UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO ELETROQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Commelina erecta* L.

JHONILSON PEREIRA GONÇALVES

São Luís
2020

JHONILSON PEREIRA GONÇALVES

AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Commelina erecta* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Batista de Lima
Coorientador(a): Profª. Dra. Claudia Quintino da Rocha

São Luís
2020

JHONILSON PEREIRA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO ELETROQUÍMICO DO EXTRATO HIDROACOÓLICO DA *COMMELINA ERECTA* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 22/03/2021

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima (Orientador-UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

_____

Prof. Dr. Iranaldo Santos da Silva-(UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

_____

Prof. Dr. Antonio José Cantanhede Filho-(IFMA)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão-IFMA

À minha querida esposa por todo apoio e compreensão;
À minha família que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Toda gratidão ao Criador de todas as coisas, porque sem Ele nada é possível!

Ao meu orientador, Roberto Batista de Lima e coorientadora, Claudia Quintino da Rocha por terem sido meus guias nessa jornada, me fornecendo todo o suporte necessário para o meu desenvolvimento como pesquisador, aguçando ainda mais a minha visão científica;

Aos companheiros dos dois laboratórios dos quais tive a honra de fazer parte:

Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), em especial Aldilene da Silva Lima e Marcos Bispo Pinheiro Camara, pelos ensinamentos e companheirismo durante o período em que estivemos juntos em laboratório.

Laboratório de Eletroquímica (LELQ), onde passei metade do meu período de mestrado, e em especial, Mesaque de França e William Barros Veloso, pela singela contribuição ao meu aprendizado em eletroquímica, os quais sempre pude contar nos momentos mais difíceis;

E não menos importante, mas de fundamental relevância:

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela concessão da bolsa que possibilitou o financiamento deste trabalho.

RESUMO

As plantas daninhas ainda são pouco estudadas no que concerne às suas propriedades medicinais. Diante disso, o presente trabalho avaliou o potencial antioxidante total do extrato hidroalcoólico da *Commelina erecta* L. por meio de técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas. A caracterização química da espécie foi obtida por Espectrometria de Massas (MS/MS), cuja proposta de elucidação apresentou flavonoides *C*-glicosilados e *O*-glicosilados. A atividade antioxidante foi expressa por três métodos diferentes: Percentual do consumo de radical DPPH em função das concentrações 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg. mL^{-1}, cuja resposta foi de 54,3 % de redução para a concentração máxima do EBCE; Cálculo do IC_{50} por meio do ajuste de regressão linear, onde obteve-se IC_{50}: 0,07 ± 1,21 (mg. mL^{-1}); E cálculo do índice eletroquímico (IE) obtido por meio das técnicas eletroquímicas de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) e Voltametria Cíclica (VC). A resposta para ambas as técnicas foram IE: 10,73 ± 2,72 e 2,87 ± 0,52, respectivamente. Estes resultados foram comparados com IE da rutina: 7,24 ± 0,36 (VOQ) e 3,51 ± 0,42 (VC), o que mostrou *C. erecta* como uma boa candidata à extração de substâncias antioxidantes quando comparado ao padrão de rutina avaliado pelo mesmo método. Logo, *C. erecta* pode ser destacada como uma fonte significativa de flavonoides e outros polifenóis de grande relevância na área químico/farmacológica.

Palavras-chave: Antioxidante. Flavonoides. DPPH. Voltametria Cíclica. Voltametria de Onda Quadrada.

ABSTRACT

Weeds are still poorly studied with regard to their medicinal properties. In view of this, the present work evaluated the total antioxidant potential of the hydroalcoholic extract of Commelina erecta L. using spectrophotometric and electrochemical techniques. The chemical characterization of the species was obtained by Mass Spectrometry (MS / MS), whose proposal of elucidation showed *C*-glycosylated and *O*-glycosylated flavonoids. The antioxidant activity was expressed by three different methods: Percentage of consumption of DPPH radical as a function of 0.0625 concentrations; 0.125; 0.25; 0.5 and 1.0 mg/mL, whose response was 54.3% reduction for the maximum EBCE concentration; Calculation of the IC50 by means of linear regression adjustment, where the IC50 was obtained: 0.07 ± 1.21 (mg/mL); And calculation of the electrochemical index (IE) obtained through the electrochemical techniques of Square Wave Voltammetry (SWV) and Cyclic Voltammetry (CV). The answer for both techniques was IE: 10.73 ± 2.72 and 2.87 ± 0.52, respectively. These results were compared with the routine IE: 7.24 ± 0.36 (SWV) and 3.51 ± 0.42 (CV), which showed *C. erecta* as a good candidate for the extraction of antioxidant substances when compared to the standard routine validated by the same method. Therefore, *C. erecta* can be highlighted as a significant source of flavonoids and other polyphenols of great relevance in the chemical / pharmacological area.

