e condutor e da magnitude do EOF. Porém, se uma amostra possui solutos de baixa mobilidade, estes podem ser discriminados durante a detecção (TAVARES, 1996).

A injeção hidrodinâmica utiliza um gradiente de pressão. Este modo de injeção é mais preciso do que a injeção eletrocinética, por se basear apenas na transferência de volume. O gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes modos, como pressurização, vácuo ou gravidade. A única desvantagem deste modo é a possibilidade de um alargamento significativo da zona devido ao perfil de velocidade parabólico, por causa da indução por pressão (TAVARES, 1996).

Para a realização das análises, condicionamento e “limpeza” do capilar são utilizados *vials* como recipiente. São referidos como “*vials inlet*” aqueles que irão levar amostra ou solvente/eletrólito para ser injetado no capilar e os “*vials outlet*” são os de saída, onde o que foi injetado será descartado (BAKER, 1995). Na Figura 5 está apresentado um esquema básico do sistema de CE e seus principais componentes.

Figura 5 – Esquema representativo do funcionamento de um sistema CE. 1 e 2 - *vials inlet e outlet*, respectivamente; 3 - fonte de alta tensão; 4 - eletrodos que aplicam a tensão elétrica; 5 – capilar; 6 - sistema de detecção; 7 - computador ou integrador.



Fonte: Elaborado pelo autor.

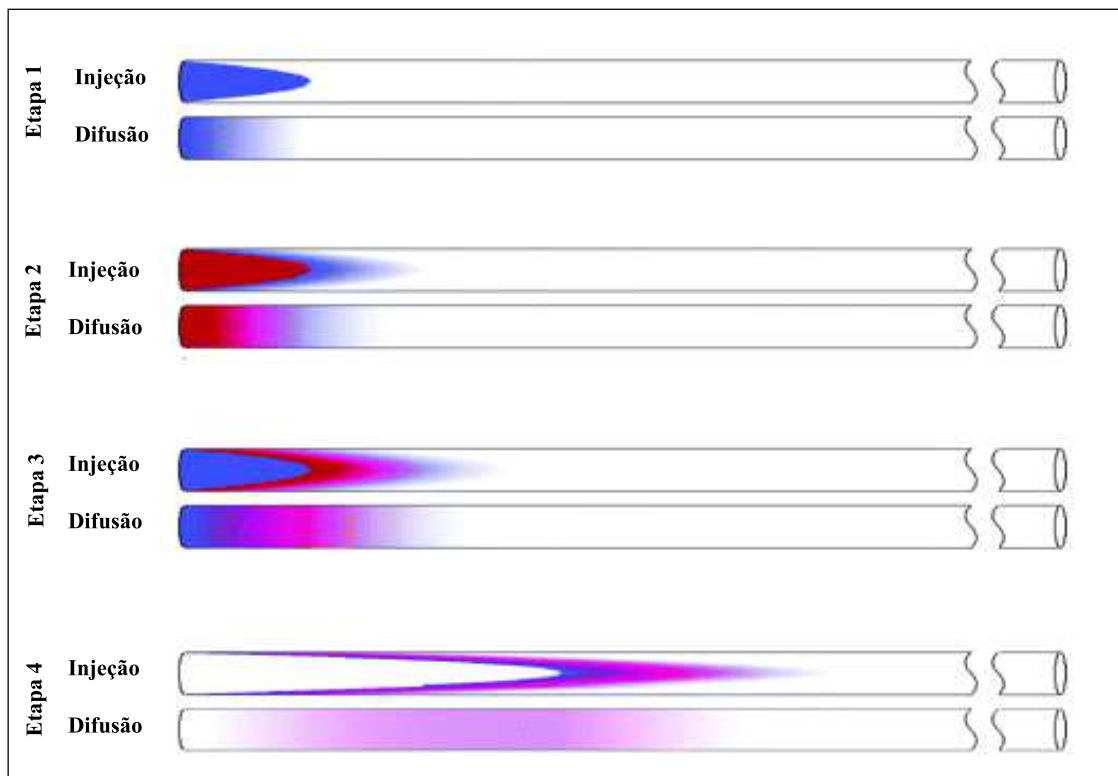
Para a detecção dos compostos analisados, pode-se utilizar uma grande variedade de detectores. O detector mais utilizado é por absorção eletrônica no ultra violeta/visível (UV/vis). Porém, também podem ser utilizados outros detectores como fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, e em alguns casos dois ou mais detectores podem ser conectados em série (BAKER, 1995).

3.1.4 Difusão Transversal de Perfis de Fluxo Laminar:

A difusão transversal de perfis de fluxo laminar (TDLFP, do inglês *Transverse Diffusion of Laminar Flow Profiles*) é um método que se baseia na injeção de um *plug* (fração de volume introduzido no interior do capilar) no capilar por pressão, obtendo-se perfis parabólicos e, através da difusão transversal, ocorrerá a mistura desses *plug*. Para uma melhor compreensão de como ocorre este método, será descrito uma análise hipotética, onde em uma etapa inicial é injetado o primeiro *plug* (solução A) e logo após é aplicada uma pressão onde ocorrerá a difusão transversal do perfil parabólico, eliminando o gradiente de concentração na direção transversal. Na segunda etapa, é injetado um *plug* (solução B) de mesmo volume que o primeiro, e os

dois irão apresentar uma interface entre eles; a difusão transversal irá novamente eliminar o gradiente de concentração na direção transversal e com isso haverá a mistura das duas soluções. Novamente é injetado a solução A como terceira etapa, mantendo o mesmo volume, que irá se misturar aos dois *plugs* já injetados. Na quarta e última etapa, é injetado um *plug* de solução tampão, de volume igual ao total dos três primeiros *plugs*, que irá se misturar a eles, resultando em perfis de concentração próximos (Okhonin et al., 2005). A Figura 6 foi retirada e adaptada do artigo de Okhonin e colaboradores (2005), onde está ilustrada as quatro etapas descritas.

Figura 6 - Simulação das soluções A e B dentro de um tubo capilar por difusão transversal de perfis de fluxo laminar.



Fonte: adaptação de Okhonin et al. (2005).

O último *plug* de solução tampão tem a função de melhorar a uniformidade dos *plugs* que foram injetados e misturados anteriormente. É importante ter o cuidado de não injetar um volume maior de tampão, pois este pode resultar na diluição dos reagentes (Okhonin et al., 2008).

Pulsos de pressão negativa e positiva são aplicados, alternadamente, após a injeção do último *plug* para evitar a utilização de um volume maior do *plug* terminal. Esta inversão de pressão possui efeito similar da utilização de um *plug* terminal

grande, evitando a diluição e utilização de *plugs* longos (Okhonin et al., 2008; Krylova et al., 2009).

A escolha de utilizar o TDLFP tem como vantagem facilitar a mistura dos reagentes injetados dentro do capilar. A difusão transversal realiza com maior eficiência a mistura, por reduzir a distância em que as moléculas precisam percorrer para se difundirem, tornando a técnica mais rápida (Okhonin et al., 2008).

3.1.5 Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar:

A microanálise medida por eletroforese capilar (EMMA, do inglês *Electrophoretically Mediated Microanalysis*) permite a análise de reações. Dentre elas estão as reações enzimáticas, um dos focos deste estudo, tendo dois modos em CE. No modo pré-capilar a reação ocorre fora do capilar, preparando uma solução contendo todos os componentes (cofator, substrato, enzima) presentes e posteriormente é retirada uma alíquota para a identificação do produto desta reação. O modo *on-column* é quando a reação ocorre dentro do capilar, todos os componentes são injetados dentro do capilar como plugues e estes são misturados através da difusão ou aplicação de um campo elétrico por um curto período de tempo. Espera-se um tempo para que ocorra a reação e por fim é aplicada uma tensão para que ocorra a separação e identificação dos produtos (FAN; SCRIBA, 2010; SCRIBA; BELAL, 2015).

Existem também dois modos de injeção através do EMMA, a injeção de longo contato, onde o capilar é preenchido com um dos reagentes e o outro é injetado como um *plug*. A injeção de curto contato ou *plug-plug*, utiliza-se o mesmo tampão para a encubação e corrida no capilar e os componentes para a reação são injetados separadamente por meio de *plugs* (LIU; SHI; CHEN, 2015; RAMANA et al., 2015).

Diversos métodos foram desenvolvidos utilizando o EMMA ao longo dos anos, para estudos de avaliação das atividades de diferentes enzimas como, acetilcolinesterase relacionada a doença de Alzheimer, a α – glicosidase com o diabetes e a enzima conversora de angiotensina com a hipertensão arterial (MIN et al., 2012; BAJDA; WIĘCKOWSKA; MALAWSKA, 2009; IQBAL et al., 2013; GUO et al., 2010; VAN DYCK et al., 2003a, 2003b).

3.2 ESTRESSE OXIDATIVO: CONCEITO, FUNDAMENTOS E APLICAÇÃO

A oxidação é um processo natural que faz parte do metabolismo celular, produzindo radicais livres, que apresentam funções fisiológicas importantes, mas se em excesso, podem causar disfunções biológicas. Estes radicais que possuem um elétron desemparelhado em átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio na produção de espécies oxidantes e o acúmulo destes no organismo, podendo desencadear doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, cancerígenas e também o surgimento de doenças como diabetes (WEIDINGER et al., 2015).

A geração de maiores quantidades de radicais livres ocorre principalmente nas mitocôndrias celulares, por meio da cadeia transportadora de elétrons durante a metabolização dos nutrientes. Outra fonte destes radicais são as membranas celulares através das enzimas NADPH oxidases, cuja função é de transferir elétrons pela membrana. Estas reações podem ser favorecidas pelos íons de ferro e cobre presentes em nosso organismo, sendo potencialmente ativos em reações e óxido-redução, se tornando assim, catalizadores nas reações de geração de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

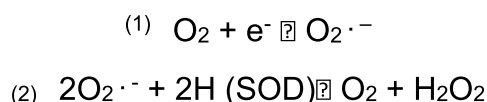
3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio:

As EROs englobam os radicais livres que são gerados durante reações metabólicas e também por espécies não radicalares. As principais espécies que englobam este grupo são, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}), alcóxila (RO^{\cdot}) e hidroperóxil (HO_2^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

O superóxido é o radical mais potente na indução de dano celular (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010). Pode ser gerado através da redução parcial do oxigênio, pelas reações de transferência de elétrons dentro das mitocôndrias (1). Apesar de causar sérios danos ele desenvolve uma função vital para as células de defesa em nosso organismo, sendo liberado durante os processos inflamatórios (BARREIROS et al., 2006; PHANIENDRA et al., 2015).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a desmutação do superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio, uma espécie menos reativa e que pode ser degradado por outras enzimas como a glutathiona peroxidase (OLIVEIRA;

SCHOFFEN, 2010). O peróxido de hidrogênio (2), mesmo sendo menos reativo com relação as outras moléculas, é capaz de transpor as membranas celulares e gerar hidroxilas, contribuindo assim para o estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006).



Outro radical importante é a hidroxila, por ser a espécie mais reativa (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010). Esta molécula é capaz de reagir com o DNA, RNA, proteínas, lipídeos e outros constituintes celulares e não há um mecanismo de eliminação enzimático para as hidroxilas. Ele é formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição, como o ferro presente no organismo e também pela hidrólise da água por exposição à radiação ionizante (BARREIROS et al., 2006).

Das espécies não radicalares, o oxigênio singlete é o que apresenta maiores danos, acelerando o processo de estresse oxidativo. Esta espécie poder ser produzida através de reações de fotossensibilização, devido a exposição à luz ultravioleta A (UVA), além de reações enzimáticas a partir do peróxido de hidrogênio, por exemplo (PHANIENDRA et al., 2015; ONYANGO, 2016). Apesar dos danos que essa espécie pode causar, o oxigênio singlete também pode atuar de forma benéfica durante a defesa contra infecção de microrganismos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

3.2.2 Espécies Reativas de Nitrogênio:

As principais ERNs presentes em nosso organismo são o óxido nítrico (NO^{\cdot}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). O óxido nítrico é gerado através de reações enzimáticas, como a óxido nítrico sintase, na presença de oxigênio e NADPH, responsável pela produção de óxido nítrico (BARREIROS et al., 2006). Este radical é um vasodilatador e participa na regulação da função mitocondrial e relaxamento muscular (VASCONCELOS et al., 2007).

O nitrato é convertido em nitrito, que ao reagir com ácidos gástricos, gera o ácido nitroso, que é responsável pela desaminação de bases do DNA que possuem um grupo NH_2 livre (BARREIROS et al., 2006). A ingestão de alimentos a base de carne é a principal fonte de nitrito, por este ser utilizado nestes alimentos como inibidor do crescimento de microrganismos, além de melhorar a coloração destes produtos.