Keywords: Antioxidant. Flavonoids. DPPH. Cyclic voltammetry. Square Wave Voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *C*ommelina erecta L. 13
Figura 2 - Redução do radical DPPH por uma espécie antioxidante (H-AA) através da etapa lenta de doação de H·. 20
Figura 3 - Reação de estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ com um antioxidante (no sentido direto) e sua formação (no sentido reverso) 22
Figura 4 - Representação esquemática de um voltamograma cíclico onde: $E_{1/2}$, I_{pa} e E_{pa} representam: Potencial de meia onda, Corrente de pico anódico e Potencial de Pico anódico respectivamente..... 23
Figura 5 - Voltamogramas para um processo redox reversível (1) e um irreversível (2) na técnica de Voltametria de Onda Quadrada 24
Figura 6 - Obtenção de extrato e frações 26
Figura 7 - Esquema de diluição seriada e análises espectrofotométricas 28
Figura 8 - Esquema das medidas eletroquímicas..... 29
Figura 9 - Cromatogramas do EBCE em diferentes comprimentos de onda: (A) Detector ELS 210 – 600 nm; (B) Detector PDA 254 nm; (C) Detector PDA 360 nm 30
Figura 10 – Estrutura Geral dos flavonoides com os principais sítios de substituição 32
Figura 11 – Consumo de radical DPPH em função das concentrações do EBCE..... 33
Figura 12 – Gráficos para a determinação da capacidade do EBCE reduzir o radical $DPPH^{\bullet}$. 34
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para o EBCE 1,0 (mg. mL^{-1}) em tampão Britton-Robinson 0,1 M sobre ECV à 100 $mV.s^{-1}$. (a) pH 2,0; (b) pH 3,0; (c) pH 4,0; (d) pH 5,0; (e) pH 6,0; (f) pH 7,0. 35
Figura 14 - Influência do pH na magnitude das correntes de pico (Ip) e deslocamento de potencial (E) em tampão Britton-Robinson 0,1 M. (A): Ipa 1 x pH x Epa 1; (B): Ipa 2 x pH x Epa 2; Ipa 3 x pH x Epa 3. 36
Figura 15 - 1ª, 2ª, 3ª e 4ª Ipa do EBCE em diferentes tampões 37
Figura 16 - Correntes de pico (Ipa) em função de diferentes concentrações (mol. L^{-1}) do eletrólito McIlvaine em pH 5,0..... 37
Figura 17 - Curvas voltamétricas obtidas para do Extrato de *C. erecta* 38
Figura 18 - Corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura (Ipa *v*s.$v^{1/2}$). Logaritmo da corrente de pico anódico pelo logaritmo da velocidade de varredura (log Ipa *v*s log v). 39
Figura 19 - Valores de Ipa Vs f (Hz) para os quatro picos de oxidação do EBCE 40

Figura 20 - Gráfico da otimização da amplitude: a Vs Ipa. 41
Figura 21 - (A) Dependência do pH em função da Ipa em tampão BR 0,1 M à 100 $mV.s^{-1}$. .. 42
Figura 22 - Análise da magnitude das correntes em pH 5,0, nos tampões: McIlvaine, PBS, Tris-HCl e BR 43
Figura 23 – Determinação da concentração de maior valor de Ipa para a rutina 44
Figura 24 – Estudo de velocidade de varredura para a rutina 44
Figura 25 – (A): Gráfico Ipa vs. $V^{1/2}$; (B): Gráfico Log v vs. Log Ipa. 45
Figura 26 - Valores de Ipa Vs f (Hz) para a Rutina 45
Figura 27 - Dependência da Ipa (µA) no processo de oxidação da rutina em função da variaçãode a (mV). 46
Figura 28 - Voltamogramas do extrato da *C. erecta* e rutina 48
Figura 29 – (A): Processos redox para o EBCE; (B): Processo redox para rutina sob as mesmas condições do EBCE 49
Figura 30 - Representação dos sítios de oxidação da rutina correspondentes ao 1º e 2º pico de peroxida oxidação no anel B e A. 51
Figura 31 – Oxidação dos substituintes 3´, 4´- de hidróxidos do anel B (catecol), correspondente ao primeiro sítio de oxidação da rutina e os demais flavonoides 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da fase acetato de etila do extrato hidroalcoólico da *C. erecta*. 31
Tabela 2 – Grupos substituintes para os flavonoides propostos.....33
Tabela 3 - Resultado do potencial antioxidante do extrato da *C. erecta*.....34
Tabela 4 - Valores de índice eletroquímico do EBCE para as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.....47
Tabela 5 - Atividade antioxidante via índice eletroquímico (IE) de 10 extratos de plantas 47