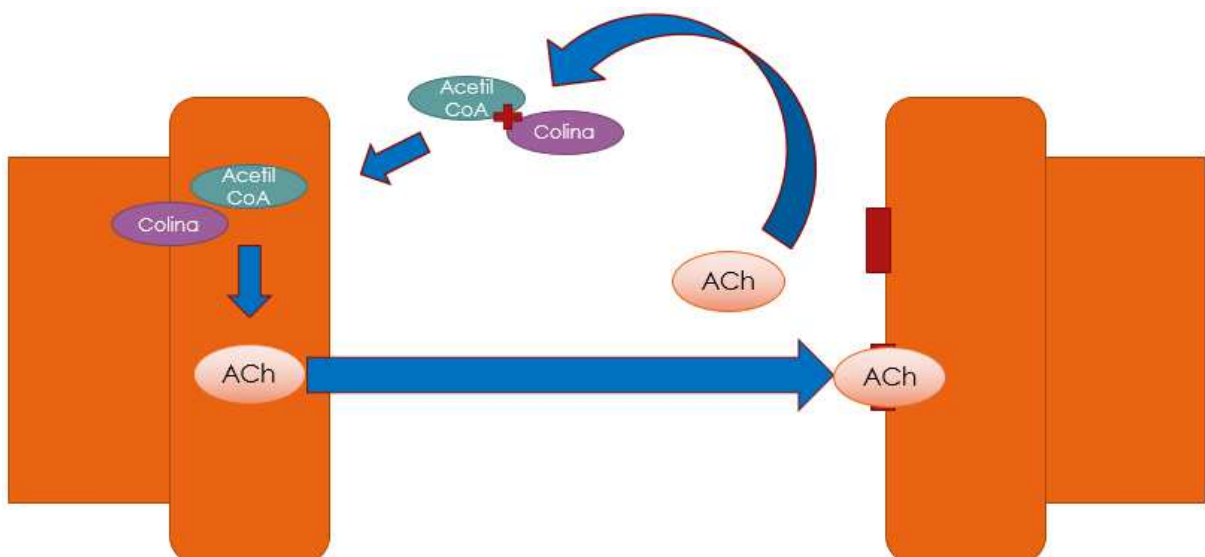
Tanto o nitrito quanto o nitrato estão relacionados com a diabetes do tipo 1 e são fatores de risco para o câncer de tireoide e glioma (XIE et al., 2016; MERINO et al., 2017).

3.3 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA:

3.3.1 Acetilcolinesterase:

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor responsável pela transmissão de mensagens de um neurônio para o outro. Ela é formada no neurônio pré-sináptico a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e da colina, sob catálise da enzima colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas e será liberada na sinapse colinérgica assim que houver um estímulo. Após sua liberação, ela se ligará ao receptor pós-sináptico, propagando a informação e, ao final deste processo, a ACh voltará à fenda sináptica onde sofrerá hidrólise catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), dando origem à colina e acetato, que posteriormente se tornará acetil CoA e colina, dando início novamente ao ciclo (Figura 7). A AChE é encontrada em maior quantidade no sistema nervoso central, músculos esqueléticos e nas membranas dos eritrócitos. (RANG et al., 2007).

Figura 7 - Ciclo da ACh.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A utilização de inibidores da AChE pode ser empregada no tratamento de pacientes portadores de Alzheimer, por estes apresentarem uma neurodegeneração dos neurônios colinérgicos. Por apresentarem um déficit de ACh devido a morte

destes neurônios, é interessante que a AChE diminua a hidrólise deste neurotransmissor, induzindo melhora no perfil cognitivo e efeitos de comportamento causados pela doença (ARAÚJO et al., 2016).

Com a finalidade de avaliar a capacidade de inibição da AChE, Ellman e colaboradores (1961) desenvolveram uma técnica no qual um substrato, acetiltiocolina (AThCh) é hidrolisado pela AChE, produzindo tiocolina (TCh), que ao reagir com o ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico), ou reagente de Ellman, produz uma substância de cor amarela (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) detectável em espectro UV de 412 nm. Estudos comprovaram que a utilização do reagente de Ellman é uma técnica que pode resultar em um falso positivo devido ao fato de que vários compostos podem interromper a reação com o reagente. Por este motivo, pesquisadores desenvolveram novas técnicas baseadas em fluorescência, com a finalidade de conseguir uma melhor forma de avaliar a inibição da AChE (TANG et al., 2007).

Os fármacos utilizados como inibidores da AchE são denominados anticolinesterásicos, são utilizados no tratamento da doença de Alzheimer justamente por impedirem que a enzima hidrolise a ACh, que nesta situação se encontra em menores quantidades. Fármacos como donepezil, rivastigmina e tacrina, são comumente utilizados, porém possuem efeitos colaterais muito indesejáveis, como a elevada toxicidade hepática e desconfortos gastrintestinais (ARAÚJO et al., 2016).

3.3.2 α -Glicosidase:

A enzima α -glicosidase (α -GLI) é responsável pela quebra dos carboidratos ingeridos pela alimentação que são absorvidos durante a última etapa da digestão no intestino, ela é responsável pela quebra nas ligações do tipo α -1,4 destes carboidratos, especificamente. A atividade da α -GLI pode ocasionar no aumento glicêmico, oferecendo riscos para portadores de diabetes mellitus. Neste caso é necessário realizar a regulação da glicemia e uma das formas disponíveis é através da inibição desta enzima, diminuindo a absorção de carboidratos provenientes da dieta e reduzindo a quantidade de glicose presente na circulação sanguínea (LEBOVITZ, 1997; GUO et al., 2010).

A acarbose é um inibidor da α -GLI intestinal, utilizado por pessoas com o diabetes do tipo 2, quando a doença não está controlada por dieta. Ela retarda a

absorção dos carboidratos, reduzindo o aumento da glicemia pós prandial (LAAR et al., 2005).

Fármacos utilizados na inibição desta enzima costumam oferecer efeitos colaterais, a maioria gastrointestinais como flatulência, diarreia e desconforto abdominal. Por isso é de grande importância o desenvolvimento de novos compostos capazes de oferecer a atividade terapêutica desejada, evitando ao máximo causar efeitos adversos (LEBOVITZ, 1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES:

Os reagentes utilizados nas análises são todos de grau analítico e a água utilizada foi deionizada através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Para a análise da atividade antinitrosante, o ácido perclórico (65%) e a β -alanina (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), os padrões de nitrito de sódio, nitrato de sódio e tiocianato de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Utilizou-se o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) adquirido pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), assim como o padrão de quercetina para as análises de atividade antioxidante.

Na análise de inibição enzimática foram utilizadas as enzimas acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (EC.3.1.1.7) e α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), iodeto de acetiltiocolina, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (p-NPG), acarbose, metilsulfato de neostigmina, tetraborato de sódio anidro (TBS) e, ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$), e metanol grau HPLC (MeOH) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), diidrogenofosfato de sódio monohidratado adquirido da Fischer Chemical Co. (Fair Lawn, NJ, EUA), ácido bórico (H_3BO_3) e hidrogenofosfato de sódio anidro adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH) de Neon Comercial (São Paulo, SP, Brasil).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS:

As partes aéreas de *Baccharis crispa* foram coletadas no mês de janeiro de 2019, no Horto de Plantas Medicinais da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais (21°46'37.4"S 43°22'00.1"W). A autenticação e exsicata da espécie se encontram no herbário Leopoldo Krieger localizado no Instituto de Ciências Biológicas da universidade, registrada com o número de identificação 48252.

Figura 8 – 1: Partes aéreas de *B. crispa* colhidas do horto da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. 2: Partes aéreas de *B. crispa* cortadas para secagem.



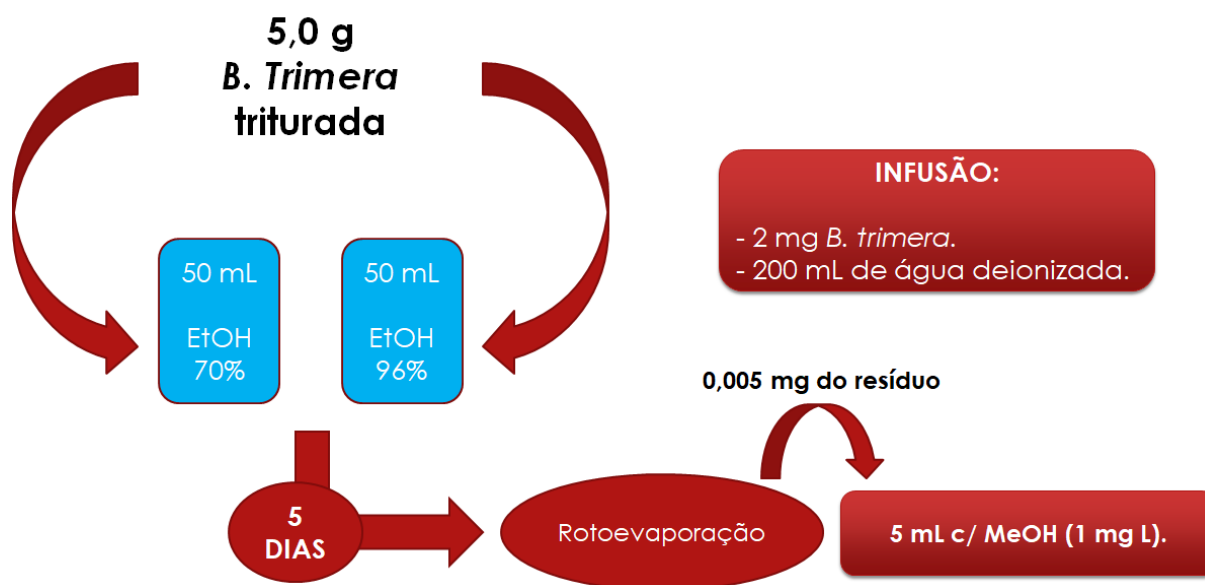
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após coletadas as partes aéreas da planta, foi realizado a secagem em estufa a 40°C, por um período de quatro dias e, posteriormente a trituração em um moinho de lâminas. Com a obtenção do pó, a extração por maceração e infusão foram realizadas.

Foram pesados duas vezes 5,0 g do triturado da *B. crispa* e em uma porção foi acrescentado 50,0 mL de solução etanólica a 70% (por ser a concentração usualmente utilizada em extrações) e na outra porção, 50,0 mL de solução etanólica a 96% (o mais próximo ao etanol 100%). A maceração foi realizada em um período de cinco dias, em frascos protegidos da iluminação externa, mantidos em temperatura ambiente. Após os cinco dias, os extratos foram filtrados e concentrados em rotoevaporador até sua quase total evaporação, tendo a presença do líquido residual, conferindo ao resíduo a característica de “graxa”.

Na Figura 9 está ilustrado todo o processo do processo de extração e do preparo das soluções estoque utilizadas como amostras.

Figura 9 - Maceração.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A ressuspensão do resíduo foi realizada para se obter uma concentração de 1 mg L em metanol para cada macerado. Pesou-se 0,005 mg do resíduo da maceração com etanol a 70% para ser diluído em 5 mL de metanol de grau HPLC, o mesmo foi feito com o resíduo da maceração com etanol a 96%. As soluções de cada uma das macerações foram armazenadas em frascos ambarados e guardados a temperatura ambiente em ambiente escuro.

Para a análise de atividade antinitrosante foi preparada uma infusão, no momento do teste, utilizando 2 g da planta triturada e 200 mL de água deionizada. A infusão foi necessária, devido à interferência do metanol durante a análise. Ela foi realizada aquecendo a água até chegar ao seu ponto de ebulição, posteriormente foi adicionado o triturado durante 30 minutos. Após o tempo de infusão, filtrou-se utilizando um algodão e um funil de vidro para a obtenção do extrato.

O equipamento de eletroforese utilizado foi da Agilent® CE 7100, a partir dos eletroferogramas gerados, foram calculadas as áreas dos picos utilizando o programa Agilent Chem Station.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES E MÉTODOS:

4.3.1 Atividade Antinitrosante:

Para a medida da atividade antinitrosante, foi utilizado um método desenvolvido por Ruani; Vitali; Micke (2018). Este método consiste na captura do nitrito pela amostra, reduzindo a sua concentração inicial.

Foram preparados os *vials* de controle negativo, contendo 350 μ L de uma solução de nitrito de sódio (1,45 mmol L⁻¹), 350 μ L de ácido perclórico (15 mmol L⁻¹) e 350 μ L de água deionizada com baixa concentração de oxigênio; dois *vials* com as amostras, em duplicata, contendo 350 μ L da infusão, 350 μ L de nitrito de sódio (1,45 mmol L⁻¹) e 350 μ L de ácido perclórico (15 mmol L⁻¹); as soluções brancas foram preparadas também em duplicata com 350 μ L da infusão, 350 μ L do ácido perclórico (15 mmol L⁻¹) e 350 μ L de água deionizada com baixa concentração de oxigênio. O tiocianato de sódio com concentração final de 0,15 mmol L⁻¹, foi utilizado como padrão interno (RUANI; VITALI; MICKE, 2018).

Os *vials*, com exceção do padrão interno, foram incubados durante uma hora em estufa a 37°C (pH 2,3) com o objetivo de simular o meio onde ocorrem as reações. Após a incubação, foi adicionada a β -alanina (90 mmol L⁻¹) no *vial* contendo a amostra e controle. Utilizou-se o gás nitrogênio em todos os frascos e *vials* utilizados durante o experimento e na água deionizada, para a máxima retirada do oxigênio, com o objetivo de minimizar as possíveis reações desencadeadas previamente por ele (RUANI; VITALI; MICKE, 2018).

Para a análise de atividade antinitrosante, utilizou-se um capilar de sílica fundida, com revestimento externo de poliimida, diâmetro interno (D.I.) de 50 μ m, diâmetro externo (D.E.) de 375 μ m, comprimento total de 32,0 cm e comprimento efetivo de 23,5 cm. A separação eletroforética foi realizada utilizando um eletrólito composto por β -alanina 45 mmol L⁻¹ e ácido perclórico 15 mmol L⁻¹ (pH 3,79), preparado a partir de soluções de β -alanina e ácido perclórico a 100 mmol L⁻¹ a uma temperatura de 25°C. A tensão aplicada para a separação foi de -30 kV (RUANI; VITALI; MICKE, 2018).