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** **9**
2 **OBJETIVOS** **11**
2.1 Objetivo Geral **11**
2.2 Objetivos Específicos **11**
3 REVISÃO DA LITERATURA **12**
3.1 Plantas daninhas: conceitos, problemas e aplicações **12**
3.2 *C. erecta* e as propriedades químicas do gênero *Commelina* **13**
3.3 Potencial dos antioxidantes de origem natural **17**
3.4 Radicais livres: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON's) **18**
3.5 Técnicas espectrofotométricas na determinação da capacidade antioxidante **19**
3.5.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) 19
3.5.2 ABTS $^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) 21
3.6 Técnicas eletroanalíticas **22**
3.6.1 Voltametria cíclica (VC) 22
3.6.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ) 24
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS **25**
4.1 Obtenção do extrato e fases: hexânica, acetato de etila e aquosa **25**
4.2 Caracterização do extrato bruto e fases por Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas **26**
4.3 Ensaios Espectrofotométricos para o estudo antioxidante **27**
4.4 Ensaios Eletroquímicos **28**
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **30**
5.1 Caracterização química da *C. erecta* **30**
5.1.1 Análise por Cromatografia Liquida: Detecção de Arranjo de Diodos (PDA) e Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD) 30
5.1.2 Análise por espectrometria de massas (MS/MS) 31
5.2 Ensaios Espectrofotométricos **33**
5.2.1 Capacidade do EBCE reduzir o radical DPPH $^{\bullet}$ 33
5.3 Ensaios voltamétricos para o EBCE **35**
5.3.1 Estudo da influência do pH para o EBCE 35
5.3.2 Escolha do eletrólito de suporte para o EBCE 36
5.3.3 Determinação da concentração do eletrólito para o EBCE 37
5.3.4 Estudo de velocidade de varredura para o EBCE 38
5.3.5 Otimização da Técnica de Voltametria de Onda Quadrada para EBCE 40
5.4 Ensaios voltamétricos para a rutina **41**
5.4.1 Influência do pH no comportamento eletroquímico da Rutina 41
5.4.2 Escolha do eletrólito de suporte com melhor sinal analítico para a rutina 43
5.4.3 Determinação da concentração do eletrólito de suporte 43
5.4.4 Estudo da velocidade de varredura da Rutina 44
5.4.5 Otimização da técnica de voltametria de onda quadrada 45
5.6 Capacidade antioxidante via índice eletroquímico (IE) **46**
5.7 Relação estrutura-atividade antioxidante da rutina com o potencial antioxidante total do EBCE **49**
6 CONCLUSÕES **53**
REFERÊNCIAS **54**

1 INTRODUÇÃO

As atividades farmacológicas conferidas às plantas medicinais estão associadas à composição química apresentada por cada espécie em particular, e dentre os grupos de compostos naturais de maior interesse, os flavonoides ganham destaque, devido às suas propriedades que são: antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (AGATI et al., 2012; DOS SANTOS; FARIAS RODRIGUES, 2017). Não obstante, as plantas daninhas ainda são pouco estudadas no que concerne às suas propriedades medicinais e nutracêuticas, o que requer uma atenção maior quanto às análises dos princípios ativos apresentados por esses vegetais (BONETTI; DAMBROZ; TOLENTINO, 2017; CHRISTOFFOLETI, 2001).

A espécie *C. erecta* trata-se de uma planta perene, vulgarmente conhecida como trapoeraba, andacá ou ainda erva-de-santa-luzia, e é considerada uma espécie daninha em diferentes culturas como: a soja, o café e o arroz, infestando principalmente lavouras anuais. Um breve estudo bibliográfico revelou a *C. erecta* pode ser uma fonte significativa de flavonoides e outros polifenóis de grande relevância farmacológica, o que instiga a investigação de suas propriedades antioxidantes (BEZERRA et al., 2019; TRAPP et al., 2016).

O desenvolvimento e modificação de técnicas (eletroquímicas, biológicas e colorimétricas) para determinação da atividade antioxidante de produtos naturais, apresentam relevância de interesse farmacológico, alimentício e biológico, fomentando pesquisas de caracterização fitoquímica e propriedades fitoterápicas de plantas medicinais (FERREIRA; AVACA, 2008; GIL et al., 2009). Nesse ínterim, os métodos de determinação da capacidade anti-radicalar, em geral, são seletivos quanto a sua reatividade, restringindo-se a determinado grupo de moléculas e reagentes.

A correlação entre técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas, é maior quando comparada ao número de elétrons (eletrólise em fluxo contínuo) e ao potencial de oxidação (voltametria cíclica). As técnicas voltamétricas correlacionam potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos que corroboram para a elucidação da capacidade antioxidante de espécies em solução (ALVES et al., 2010).

Não obstante, em detrimento de métodos colorimétricos como 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)para análises mais criteriosas, faz-se necessário o emprego de técnicas adjacentes, a fim de obter-se melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ação antioxidante dos compostos presentes numa

determinada amostra. Dentro dessa perspectiva, as propostas de aprimoramento de ferramentas instrumentais buscam melhorar a precisão e confiabilidade dos resultados.

Trabalhos recorrentes, apresentam a voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ) como uma ferramenta eficaz na caracterização do potencial de redução e comportamento eletroquímico de compostos fenólicos (ARTEAGA et al., 2012; KEENE; RUDDY; FHANER, 2019). Em função disso, no presente trabalho, foram aplicadas as técnicas de VC e VOQ para a determinação do potencial antioxidante do extrato hidroalcóolico da *C. erecta*, uma vez que, não foi encontrado na literatura nenhuma referência quanto a sua capacidade antioxidante por métodos voltamétricos (BEZERRA et al., 2019; SIMIĆ et al., 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como proposta, a avaliação do potencial antioxidante do extrato hidroalcóolico da *C. erecta*, por meio de técnicas eletroquímicas, uma vez que estas são mais sensíveis, mais rápidas e relativamente mais baratas quando comparadas às técnicas espectrofotométricas com redução dos radicais: DPPH e ABTS. Além de fornecer outras informações importantes, como o número de elétrons envolvidos nas reações redox.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o extrato bruto da *C. erecta* e investigar a atividade antioxidante por técnicas eletroquímicas e espectrofotométricas para uma proposta do potencial químico farmacológico da espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o extrato da espécie em estudo por técnicas de HPLC-PDA e MS/MS;
- Avaliar a capacidade antioxidante por meio de técnica espectrofotométrica utilizando o método do radical DPPH•;
- Determinar a potencial antioxidante total do extrato bruto da *C. erecta* (EBCE) por meio de técnicas eletroanalíticas de VC e VOQ;
- Correlacionar a estrutura-atividade antioxidante de um dos flavonoides presentes na amostra (padrão de rutina) com o potencial antioxidante total do EBCE.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plantas daninhas: conceitos, problemas e aplicações

Dentro do contexto histórico da agricultura, denota-se como daninha, toda planta que gera prejuízo às atividades humanas ou cresce em lugares indesejáveis (VASCONCELOS; SILVA; LIMA, 2012). Segundo a WSSA (The Weed Science Society of America) esse conceito se estende para toda planta que causa perda ecológica ou que causa problemas a saúde do homem ou animais (WSSA, 2016).

Por tanto, essas definições caracterizam o ponto de vista negativo para espécies desfavoráveis à produção agrícola, à estética de jardins e saúde humana, podendo ainda serem denominadas de infestantes, invasoras, espontâneas ou ruderais. Uma vez que possuem capacidade de crescerem em condições adversas e disputarem nutrientes do solo com outras culturas (LIMA et al., 2009; VASCONCELOS; SILVA; LIMA, 2012). Nesse sentido, os prejuízos ocasionados por algumas espécies de plantas daninhas geram impactos econômicos na agropecuária e agricultura.

Diante disso, podem ser destacadas as intoxicações alimentares e reações alérgicas tanto em humanos quanto animais, além dos impactos na agropecuária com a redução da capacidade das pastagens e alteração do sabor do leite quando ingerido por animais lactantes (DE OLIVEIRA JR.; CONSTANTIN; INOUE, 2011). Vale ressaltar, que na agricultura os problemas podem ocorrer de forma direta (competição, alelopatia, interferência na colheita e outras) e indiretas (hospedar insetos, doenças e outras) (KARAM; MELHORANÇA, 2008; QASEM, 2017; SILVA, S.O. MATSUMOTO, S.N. BEBÉ, F.V. JOSÉ, 2006).

Por outro lado, as aplicações medicinais de algumas plantas daninhas pelo conhecimento empírico ou até mesmo na dieta como fonte de vitaminas, tiveram seus efeitos fitoterápicos e nutracêuticos investigados na literatura (BONETTI; DAMBROZ; TOLENTINO, 2017; GAVILANE; CARDOSO; BRANDÃO, 1988; PALEARI, 2012). Os estudos fitoquímicos associados à etnobotânica revelaram que embora ignoradas em relação à outras plantas já consagradas como medicinais, as plantas daninhas têm ganhado notoriedade devido incessante busca por novas substâncias com propriedades farmacológicas (SINGH; SINGH, 2020).