O condicionamento do capilar foi feito com hidróxido de sódio 1,0 mmol L⁻¹, água deionizada e eletrólito de corrida, durante 10 minutos com cada um. Foi realizada a injeção múltipla em uma única corrida (onde cada amostra injetada irá aparecer em regiões distintas do eletroferograma) em triplicata. Entre as determinações o capilar foi condicionado durante 30 segundos com o eletrólito de corrida. As soluções foram injetadas hidrodinamicamente aplicando pressões de 50 mbar/ 5s para o *plug* das soluções amostra e branco, 50 mbar/ 26s para os *plug* de eletrólito e 50 mbar/ 5s para os *plugs* do controle negativo. A detecção de nitrito foi feita no comprimento de onda de 210 nm (RUANI; VITALI; MICKE, 2018).

A reação dentro dos *vials* amostra, se dá pela capacidade da captura de nitrito pelo extrato, ou seja, a capacidade antinitrosante (CA), que foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$CA\% = \left(1 - \frac{P_a}{P_c}\right) \times 100$$

Equação 4

onde P_A é a área corrigida do pico de nitrito no teste com amostra e P_C é a área corrigida do pico de nitrito no controle. Os testes foram realizados em duplicata, através da leitura de três amostra e do padrão interno (RUANI; VITALI; MICKE, 2018).

4.3.2 Atividade Antioxidante:

Na análise de atividade antioxidante, a solução estoque de 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foi preparada pela diluição de $10,0 \text{ mg}$ de DPPH em metanol até atingir um volume final igual a $5,0 \text{ mL}$, mantida refrigerada a $0 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução de DPPH na concentração de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foi preparada diariamente pela diluição de alíquotas da solução estoque em metanol. A solução estoque de padrão de quercetina para controle positivo foi preparada em uma concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em metanol, e mantida sob refrigeração a $8 \text{ }^\circ\text{C}$. As amostras utilizadas nesta análise foram os extratos provenientes da rotoevaporação do macerado utilizando o etanol a 70% e 96% e novamente suspensos em metanol (RUANI, 2019).

As separações para a análise da atividade antioxidante, foram realizadas em uma temperatura de 25°C com capilar de sílica fundida, de revestimento externo de poliimida, D.I. de $75 \text{ }\mu\text{m}$, D.E. de $375 \text{ }\mu\text{m}$, comprimento total de $65,0 \text{ cm}$ e comprimento efetivo de $56,5 \text{ cm}$. O MeOH foi utilizado no lugar do eletrólito de corrida, e o condicionamento do capilar foi realizado apenas com o ele, durante 25 minutos. Neste método não se aplicou nenhuma tensão, utilizou-se o método de TDLFP para as reações das amostras de extrato de carqueja com o DPPH (RUANI, 2019).

Para o controle negativo, foi injetado um *plug* de MeOH, um *plug* de DPPH e outro de MeOH, mais o volume total destes três *plugs* com metanol como espaçador. Para as amostras a sequência de injeção foi da seguinte maneira para cada uma, um *plug* de extrato, um *plug* de DPPH e outro *plug* de extrato, e posteriormente o MeOH como espaçador. Para o controle positivo, representado pela reação com a quercetina, um *plug* de quercetina, um *plug* de DPPH e outro *plug* de quercetina,

finalizando com o MeOH como espaçador. Por último, o branco, onde foi injetado um *plug* de amostra, um *plug* de metanol e outro *plug* de amostra (RUANI, 2019).

O mesmo preparo foi realizado mais uma vez, porém com as amostras incubadas durante 30 minutos a 25°C, para observar se há diferença no tempo de reação com o DPPH. Na Figura 10 abaixo está ilustrado os passos de injeção dos *plugs* descritos anteriormente.

Figura 10: *Plugs* para atividade antioxidante.

	MeOH	DPPH	MeOH		CONTROLE NEGATIVO
	70%	DPPH	70%		AMOSTRAS
	96%	DPPH	96%		
	Querc.	DPPH	Querc.		CONTROLE POSITIVO
	70%	MeOH	70%		BRANCOS
	96%	MeOH	96%		
	Querc.	MeOH	Querc.		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os *plugs* foram injetados a 50 mbar/ 3s e o *plug* de MeOH utilizado como espaçador foi injetado a 50 mbar/50s. Nesta análise, será avaliada a reação da amostra com o DPPH e a leitura no detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*) será da quantidade restante de DPPH após reagir com as amostras de extrato de carqueja em solução etanólica a 70% e 96% no comprimento de onda de 517 nm. Para calcular a porcentagem de redução, utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \left(\frac{\text{área controle negativo} - \text{área da amostra}}{\text{área controle negativo}} \right) \times 100$$

Equação 5

onde a área do controle negativo é a área do DPPH sem redução e a área da amostra é a área do pico de DPPH reduzido pelo extrato subtraída da área do controle negativo (RUANI, 2019).

4.3.3 Inibição Enzimática:

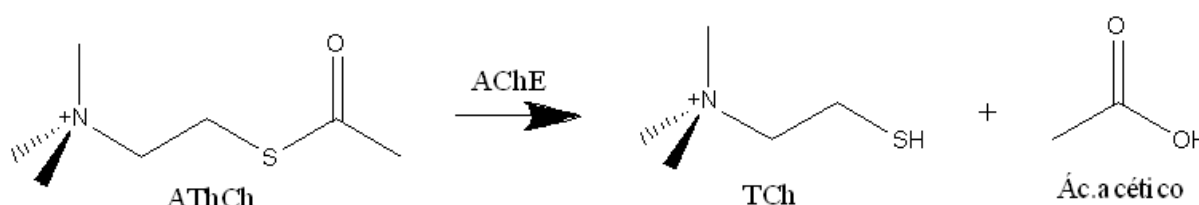
Na reação com a AChE utilizou-se como substrato a acetiltiocolina (AThCh) 5 mmol L⁻¹, sulfato de magnésio anidro 200 mmol L⁻¹ como cofator da enzima, neostigmina 100 mg L⁻¹ como inibidor padrão para o controle positivo, o propranolol 250 mg L⁻¹ como padrão interno e borato fosfato 30 mmol L⁻¹ pH 8,0 como tampão (SIEBERT et al., 2019).

O capilar de sílica fundida utilizado possui revestimento externo de poliimida, D.I. de 50 µm, D.E. de 375 µm, comprimento total de 48,5 cm e comprimento efetivo de 23,5 cm. A temperatura foi ajustada em 37°C e a tensão utilizada para a separação foi de 30 kV. O eletrólito de corrida utilizado foi o borato fosfato a 30 mmol L⁻¹. O condicionamento do capilar foi feito com hidróxido de sódio 1,0 mmol L⁻¹, água deionizada e eletrólito de corrida, durante 10 minutos com cada um (SIEBERT et al., 2019).

Foram preparados os *vials* de controle negativo, contendo 50µL de AThCh, sulfato de magnésio e propranolol, e 350µL de tampão; controle positivo, adicionando 50µL de neostigmina (inibidor). As soluções de amostra foram preparadas da mesma forma que o controle positivo, porem tendo a neostigmina substituída por 50µL do extrato da maceração com etanol 70% em um *vial* e o extrato da maceração com etanol a 96% em outro (SIEBERT et al., 2019).

O resultado da reação da AThCh com a AChE será a tiocolina (TCh) e o ácido acético, como representado na Figura 11 e a partir da quantidade de TCh gerada, será feito o cálculo da inibição da AChE.

Figura 11: Reação da AThCH com a AChE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

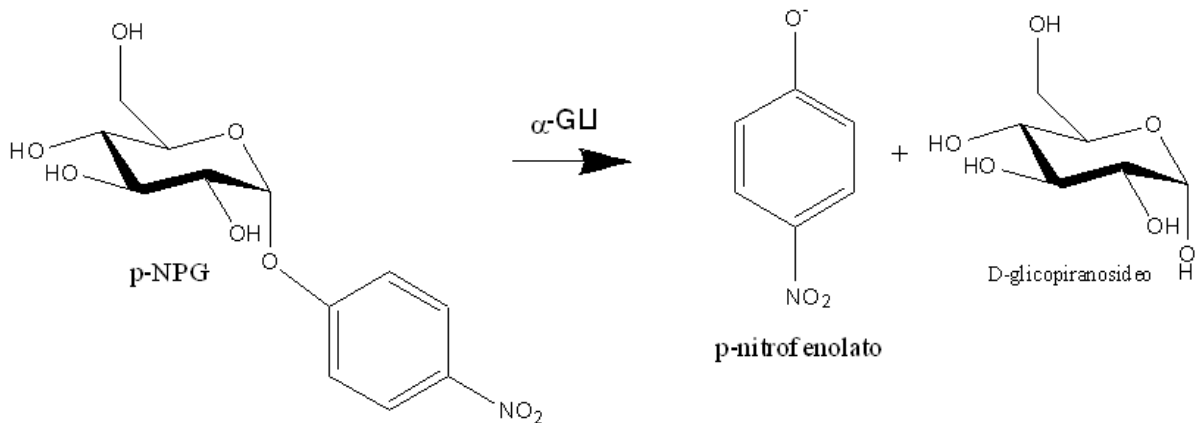
A reação com a α -GLI, utilizou-se p-nitrofenil- α -D- glucopiranosídeo (p-NPG) 10 mmol L⁻¹ como substrato, acarbose 1000 mg L⁻¹ como inibidor padrão, o butilparabeno 250 mg L⁻¹ como padrão interno e o fosfato 40 mmol L⁻¹, pH 6,8 como

tampão. O eletrólito de corrida utilizado foi o borato fosfato 30 mmol L⁻¹, pH 8,0 (SIEBERT et al., 2019).

O controle negativo foi preparado com 50µL de p-NPG e butilparabeno, e 400µL de tampão. O controle positivo foi preparado com a mesma quantidade de p-NPG e butilparabeno, porém acrescentando 150µL de arcabose e apenas 250µL de tampão. Nas soluções das amostras, assim como na inibição da AChE, a arcabose é substituída por 150µL dos extratos (SIEBERT et al., 2019).

Nesta reação, teremos como produto o p-nitrofenolato e D-glicopiranosídeo, como mostra a Figura 12.

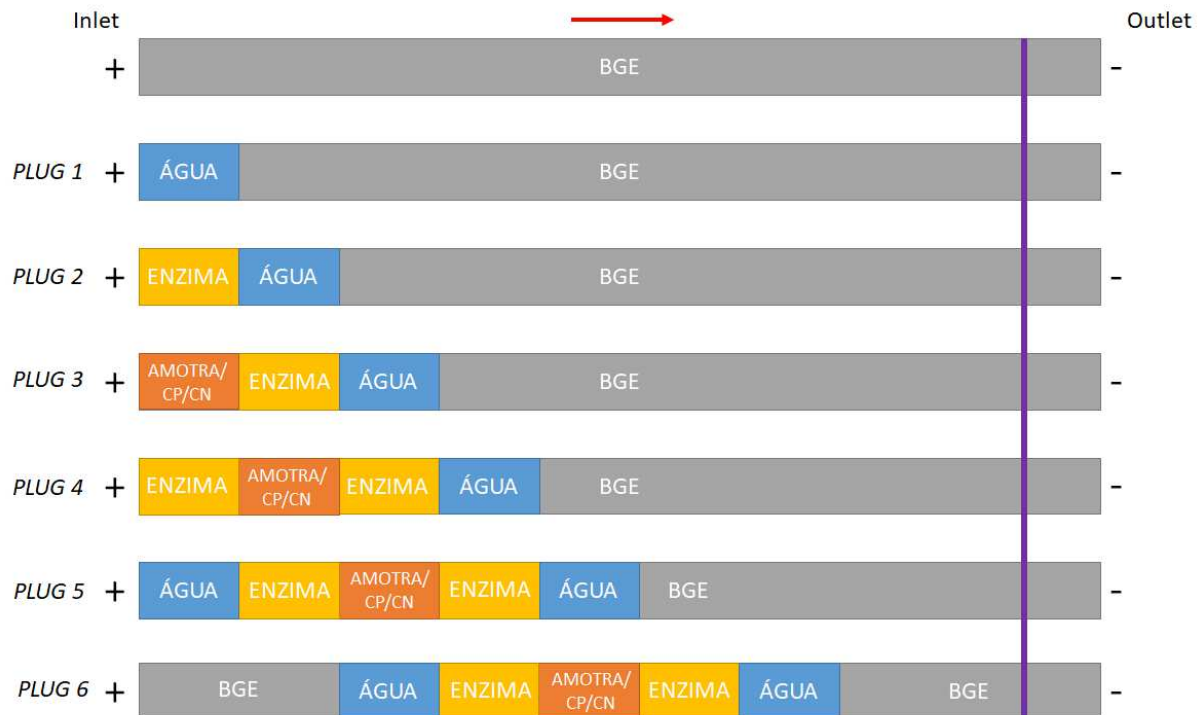
Figura 12: Reação da p-NPG com a α -GLI.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O método de microanálise medida por eletroforese capilar foi utilizado para a análise de inibição das duas enzimas e teve como o modo de injeção *plug-plug*, *in capilar* no modelo “sanduiche”, utilizando o borato fosfato 30 mmol L⁻¹ como tampão e eletrólito de corrida. Os componentes para a reação foram injetados separadamente por meio de *plugs* e de maneira hidrodinâmica. A mesma forma de injeção foi aplicada na análise das duas enzimas, de forma individual para os controles negativos, positivos e amostra, como mostra a Figura13.