Entretanto, percebe-se que quando o assunto é planta daninha, grande parte das pesquisas estão voltadas para meios de controles, seja para aprimoração dos métodos de manejo, desenvolvimento de novos herbicidas e modificação genética, pois há uma preocupação persistente do ponto de vista econômico e ecológico que tange a qualidade da produção agrícola e os impactos oriundos das tentativas de combate a espécies daninhas. Diante disso, verifica-se a mínima atenção às pesquisas de cunho fitofarmacologico voltados para essas espécies (FALEIRO et al., 2021; PANNEERSELVAM et al., 2020).

Nesse sentido, é notória que a discriminação etnobotânica está intimamente ligada às aplicabilidades das espécies vegetais quanto as suas utilidades ao homem, abrangendo aspectos culturais que ao longo da história passaram a receber respaldo científico (AIGBEDION-ATALOR, 2020; SOUSA et al., 2011). Contudo, se por um lado compreende-se a tendência do ser humano em focar nas necessidades primárias como alimentação, por outro, também se faz necessário a valorização da investigação fitoquímica para espécies consideradas daninhas e suas possíveis atividades farmacológicas (AIGBEDION-ATALOR, 2020).

3.2 *C. erecta* e as propriedades químicas do gênero *Commelina*

A *C. erecta* é uma planta perene, invasora de algumas culturas, como: soja, arroz e café, o que a torna indesejável na agricultura e trabalhosa pela sua alta resistência à herbicida (OLIVEIRA; FREITAS; VIEIRA, 2010; PANIGO et al., 2012). No Brasil, está presente na maior parte do território; apresenta uma flor azul característica

Figura 1), tendo preferência por solos úmidos e argilosos e, por este motivo, o seu crescimento e floração são mais comuns em locais sombreados e em épocas chuvosas respectivamente. (ROCHA et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Figura 1 – *C*ommelina erecta L.

Fonte: do próprio Autor (2020).

As plantas daninhas pertencentes ao gênero *Commelina* tem sido descritas em 28 países como problema recorrente em 25 culturas (ABD EL-HAMID; EL BOUS, 2019). No Brasil, destacam-se cinco espécies: *C. benghalenses, C. nudiflora, C. diffusa, C. villosa e C. erecta,* todas conhecidas por: Trapoeraba, podendo receber outros nomes de acordo com a região, como erva-de-santa-luzia, andacá e mata-cachorro (SOUZA; ALVES; FUSHITA, 2004). Entretanto, nesse estudo, leva-se em consideração o contexto socioambiental e socioeconômico na qual a espécie está inserida, visto que a literatura relata tanto o uso medicinal pelo conhecimento empírico, quanto as atividades biológicas comprovadas cientificamente.

O uso medicinal de espécies *Commelina* é conhecido por diversas culturas orientais, sobretudo em comunidades mais pobres, utilizadas para tratar dores musculares e combater infecções (MORROGH-BERNARD, 2008). Na África, por exemplo, em épocas de escassez de alimentos, algumas comunidades, incluem na dieta a *C. erecta* proveniente da invasão das culturas de espécies cultiváveis (HILLOCKS, 1998). Por outro lado, suas propriedades fitoterápicas e nutracêuticas passaram a ser exploradas por comunidades rurais e indígenas, usada no combate de infecções oftálmicas, dores musculares e inflamações (BALDAUF et al., 2009).

Alguns trabalhos da literatura, investigaram a eficácia biológica do gênero *Commelina*, foi o caso de Kuppusamy et al., (2016), que obtiveram nanopartículas metálicas utilizando extrato de *C. nudiflora* para induzir apoptose celular em células cancerígenas *in vitro*. Entre outros estudos para o gênero, a *C. paludosa* apresentou atividades antioxidantes, antimicrobiana, antidiarreica e antipirética significativas (RIAZ et al., 2018). Enquanto a *C. difusa* demonstrou atividade depressora no sistema nervoso central para testes realizados em ratos (SULTANA; MANNAN; AHMED, 2018).

Não obstante, para a *C. benghalensis,* constatou-se uma riqueza em macronutrientes e minerais, o que sugere seu uso como suplemento em ração bovina e uma fonte em potencial para fitomedicamentos (ABD EL-HAMID; EL BOUS, 2019; SOUZA et al., 1999). Também é relatado sua atividade antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e anticorrosiva quando agregada à estruturas metálicas (AHAMED et al., 2019; CUÉLLAR CUÉLLAR; OKORI, 2010; HOSSAIN et al., 2014).

Alguns pioneiros como Cerdeiras; Pianzzola; Vázquez (2001) investigaram a atividade antimicrobiana da *C. erecta* que mostrou-se eficaz contra organismos do tipo Gram-positivos e Gram-negativos. Não obstante, estudos citotóxicos do extrato da *C. erecta* em diferentes

concentrações revelaram boas respostas frente *Artemia salina* e larvas de *Aedes aegyptii* (SANTOS et al., 2011). Além disso, os extratos mostraram atividade anti-*Staphylococcus aureus* (SAMA FONKENG et al., 2015).

Verifica-se ainda a atividade antioxidante e o estudo fitoquímico da *C. erecta*, cuja a composição revela classes de compostos fenólicos com extrema valia para aplicações medicinais e nutracêuticas como os flavonoides e ácidos fenólicos: quercetina, luteolina e ácido chiquímico respectivamente (BEZERRA et al., 2019; CHIMEZIE, 2018). Composição que contribui significativamente para o potencial proliferativo da espécie para o teste *Allium cepa* L. (TRAPP et al., 2016).

Outros fatores constatados para a *C.* erecta, tange propriedades fitoremediadoras de solos contaminados com óleos e metais pesados, respectivamente de motores e cobre, devido sua alta capacidade de bioacumulação foliar em relação ao cobre, podendo atingir 1000 $mg.kg^{-1}$ (AKUTAM et al., 2014). Mediante o exposto, o Quadro 1 apresenta os principais estudos citados na literatura, para o gênero *Commelina.*

Quadro 1 - Estudo etnobotânico e fitoquímico do gênero *Commelina*.

Nome	*Partes da planta utilizada*	*Relevância etnobotânica*	*Estudos biofarmacológicos*	*Estudo fitoquímico*	*Autores*
C. erecta	Folhas e caules	Tratamento de eczema e infecções de pele;	*	Fenóis, Flavonoides, Alcaloides, Esteróis e Triterpenos	Sama Fonkeng et al., (2015)
	Folhas	*	Atividade Antimicrobiana e Antioxidante	Fenóis, Flavonoides e Cumarinas	Silva, (2015)
	Folhas e caules	*	Atividade Antimicrobiana	*	M.P. Cerdeiras et al (2001)
	Folhas e flores	*	Análise Proliferativa e Fitoquímica	Ácido gálico, Catequina, Ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, epicatequina, Isoquercetrina, Quercetina e canferol	Trapp et al., (2016)
	Flores e caule	*	Fitoquímico e Antioxidante	Quercetrina, Isoquercitrina; luteolina; quercitrina; ácido chiquímico,Glicósidos esteróides,sitosterol, estigmasterol e campesterol	Bezerra, J. A. et al (2019)
	Folhas e caule	Infecções	Os benefícios potenciais das ervas daninhas	*	Garlet & Irgang (2001)
C. benghalensis	Planta inteira	Antidiarreica	*	*	Gavilanes M. L. et., al (1988)
	Planta inteira	Dores	Atividade Analgésica	*	Hasan et al., (2010)
	Raízes	Hanseníase, queimaduras, dor, inflamação e laxante.	Analgésica e Antiflamatória	*	Hossain et., al (2014)
	Planta inteira	*	Antimicrobiana	Fenóis e flavonoides	Armando & Dennis (2010)
	Folhas	Diuréticos, febrífugos e anti-inflamatórios inchaços na pele, hanseníase e laxante.	Caracterização eletroquímica do adulto de catecol-dimetilamina em diferentes valores de pH	Saponinas, fenóis, flavonoides, alcaloides, taninos, proteínas e aminoácidos	K.R. Ahamed et al (2019)
C. nudiflora	Folhas	Alergia, coceiras, infecções em geral e picadas de inseto	Plantas de cunho medicinal	*	Boscolo, O.H. & Senna Valle, L (2008)
Commelina ssp	Folhas e caules	Hanseníase, infeções oculares e resfriados	Os benefícios potenciais das ervas daninhas	*	Hillocks (1998)
C. robusta	Toda a planta	Antidiarreica e diurética	*	*	Gavilanes M. L. et., al (1988)
C. elegans	Toda a planta	Diurética	Plantas daninhas como medicamentosas de uso popular	*	Gavilanes M. L. et., al (1988)
C. cayennensis	Toda a planta	*	Citotoxicidade, atividades microbiológicas e larvicida do extrato etanólico	*	Santos, G. P. et al (2011)