Figura 13: Descrição dos *plugs* para reações enzimáticas na avaliação da atividade inibitória enzimática dos extratos de *B. crispa*. CN corresponde ao controle negativo e CP corresponde ao controle positivo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Primeiro um *plug* de água a 20 mbar/ 5s foi injetado, para que o eletrólito de corrida não interfira na reação da enzima com o substrato, depois um *plug* de enzima (AChE ou α -GLI 10 U/mL) a 50 mbar/ 5s. O próximo *plug* é referente ao controle negativo, controle positivo, amostra com extrato de maceração etanólica a 70% ou amostra com extrato de maceração etanólica a 96%, a 50 mbar/ 5s. os seguintes *plugs* são novamente de enzima 50 mbar/ 5s para garantir a reação, de água 20 mbar/ 5s e um *plug* de eletrólito de corrida a 50 mbar/ 10s. Todas as análises foram feitas em triplicata (SIEBERT et al., 2019).

Após a injeção, os *plugs* são misturados por difusão e aguardam-se dois minutos para que a reação ocorra, antes de aplicar a tensão de 30 kV para a separação dos analitos. A detecção foi feita pelo comprimento de onda de absorção máxima, sendo que para a tiocolina e o propranolol ocorre no comprimento de onda de 230 nm, para o butilparabeno no comprimento de onda máximo de 298 nm e para o p-nitrofenolato no comprimento de onda máximo de 406 nm (SIEBERT et al., 2019). Para o cálculo da porcentagem de inibição enzimática, foi utilizado a seguinte equação, a partir da área dos picos do eletroferograma:

$$\% \text{ inibição} = \left[\left(\frac{\frac{\text{área do produto}}{\text{área do PI}}}{\frac{\text{área do produto do CN}}{\text{área do PI do CN}}} \right) \times 100 \right]$$

Equação 6

sendo PI o padrão interno e CN controle negativo.

5 RESULTADOS E DISCUÇÃO

Duas soluções estoques de 10 mL de extrato de *B. crispa* foram preparados a partir dos resíduos, obtido da rotoevaporação, pela diluição em MeOH de grau HPLC, na concentração de 1 mg L⁻¹. Na maceração com etanol a 70% foi obtido 0,67 g de resíduo, e com etanol a 96%, 0,39 g.

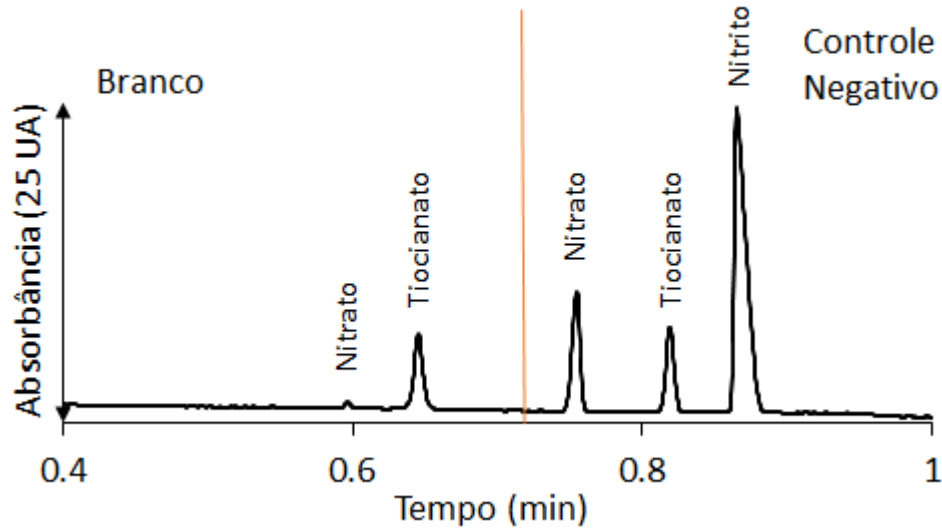
A maceração hidroetanólica foi escolhida por ser próxima do que se faz em uso popular e industrial, além da facilidade em se obter os resíduos provenientes da secagem do extrato, com menores perdas de substâncias.

A infusão para a atividade antinitrosante foi escolhida como alternativa para substituição do uso do metanol, por este método ser uma das formas mais populares de uso da espécie vegetal. Foi necessária esta mudança, porque uma análise feita utilizando o extrato diluído em metanol resultou em interferência deste solvente nos resultados, ou seja, interferência na captura de nitrito à medida em que aumentava a concentração de metanol.

5.1 ATIVIDADE ANTINITROSANTE:

A aplicação do método para a análise da atividade antinitrosante para a infusão da *B. crispa*, mostrou como resultado, a capacidade de captura de nitrito pela infusão. O eletroferograma apresentado abaixo (Figura 14), é a representação do branco e do controle negativo, indicando a presença dos picos de nitrato, tiocianato e do nitrito, confirmando a funcionalidade do método

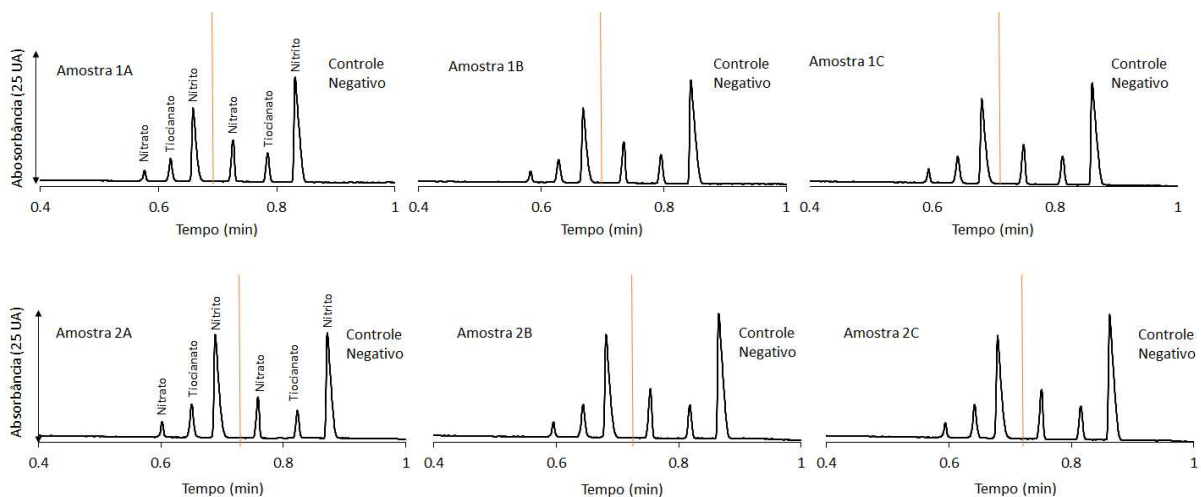
Figura 14: Eletroferogramas que representam o branco e controle negativo da análise de atividade antinitrosante.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 15 apresenta os eletroferogramas resultantes das três injeções múltiplas da infusão de *B. crispa* em duplicata.

Figura 15: Eletroferogramas das amostras para análise da atividade antinitrosante.



Fonte: Elaborado pelo autor

Foram feitas três injeções múltiplas da infusão (a, b, c) cada uma em duplicata (1 e 2). O primeiro pico que aparece é referente ao nitrato. Sua presença é devido a presença de oxigênio, que não foi possível ser retirado totalmente com a utilização do

gás nitrogênio, ele é proveniente da oxidação no nitrito. Os picos seguintes são referentes ao tiocianato de sódio (padrão interno) e o nitrito. O nitrito presente na amostra é o que sobrou após a reação com a infusão, ele representa a parte que não foi possível de ser capturada. No controle negativo, não houve reação de captura pela infusão, portanto o pico é maior comparado com o pico de nitrito das amostras. A Tabela 1, a baixo mostra a área de cada pico de nitrito, dos eletroferogramas da Figura 15, na amostra e no seu respectivo controle positivo.

Tabela 1: Áreas corrigidas dos picos de nitrito das amostras e seus respectivos brancos.

Amostra	Nitrito (amostra)	Nitrito (CN)
1A	6,096	9,944
1B	5,942	10,068
1C	7,383	9,986
2A	7,394	7,326
2B	7,397	9,443
2C	7,401	9,456

Inicialmente foi feito o cálculo da área do pico corrigida, dividindo a área do pico de nitrito pela área do pico do tiocianato. Estas correções foram feitas para as amostras e para os controles negativos, e com os valores corrigidos das áreas foi aplicado a fórmula para o cálculo da porcentagem de captura de nitrito pela infusão de *B. crispa*.

Os resultados gerados nos testes foram calculados e tabulados para a avaliação mais exata da atividade antinitrosante (Tabela 2). Foi calculado primeiro a média de cada duplicata e com os resultados calculou-se a média das três injeções e seu desvio padrão.

Tabela 2: Atividade antinitrosante de infusão de *Baccharis crispa*.

Atividade antinitrosante		
Capacidade de captura de nitrito (%) nas três injeções (A, B, C)	Amostra 1	Amostra 2
% captura nitrito (A)	23,76	26,10
% captura nitrito (B)	30,52	27,27
% captura nitrito (C)	27,74	27,75
Média (%)	27,19	
Desvio Padrão	2,22	

Tendo o método de injeção múltipla em uma única corrida, foi possível reduzir o tempo de análise tendo em um único eletroferograma os picos das amostras e brancos, junto com os picos do controle positivo.

Um estudo em que foi realizando a infusão como método de extração, utilizando as partes aéreas da *B. crispa*, foram identificados principalmente ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados e derivados da apigenina (NASCIMENTO et al., 2017). A presença destes compostos justifica o potencial da infusão de desenvolver a atividade antinitrosante, observada neste estudo.

Tradicionalmente, os métodos adotados para a identificação de nitrito e nitrato em alimentos utilizam a espectrofotometria (ZENEON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Sohrabinezhad et al. (2019) utilizou medidas espectrofotométricas para avaliar o efeito de inibição de estresse oxidativo/nitrosativo, utilizando extrato de *Allium jesdianum*. A principal desvantagem deste método está justamente no tempo de análise e maior uso de reagentes, se comparado a CE (PAVIA et al., 2010).

Ruani; Vitali; Micke (2018), em seu estudo para o desenvolvimento deste método, comprovaram que a análise de atividade antinitrosante por CE utilizando a injeção múltipla oferece bons parâmetros de linearidade, precisão, conformidade, limite de detecção e de quantificação e diminuição do tempo total de análise. Em seu trabalho puderam fornecer dados para determinação de atividade antinitrosante de chá verde, chá preto, chá branco, chá de morango, chá detox, chá de camomila, chá de erva doce, chá de hortelã e chá de boldo obtidos comercialmente, em uma única corrida, utilizando o modo de múltipla injeção.

A utilização da CE para analisar a captura de nitrito oferecem vantagens com relação a espectrofotometria, método tradicionalmente utilizado para este tipo de análise. Além da redução do tempo de experimento, é possível reduzir a quantidade de reagentes utilizados, geração de menor quantidade de resíduos e a automação, tornando mais precisa as análises.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:

Para a atividade antioxidante, foram feitas análises com e sem a incubação das amostras, com o intuito de observar se haveria diferença de tempo para a reação de captura do DPPH pelos extratos. Utilizou-se o resíduo resultante da rotoevaporação

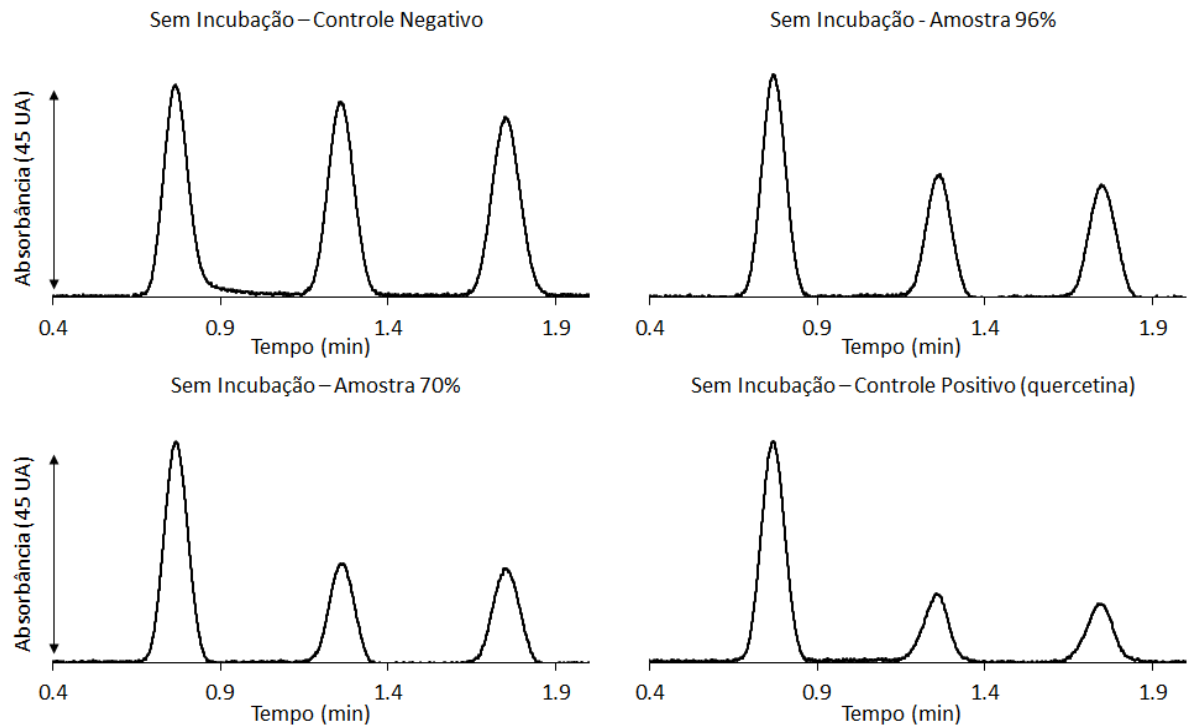
da maceração feita com etanol a 70% e a 96%, ressuspenso com metanol de grau HPLC na concentração de 1 mg L⁻¹.

As análises foram realizadas por múltiplas injeções em uma única corrida, com a finalidade de reduzir o tempo de análise. Foram injetados *plugs* com as amostras, DPPH e MeOH, no formato “sanduiche”, com o espaçador entre cada um, utilizando a pressão para a difusão transversal desses *plugs*. Inicialmente foi feita a injeção do controle negativo, contendo apenas o DPPH e sua duplicata em sequência, representando a quantidade total de DPPH sem a sua redução. Em seguida temos as amostras das extrações realizadas com etanol a 70%, etanol a 96% e do controle positivo com a quercetina, utilizada como padrão.

Nas Figuras 16 e 17, temos os microfiagramas das análises sem e com incubação, respectivamente juntamente com as Tabelas 3 e 4, contendo a porcentagem de redução do DPPH de cada amostra. Por ser uma micro análise de injeção por fluxo, com ausência de voltagem, foi criado o nome de “microfiagrama” ao invés de eletroferograma, o “fia” da palavra, vem do inglês de *Flow Injection Analysis*.

O primeiro microfiagrama representa o controle negativo, nele podemos ver os picos referentes ao DPPH 100%, ou seja, onde não ocorreu nenhuma redução. Os microfiagramas seguintes possuem o pico do DPPH 100% e seguidamente os picos do DPPH reduzidos pelas amostras e pela quercetina (CP), em duplicata. Antes da aplicação do método, foi realizada a análise do branco para confirmação da ausência da interferência dos extratos e da quercetina no comprimento de onda utilizado.

Figura 16: Microfigramas da redução do DPPH das amostras e quercetina, sem incubação.

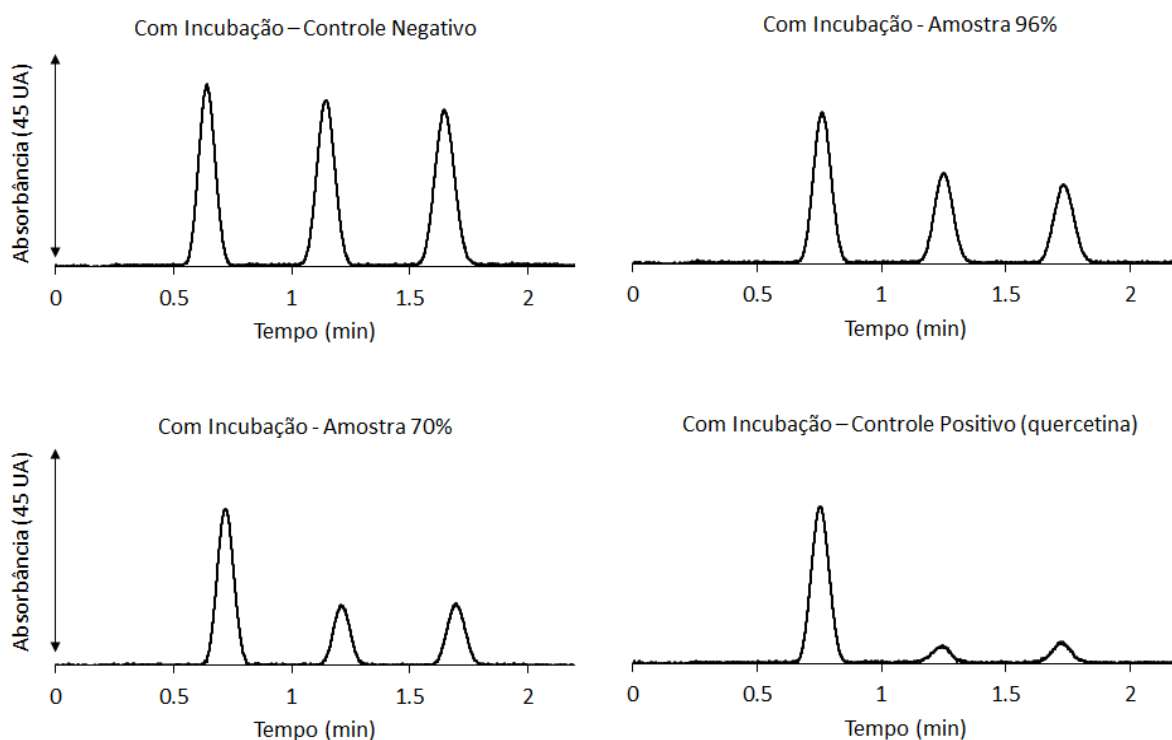


Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3: Atividade antioxidante de extratos de *Baccharis crispera*, sem incubação.

Injeção	Sem incubação					
	A 70%	A 70%'	A 96%	A 96%'	Querc.	Querc.'
Área DPPH inicial	209,11	209,11	214,13	214,13	208,83	208,83
Área DPPH final	102,31	105,55	123,95	123,49	71,99	64,25
% redução	51,07	49,52	42,11	42,33	65,53	69,23
Media	50,30		42,22		67,38	
Desvio Padrão	1,09		0,15		2,62	

Figura 17: Microfigramas da redução do DPPH das amostras e quercetina, com incubação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4: Atividade antioxidante de extratos de *Baccharis crispa*, com incubação.

Injeção	Com incubação					
	A 70%	A 70%'	A 96%	A 96%'	Querc.	Querc.'
Área DPPH inicial	177,06	177,06	173,16	173,16	179,53	179,53
Área DPPH final	70,32	76,98	108,17	103,14	22,95	29,57
% redução	60,28	56,53	37,53	40,44	87,22	83,53
Media	58,40		38,98		85,37	
Desvio Padrão	2,66		2,05		2,61	

Os resultados mostraram que o extrato feito com etanol a 70% apresentou atividade antioxidante maior que o extrato preparado com etanol a 96%.

Para uma melhor compreensão do potencial de atividade antioxidante dos extratos de *B. crispa* 70% e 96% com e sem incubação, foram feitas as curvas da redução do DPPH pelas concentrações de quercetina a 80%, 60%, 50%, 40% e 20% também com e sem incubação. Deste modo podemos saber o quanto de quercetina é equivalente aos extratos, pelo valor de redução que eles apresentaram, em miligrama de quercetina por grama de extrato.

O padrão de quercetina usado no experimento possuía concentração de 0,1875 mmolL⁻¹ conforme utilizado por Ruani (2019), sendo considerado a concentração 100% da quercetina. Utilizou-se este padrão para fazer as diluições da mesma para a construção das curvas. Como resultado, as concentrações a 80%, 60%, 50%, 40% e 20% foram de 0,15 mmolL⁻¹; 0,112 mmolL⁻¹; 0,093 mmolL⁻¹; 0,075 mmolL⁻¹ e 0,037 mmolL⁻¹ respectivamente. Após encontrar estes valores, foi feita a conversão para mgL⁻¹. A seguir nas tabelas a baixo, estão os valores das concentrações da quercetina com e sem incubação e os valores de redução do DPPH desempenhado por elas, juntamente com suas respectivas curvas e os testes de normalidade para as amostras e resíduos.

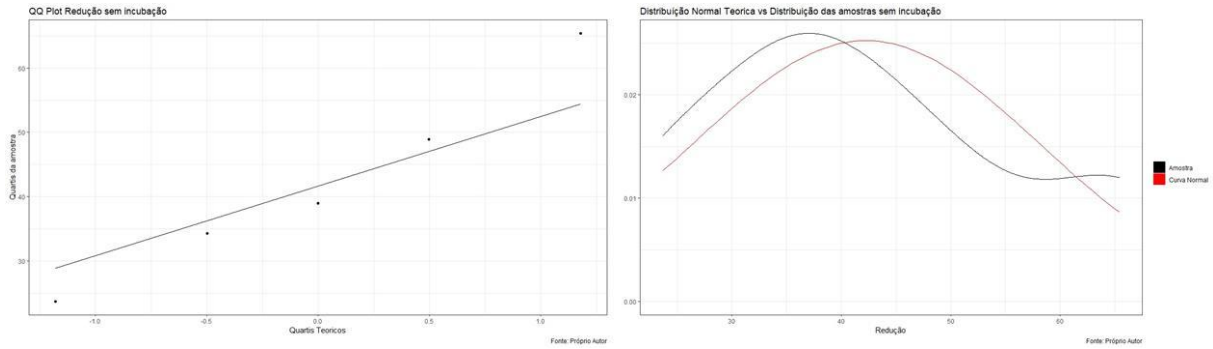
Tabela 5: Concentração das diluições da quercetina expressos em mgL⁻¹ e a porcentagem referente à redução do DPPH. Sem a incubação da quercetina.

SEM INCUBAÇÃO	
Concentração (mgL ⁻¹)	% Redução
45,33	65,4
34	48,9
28,3	39,0
22,66	34,3
11,33	23,7

Tabela 6: Concentração das diluições da quercetina expressos em mgL⁻¹ e a porcentagem referente à redução do DPPH. Com a incubação da quercetina.

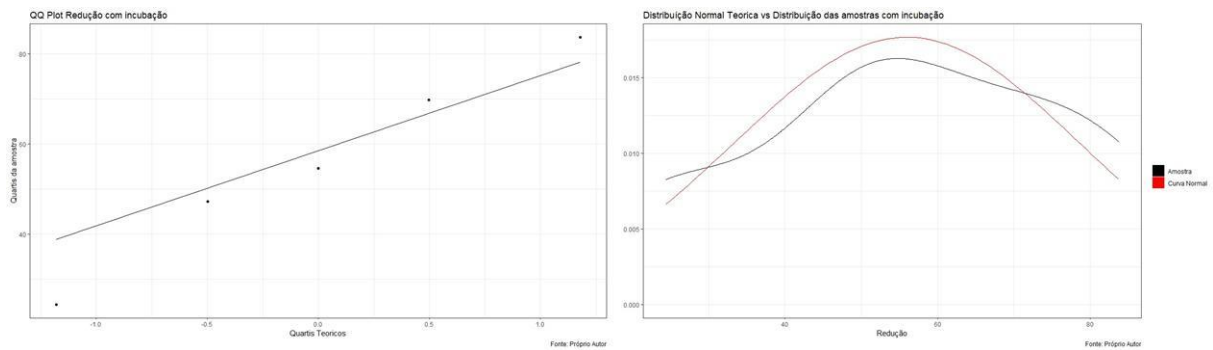
COM INCUBAÇÃO	
Concentração (mgL ⁻¹)	% Redução
45,33	83,7
34	69,8
28,3	54,6
22,66	47,3
11,33	24,4

Figura 18: Curva de distribuição normal teórica e de distribuição das amostras e o QQ Plot da redução das amostras sem incubação do teste de normalidade.