3.3 Potencial dos antioxidantes de origem natural

O conceito de antioxidante ainda que amplo, pode ser resumido em: toda espécie química que atua em menor quantidade frente ao substrato oxidante na inibição e prevenção do estresse oxidativo (CHACON TORRES, 1993; KOWLURU; MISHRA, 2015). Sobretudo, vale ressaltar os mecanismos de reação para uma espécie antioxidante, cuja redução do substrato oxidante pode ocorrer tanto pela transferência de um átomo de hidrogênio (TAH) ou, pela transferência de um elétron (TE), influenciadas pela estrutura molecular das espécies envolvidas e o pH do sistema (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

As espécies com propriedades antioxidantes, doam um elétron ou liberam um átomo de hidrogênio para o substrato oxidado. Dessa forma, atuam como espécies de sacrifício na proteção de substâncias essenciais para a manutenção dos processos metabólicos na biologia humana. Podem ser classificados segundo sua natureza como naturais ou sintéticos, e ainda como endógenos (do próprio organismo) ou exógenos (alimentos) de acordo com sua origem (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Antioxidantes sintéticos (fenólicos) como butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) são amplamente empregados na indústria de alimentos e farmacêutica pela capacidade de inibir a oxidação lipídica e, agregar maior tempo de vida útil do produto ao conservar suas propriedades físico-químicas (OLIVEIRA; DORS, 2007; YEHYE et al., 2015). Nesse sentido, foram investigadas as atividades anti-inflamatórias e anticarcinogenicas do BHT mostrando-o como um forte antioxidante ao combate de doenças degenerativas, principalmente quando este apresenta o enxofre em sua estrutura (AHMAD et al., 2019).

Por sua vez, uma dieta rica em polifenóis associada a outras substâncias, apresentam um potencial sinergético na quimioprevenção de algumas patologias. Estudos apontam a ação de tocoferóis, carotenoides, flavonoides e ácido ascórbico na atuação ao combate de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON´s) (superóxido, radical hidroxil e radicais peroxil) nas reações bioquímicas. Todavia, ainda que absorvidos pelo trato intestinal, não atingem concentrações plasmáticas significativas acima de 1uM (HALLIWELL; RAFTER; JENNER, 2005).

O consumo de frutas e vegetais como fonte naturais de antioxidante, atuam na redução dos danos da oxidação celular no DNA, lipídios e proteínas como prevenção de carcinogêneses (THOMPSON et al., 1999). Entretanto, ainda não há fatos *in vivo* que comprovem as reais contribuições sistêmicas dos mecanismos correlacionados aos níveis de polifenois no organismo.

Há relatos na literatura sobre a eficácia do consumo de antioxidantes na prevenção do câncer e pré-tratamento na fase inicial, ao combaterem as ERON´s envolvidas no processo de oxidação. No entanto, quando esses são associados à fase de tratamento, pode haver tanto uma contribuição a sobrevivência das células cancerígenas, quanto uma redução da sua formação. Outro fator importante, é escassez de teste clínicos (POLJSAK; MILISAV, 2019).

Ainda há muito a ser explorado quanto ao uso de polifenóis associado a medicamentos, a exemplo disso, a quercetina apresentou uma sinergia com o antibiótico sulfametoxazol ao ampliar seu potencial antibacteriano e reduzir os efeitos colaterais (SAHYON; RAMADAN; MASHALY, 2019). Técnicas sofisticadas como microespectroscopia sincrotron e imunofluorescência, evidenciaram que os polifenóis atuam na proteção de macromoléculas e auxiliam na ativação da via antioxidante celular, induzem a translocação da proteína NrF2, ao nível do estresse oxidativo (BARRAZA-GARZA et al., 2020).

Os efeitos *in vivos* da administração clínica de antioxidantes em humanos ainda são contraditórios no que tange os mecanismos de ação, uma vez que alguns tratamentos tiveram mais êxitos em animais, a inconsistência de resultados pode estar intimamente ligada a escassez de ensaios clínicos randomizados (KHURANA et al., 2018). Diante disso, percebe-se a necessidade de explorar a interação dos antioxidantes nas células e seus efeitos sinergéticos associados a quimioterapia e radioterapia no tratamento de carcinogêneses em humanos (THYAGARAJAN; SAHU, 2018).

3.4 Radicais livres: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON's)

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produtos secundários das reações metabólicas das células, por esse motivo, são inerentes a vida aeróbica e desempenham papeis importantes no sistema de defesa intracelular e transporte de elétrons mitocondrial (ANGELOVA; ABRAMOV, 2016). Entretanto, a insuficiência na produção endógena de antioxidantes, culmina no desequilíbrio fisiológico conhecido por estresse oxidativo que por sua vez, é oriundo do desequilíbrio das altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO´s) e nitrogênio (ERN´s) que passam a exercer maior atividade no metabolismo (LU et al., 2018).