Fonte: Elaborado pelo autor

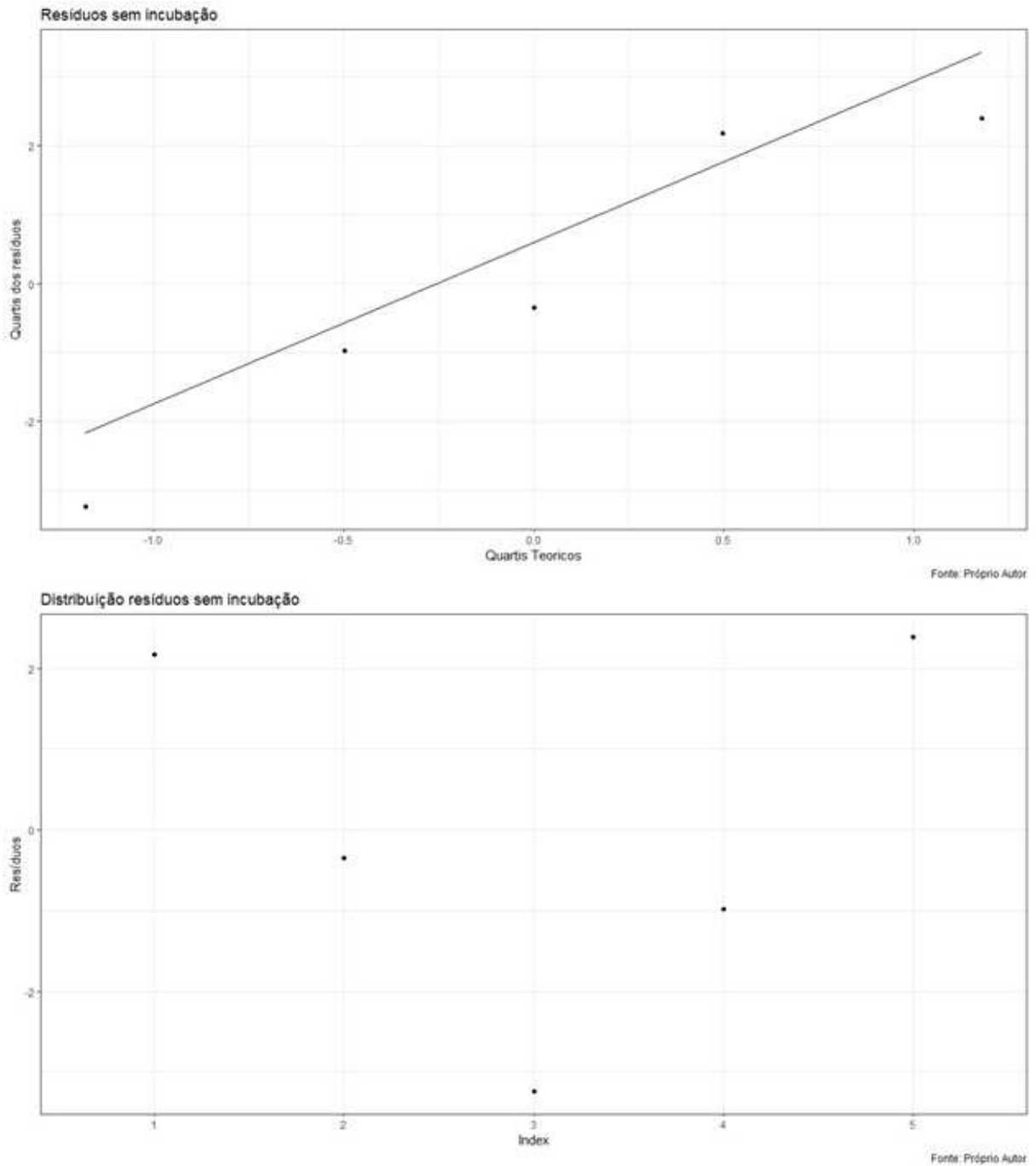
Figura 19: Curva de distribuição normal teórica e de distribuição das amostras e o QQ Plot da redução das amostras com incubação do teste de normalidade.



Fonte: Elaborado pelo autor

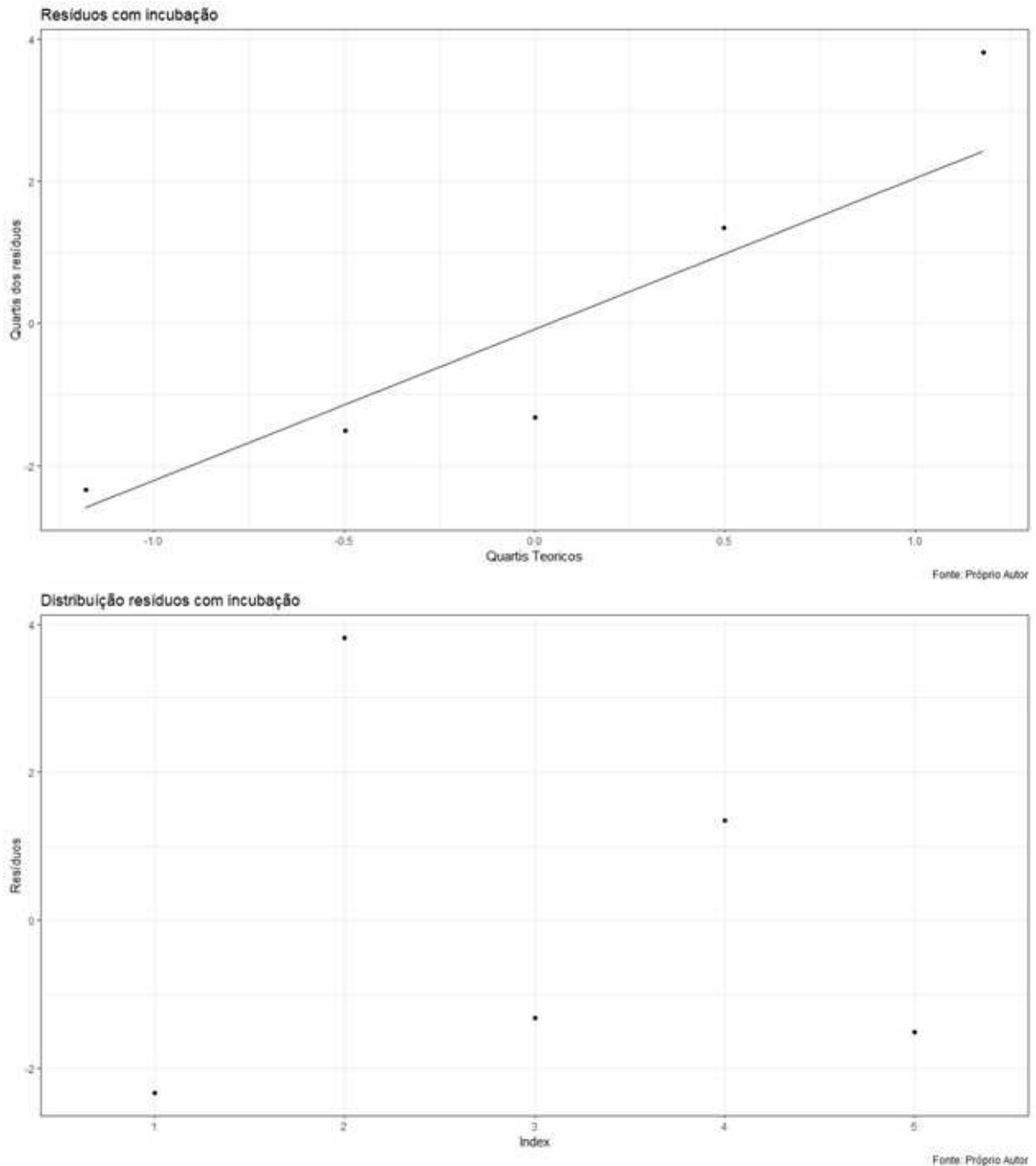
O p-valor do teste de normalidade da amostra foi calculado utilizando o teste de Shapiro Wilk e o seu valor encontrado foi de 0,922 para a amostras sem incubação e de 0,975 para as amostras com incubação. Sendo o p-valor $> 0,05$ significa a presença de normalidade para o método em ambos os casos.

Figura 20: QQ Plot dos resíduos sem incubação do teste de normalidade e a distribuição dos resíduos.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 21: QQ Plot dos resíduos com incubação do teste de normalidade e a distribuição dos resíduos.



Fonte: Elaborado pelo autor

O teste de Shapiro Wilk também foi aplicado para os resíduos, ou seja, se há ou não homocedasticidade. O resultado para este teste foi de 0,537 para as amostras sem incubação e de 0,322 para as amostras com incubação. Sendo o p-valor $> 0,05$ em ambos os casos significa a presença de normalidade, indicando que os resíduos são homocedásticos. Os dois gráficos a baixo mostram as equações da curva para os

dois casos, juntamente com o coeficiente de determinação. A partir destas equações foram feitos os cálculos da equivalência em termos de quercetina das amostras.

Gráfico 1: Curva da redução do DPPH sobre a concentração da quercetina sem incubação, para a obtenção da equação da reta.

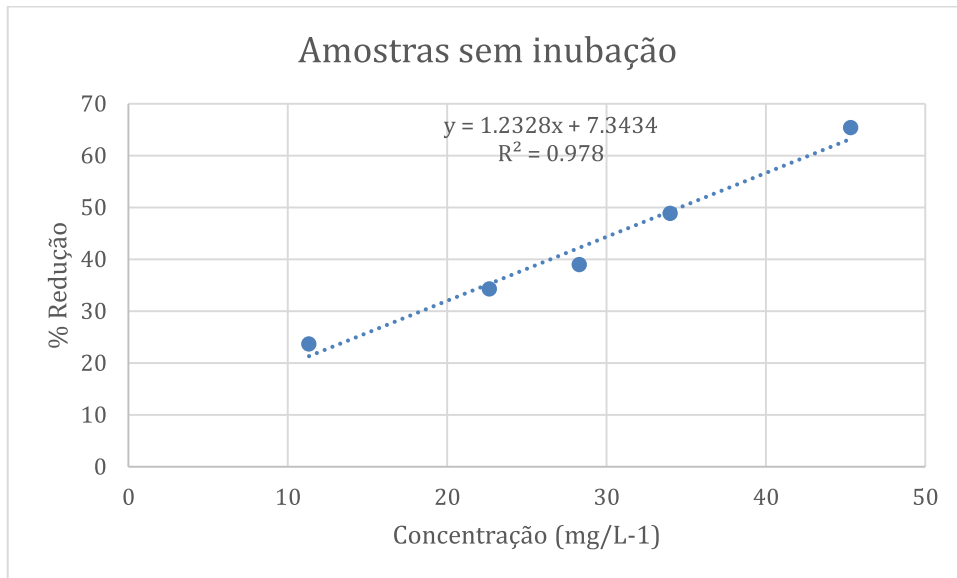
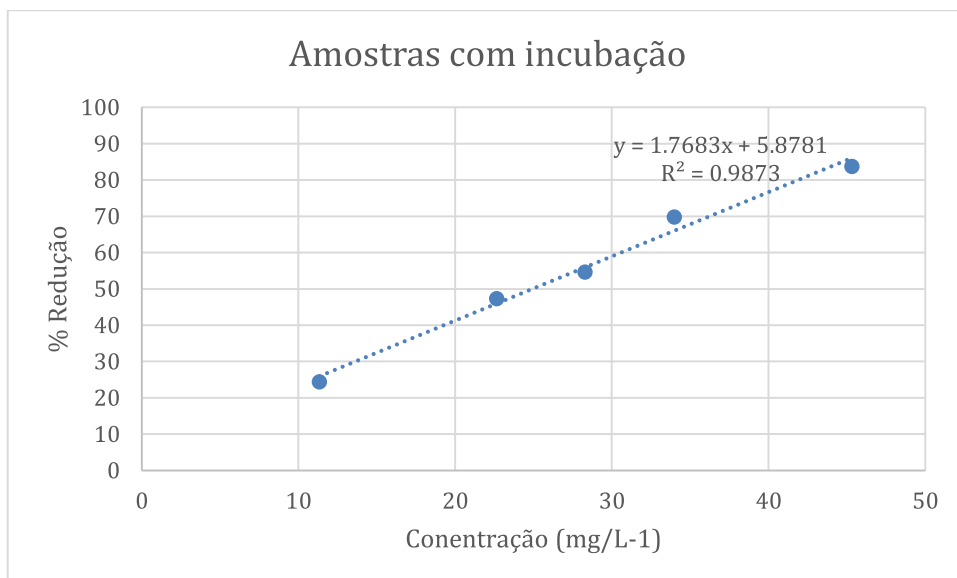


Gráfico 2: Curva da redução do DPPH sobre a concentração da quercetina com incubação, para a obtenção da equação da reta.



A partir das equações da curva, podemos calcular o quanto de quercetina em mg é equivalente por grama dos extratos utilizados, substituindo o valor de Y pela porcentagem de redução dos extratos de *B. crispa*. Os extratos 70% e 96% que não foram incubados apresentaram valores de 34,84 mg e 28,29 mg de quercetina por

grama de extrato respectivamente, e os extratos com incubação apresentaram valores de 29,70 mg e 18,71 mg de quercetina por grama de extrato respectivamente.

Estudos de identificação dos compostos presentes em extratos das partes aéreas de *Baccharis crispa* tiveram como resultados a presença de flavonoides e compostos fenólicos. Estes compostos possuem grupos hidroxila em sua estrutura molecular, tornando-os bons agentes antioxidantes e com capacidade de capturar ERN's e ERO's, que, em excesso, podem ser prejudiciais ao organismo humano. Em macerados hidroetanólicos utilizando as partes aéreas de *Baccharis crispa*, foram identificados flavonoides como o 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-7-O-piranosil-furanosil flavona; quercetina; 3',5-dihidroxi-4',7-dimetoxi flavona; 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxi flavona; 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxi flavona; 6(8)-C-furanosil-8(6)-C-hexosil flavona e 6(8)-C-hexosil-8(6)-C-furanosil flavona (PÁDUA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016).

Foram encontrados também neste tipo de extração, ácidos clorogênicos, cuja estrutura, assim como a dos flavonoides, possui grupos hidroxila. Os compostos identificados, pertencentes a esta classe foram, ácido coumaroilquínico; ácido 5-O-feruloilquínico; ácido 3-O-isoferuloilquínico; ácido 5-O-isoferuloilquínico; ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico; ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico e ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico (ARAÚJO et al., 2016).

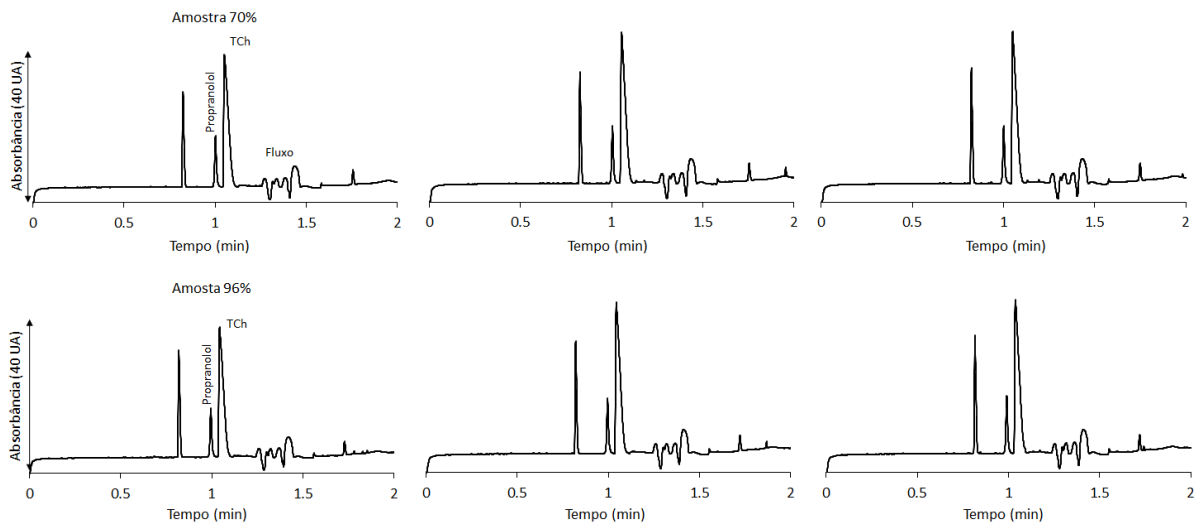
A técnica comum adotada para a determinação de atividade com DPPH, utiliza o espectrofotômetro. Apesar de ser uma técnica bastante empregada, devido ao baixo custo, comparado com a CE, esta técnica apresenta algumas limitações. Uma delas é o tempo para realizar a leitura de espectro de mais de uma amostra e limitação para a leitura de mais de um comprimento de onda (PAVIA et al., 2010). Outra desvantagem apresentada se compararmos com a CE, é que o espectrofotômetro não é uma técnica automatizada. Isto implica em manipulação e cuidados com a cubeta, por exemplo, e quanto mais etapas a serem realizadas pelo analista, maiores são as chances de erros serem cometidos, por maiores que sejam os cuidados e com isso, podem haver alterações nos resultados.

Outro fator importante de ressaltarmos também, é a utilização de grandes volumes de solventes. Rufino, et al. (2007) descreve uma metodologia científica para determinação de atividade antioxidante, e nela podemos observar, quantidades maiores de solventes utilizados, diferente da CE, que trabalha em uma escala muito menor.

5.3 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA:

A inibição das enzimas AChE e α -GLI foram realizadas juntamente com controle positivo e negativo durante a corrida, para garantir a integridade das enzimas e aplicação do método. Para cada enzima foi colocado um substrato cujo o produto da reação irá indicar se houve ou não inibição. A baixo estão os eletroferogramas (Figura 18) referentes aos resultados em triplicata da análise da inibição da AChE, utilizando o resíduo da carqueja macerada com etanol a 70% e a 96%, que foi rotoevaporada e ressuspensa com MeOH.

Figura 22: Eletroferogramas da atividade inibitória da AChE para as duas amostras.

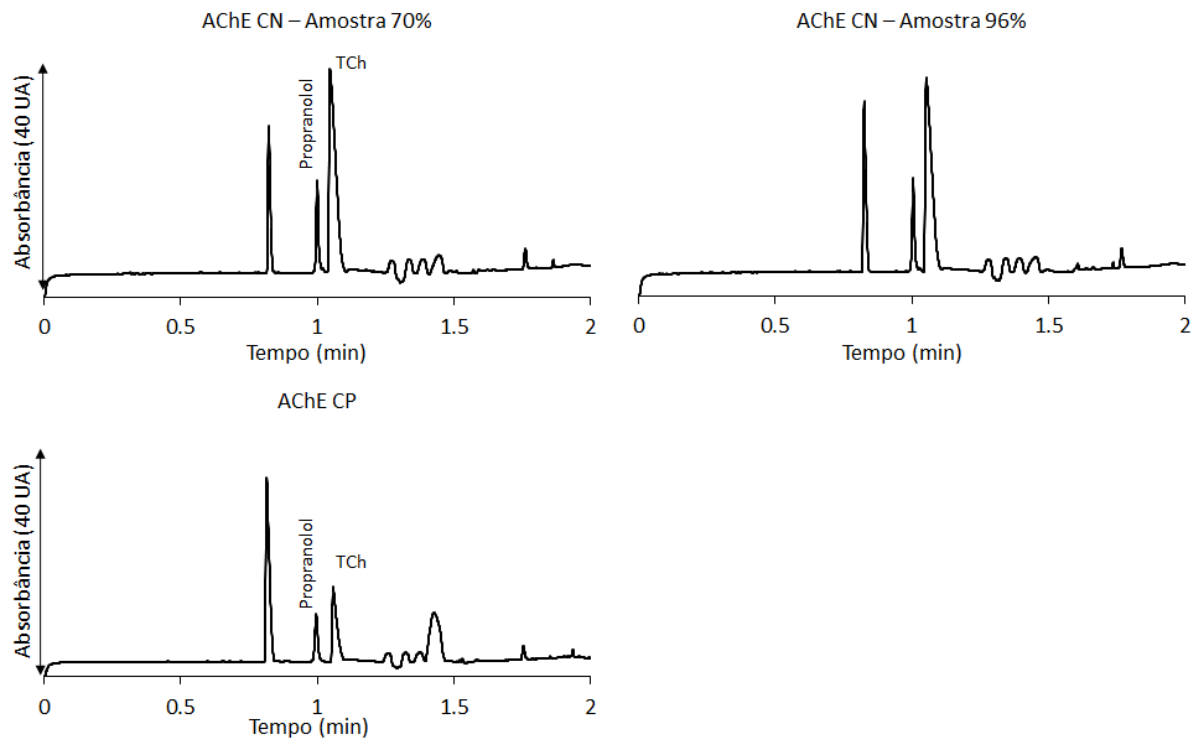


Fonte: Elaborado pelo autor

No comprimento de onda de 230 nm temos os picos do propranolol que é o padrão interno e da tiocolina (TCh), como produto da reação da AChE com as amostras. Quanto menor o pico do produto, maior é a inibição da enzima e consequentemente maior eficácia da amostra.

Os próximos eletroferogramas (Figura 19) são referentes aos controles negativos e o controle positivo. No controle positivo foi utilizado a neostigmina como inibidora da AChE, que reduziu o pico da TCh demonstrando a inibição e no negativo observamos a ausência da inibição da enzima com o pico do produto bastante acentuado.

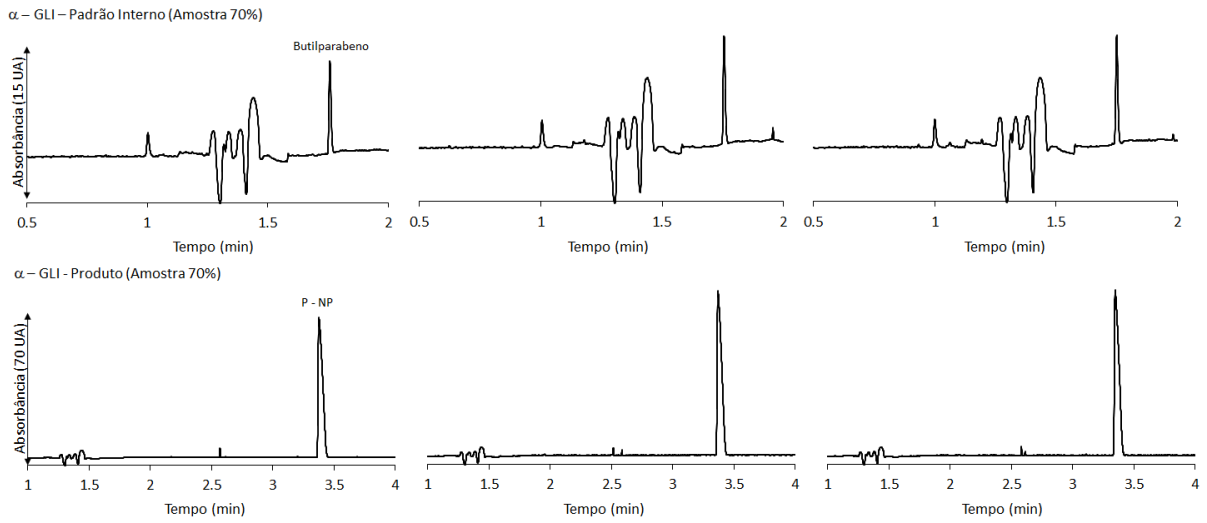
Figura 23: Controles negativos e positivo para atividade inibitória da AChE.



Fonte: Elaborado pelo autor

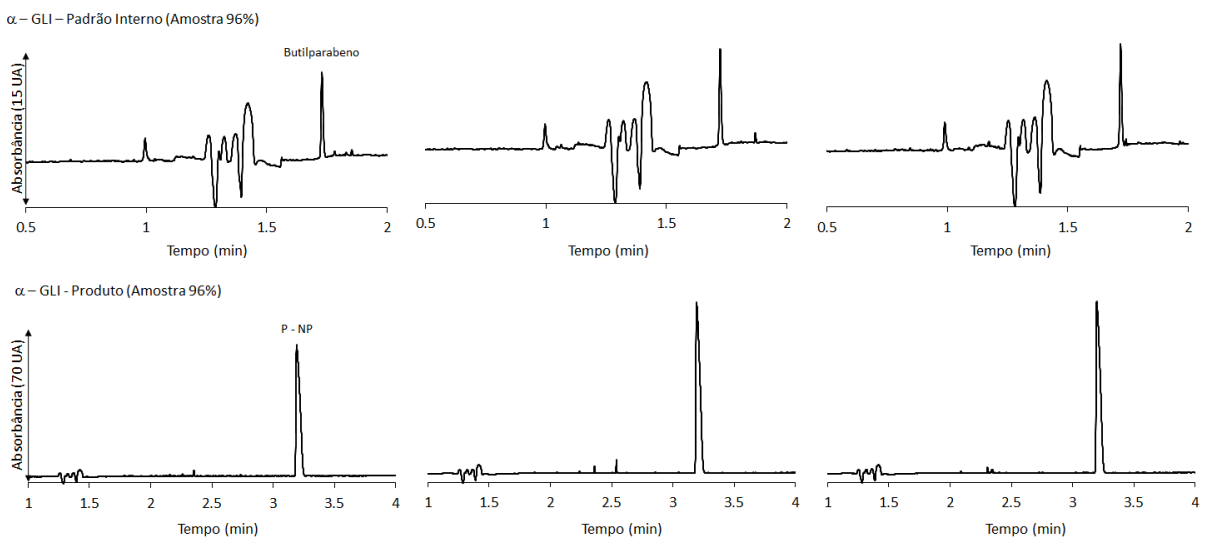
Para a análise da inibição da α -GLI, foi preciso utilizar dois comprimentos de onda diferentes para a visualização do padrão interno e do produto. O butilparabeno (produto interno) tem detecção no comprimento de 298 nm e o P-NP (produto) em 406 nm. Nas Figuras 20 e 21, abaixo, estão apresentados os eletroferogramas das triplicatas das rações da enzima com as amostras e do padrão interno de cada corrida.

Figura 24: Eletroferogramas da atividade inibitória da α -GLI da amostra da extração hidroetanolica a 70%.



Fonte: Elaborado pelo autor

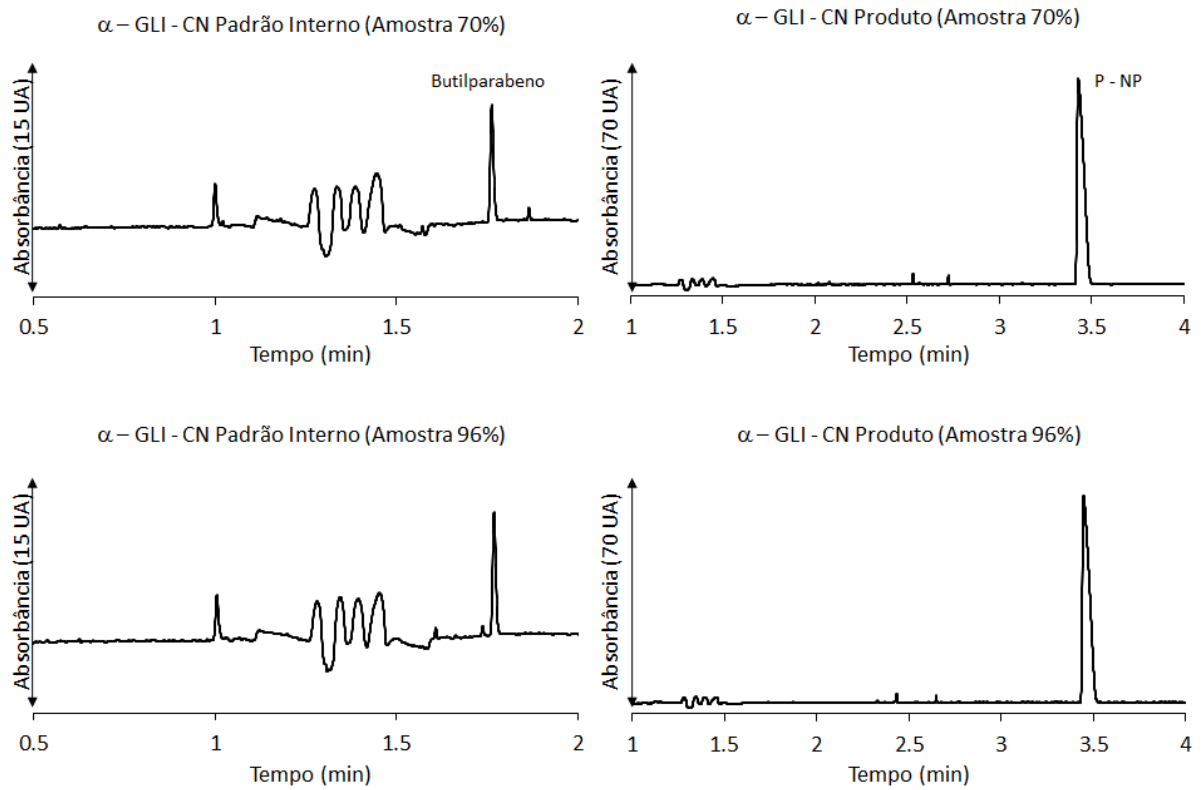
Figura 25: Eletroferogramas da atividade inibitória da α -GLI da amostra da extração hidroetanolica a 96%.



Fonte: Elaborado pelo autor

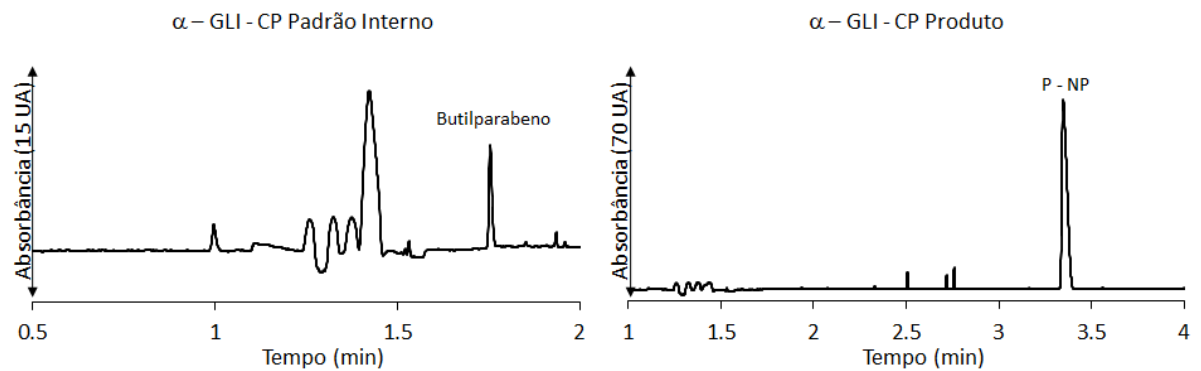
Da mesma forma que nos resultados da inibição da AChE, quanto menor for o pico do produto, maior é a capacidade de inibição da α -GLI. Na Figura 22 está apresentado os eletroferogramas dos controles negativos realizados nas corridas das duas amostras e a Figura 23, os eletroferogramas do controle positivo.

Figura 26: Eletroferogramas dos controles negativos do padrão interno e produto das duas amostras.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27: Eletroferogramas do controle positivo do padrão interno e produto.



Fonte: Elaborado pelo autor

A partir da integração da área dos picos, foi possível fazer os cálculos para a porcentagem de inibição das duas amostras de carqueja, utilizando a fórmula apresentada nesta metodologia e obtivemos os seguintes resultados (Tabela 7 e 8).

Tabela 7: Áreas de pico de triplicatas dos produtos e padrões internos dos controles positivos, controles positivos e ensaios de duas esferas enzimáticas.

	AChE		α - Gli	
	Área do produto	Área do P.I.	Área do produto	Área do P.I.
CN	68,61	7,99	161,06	3,93
	51,19	9,42	128,19	2,87
	57,32	8,88	136,21	3,16
Média	59,04	8,76	141,82	3,32
CP	21,59	7,98	101,19	3,88
	18,33	9,09	105,22	3,69
	18,80	8,64	106,65	3,81
Média	19,57	8,57	104,35	3,79
70%	55,01	8,89	173,06	4,08
	53,17	8,57	168,77	3,95
	53,13	8,51	170,87	4,04
Média	53,77	8,66	170,90	4,02
96%	53,37	8,52	161,768	3,72
	52,60	8,27	156,37	3,62
	53,20	8,58	158,34	3,69
Média	53,06	8,46	158,82	3,68

Tabela 8: Atividade de inibição das enzimas AChE e α -GLI pelos extratos de *Baccharis crispa*.

	% Inibição	
	AChE	α -GLI
Controle Positivo	66,10	35,61
Amostra 70%	7,80	0,51
Amostra 96%	6,89	-1,08

Siebert et al. (2019), comprovou em seu estudo, a eficácia do método como uma poderosa ferramenta para a triagem de amostra e também para a atividade inibitória. A obtenção dos resultados em seu estudo, também foram em um curto período de tempo, cerca de dez minutos, assim como o consumo das enzimas, substratos e amostras, na escala de nanolitros.

Não foram encontrados estudos na literatura que já tenham utilizado extratos de *B. crispa* como possível inibidor destas duas enzimas. Porém uma possível explicação para baixos resultados de atividade inibitória destas duas enzimas, possa ser a concentração da amostra utilizada. Em um estudo feito por Figueiredo-González (2018) descreve a capacidade de compostos fenólicos presentes em boa concentração em extratos de azeite de oliva extra virgem foram capazes de exercer capacidade inibitória de enzimas, dentre elas a AChE. Isto sugere que, provavelmente a concentração de 1 mg L⁻¹ das amostras dos extratos de *B. crispa* possam não ter a capacidade de inibição das duas enzimas devido à baixa concentração de compostos fenólicos nesta diluição.

6 CONCLUSÃO:

Após a realização de todos os métodos neste trabalho, podemos observar que é possível utilizar diferentes tipos de modalidades da CE como ferramenta de análise para reações e de atividade fitoquímica. É uma ferramenta bastante versátil e pode ser combinada com diferentes detectores como o ultra violeta e o espectrofotômetro de massas, por exemplo. Sua utilização oferece maiores vantagens sob métodos usuais, ofertando maiores detalhamentos quantitativos além do uso reduzido de amostras e padrões que podem ter elevados custos para a sua obtenção, além de utilizar pequenas quantidades de reagentes, o que colabora com a redução de poluentes químicos favorecendo a química verde.

Na execução das análises das diferentes atividades que os extratos da *B. crispa* poderia estar desempenhando devido aos compostos presentes, principalmente pelos polifenóis, foi possível concluir que os métodos utilizados deste estudo podem ser utilizados como ferramenta de triagem para estas atividades, o que abriria caminhos posteriormente para uma futura investigação mais detalhada e precisa de identificações de quais compostos estariam presentes e sua relação com os resultados obtidos de atividade antinitrosante, antioxidante e inibição das enzimas AChE e α -GLI.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p.1818-34, 2016.
- ARAÚJO, G. R. et al. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47phox phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. **Exp Biol Med.** (2016) <http://doi:10.1177/1535370216672749>.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3.ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2006.
- BAJDA, M.; WIĘCKOWSKA, A.; MALAWSKA, B. Electrophoretically mediated microanalysis technique as a tool for the rapid screening of novel acetylcholinesterase inhibitors. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 4, p. 357–62, 2009.
- BAKER, D. R. **Capillary Eletrophoresis** New York: John Wiley & Sons, 1995.
- BARBOSA, K. B. F, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.
- BORELLA, J. C. et al. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.557-61, 2006.
- BRIGHENTE, I. M. C. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 156-61, 2007.
- BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC, *Asteraceae*. **Braz. J. Pharm. Scienc.** v. 45, p. 75-85, 2009.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2007.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. J. FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- FAN, Y.; SCRIBA, G. K. E. Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p. 1076-90, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M. et al. Nutraceutical potential of phenolics from 'brava' and 'mansa' extra-virgin olive oils on the inhibition of enzymes associated to neurodegenerative disorders in comparison with those of 'picual' and 'cornicabra'. **Molecules**, v. 23, p. 722, 2018.

GAŠ, B. High Performance Capillary Electrophoresis - A primer. **Agilent Technologies**, 182 p., 2009.

GERVASIO, A. P. G. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65-74, 2003.

GUO, L. P. et al. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 5, p.1250-53, 2010.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** (2016)
<http://doi.org/10.1155/2016/7432797>

IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. **The Analyst**, v. 138, n. 11, p. 3104, 2013.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-73, 2001.

KARAM, et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.2, p.280-286, 2013.

KRYLOVA, S. M. et al. The Inject-Mix-React-Separate-and-Quantitate (IMReSQ) approach to studying reactions in capillaries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 987-1010, 2009.

LAAR, F. A. V. et al. Alpha-glucosidase Inhibitors for Patients With Type 2 Diabetes: Results From a Cochrane Systematic Review and Meta-Analysis. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 154-63, 2005.

LEBOVITZ, H. E. Alpha-glucosidase inhibitors. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p.539-51, 1997.

LIU, D.; SHI, Y.; CHEN, J. Application of capillary electrophoresis in enzyme inhibitors screening. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 775-82, 2015.

LIU, J. et al. The in-capillary DPPH-capillary electrophoresis-the diode array detector combined with reversed-electrode polarity stacking mode for screening and quantifying

major antioxidants in *Cuscuta chinensis* Lam. **Electrophoresis**, v. 37, n. 12, p. 1632-9, 2016.

MERINO, L.; ORNEMARK, U.; TOLDRA, F. Analysis of Nitrite and Nitrate in Foods: Overview of Chemical, Regulatory and Analytical Aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 81, p. 65-107, 2017.

MIN, W. et al. On-line immobilized acetylcholinesterase microreactor for screening of inhibitors from natural extracts by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 8, p. 2397–2405, 30 nov. 2012.

MINTEGUIAGA, M. et al. A structural and spectroscopic study on carquejol, a relevant constituent of the medicinal plant *Baccharis trimera* (Less.) DC. (*Asteraceae*). **Journal of Molecular Structure**, v. 1150, p. 8-20, 2017.

NASCIMENTO, D. M. S. et al. *Baccharis trimera* (Less.) DC exhibits an anti-adipogenic effect by inhibiting the expression of proteins involved in adipocyte differentiation. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 972-78, 2017.

OKHONIN, V.; LIU, X.; KRYLOV, S. N. Transverse diffusion of laminar flow profiles to produce capillary nanoreactors. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 18, p. 5925-9, 2005.

OKHONIN, V.; WONG, E.; KRYLOV, S. N. Mathematical model for mixing reactants in a capillary microreactor by transverse diffusion of laminar flow profiles. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 19, p. 7482-6, 2008.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

ONYANGO, A. N. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 2398573-2398573, 2016.

PÁDUA, B. C. et al. Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. **Med. Inflam.** (2014) <http://dx.doi.org/10.1155/2014/196598>. 65.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Editora Cengage learning, 2010.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

RABELO, A. C. S.; COSTA, D. C. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. **Chemico-Biological Interactions** (2018) <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.002>

RAMANA, P. et al. Recent advances in CE mediated microanalysis for enzymatic and derivatization reactions. **Electrophoresis**, v. 37, n. 1, p. 56-65, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

RUANI, A. P. **Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio: determinação de captura por polifenóis e efeitos sobre o DNA utilizando eletroforese capilar convencional, no formato microship e como ferramenta microfluídica em um inovador modo de microanálise por injeção em fluxo**. 2019. 132 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

RUANI, A. P.; VITALI, L.; MICKE, G. A. Multiple-Injection Capillary Zone Electrophoresis as a Fast Strategy to Determine Antinitrosating Capacity of Commercial Teas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2150-57, 2018.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (EMBRAPA Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 127).

SABIR, S. M. et al. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 318-323, 2017.

SCRIBA, G. K. E.; BELAL, F. Advances in capillary electrophoresis-based enzyme assays. **Chromatographia**, v. 78, n. 15-16, p. 947-70, 2015.

SIEBERT, D. A. et al. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. Natural Product Research. **Natural Product Research** (2019) <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550760>.

SOHRABINEZHAD, Z. et al. Allium Jesdianum Extract Improve AcetaminophenInduced Hepatic Failure through Inhibition of Oxidative/Nitrosative Stress. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 22, n. 4, p. 239 – 47, 2019.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-97, 2012.

TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TANG, Z. M.; WANG, Z. Y.; KANG, J. W. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural extracts by CE with electrophoretically mediated microanalysis technique. **Electrophoresis**, v. 28, n. 3, p.360-65, 2007.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2 p. 173-81, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

VAN DYCK, S. et al. Kinetic study of angiotensin converting enzyme activity by capillary electrophoresis after in-line reaction at the capillary inlet. **Journal of Chromatography**, v. 986, n. 2, p. 303–311, 2003a.

VAN DYCK, S. et al. Inhibition study of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis after enzymatic reaction at capillary inlet. **Journal of Chromatography**, v. 1013, n. 1–2, p. 149–156, 2003b.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VAZ, F. A. S.; OLIVEIRA, C. L. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos de eletroforese capilar: uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732-37, 2015.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-84, 2015.

XIE, L. et al. Association between dietary nitrate and nitrite intake and sitespecific cancer risk: evidence from observational studies. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56915-56932, 2016.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.