A produção de radicais livres pode ser induzida ao excesso por fatores externos, como intoxicação por gases oriundos da poluição ambiental (indireta) ou, pelo tabagismo (direta); alimentação desregulada por excesso ou deficiência de nutrientes; Consumo de bebidas alcoólicas e exposição demasiada à diferentes fontes de radiação, são fatores que influenciam na homeostase celular (BAAN et al., 2007; CHO et al., 2004; LECCI; LOGRIECO; LEONE, 2014; MOSKAL et al., 2007; SAHA et al., 2017).

Evidências apontam que o estresse oxidativo possui uma correlação com doenças cardiovasculares, reprodutivas, neurodegenerativas, doenças coronárias, envelhecimento precoce e uma série de outros distúrbios nas células (LASSMANN; VAN HORSSEN, 2016; LIGUORI et al., 2018; LU et al., 2018; TANIYAMA; GRIENDLING, 2003). No entanto, a discussão sobre os possíveis efeitos benéficos de ERON´s, tem sido documentado na literatura, a exemplo disso, Cheng et al.,(2016) afirma que a produção de ERON´s pode ser benéfica durante a prática de exercícios físicos e aponta uma possível interferência de antioxidantes exógenos à esses benefícios.

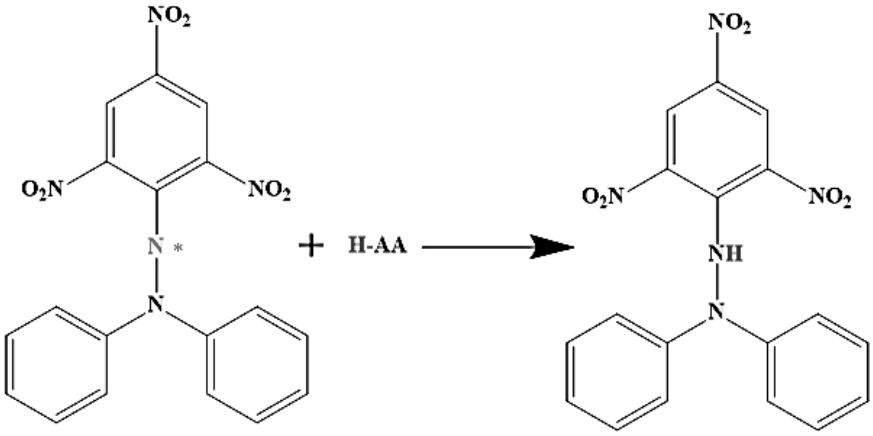
Em contrapartida, o uso de antioxidantes exógenos tem sido uma alternativa viável no desenvolvimento de novas tecnologias farmacológicas, médicas e alimentares na tentativa de inibir ou prevenir os efeitos do estresse oxidativo (CHOI; VENKATESAN; SHIM, 2019; NOON; MILLS; NORTON, 2020; WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011). Nesse sentido, o consumo de suplementos alimentares ricos em antioxidantes, tem se tornado cada vez mais comum.

3.5 Técnicas espectrofotométricas na determinação da capacidade antioxidante

3.5.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A redução do radical DPPH é uma técnica colorimétrica amplamente utilizada na determinação da atividade antioxidante de amostras biológicas, alimentos e vegetais (PREVC et al., 2013). Consiste na medição espectrofotométrica da concentração dos radicais DPPH remanescentes à reação da amostra, e fornece leituras em um comprimento de 515-517 nm (MARINOVA; BATCHVAROV, 2011). Além disso, sua aplicação se justifica por tratar-se de uma espécie estável devido a ressonância de um elétron desemparelhado, cuja a redução ocorre ao receber um átomo de hidrogênio (etapa lenta) ou um elétron (etapa rápida) conforme a Figura 2, (JI et al., 2019).

Figura 2 - Redução do radical DPPH por uma espécie antioxidante (H-AA) através da etapa lenta de doação de H·.



Fonte: Do próprio Autor, (2020).

Dentre as particularidades do radical, estão inseridas a solubilidade restrita a solventes orgânicos, redução da absorbância quando em metanol e acetona sob a luz, e sensibilidade à algumas bases de Lewis. Quando em solução o processo de redução pode ser observado pela mudança de cor, que transita de um violeta escuro à amarelo claro. Possui uma alta reatividade, o que dificulta a sua quantificação por espectrofotômetro convencional (SHARMA; BHAT, 2009).

Além disso, outros fatores podem influenciar os resultados de forma significativa, como o tipo e concentrações do solvente, pH, a quantidade de água, íons metálicos e hidrogênio presentes na solução (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012). Diante disso, dependendo dos agentes redutores presentes no sistema, pode ser reduzido tanto pela transferência direta de um elétron (TE) ou pela transferência de um átomo de hidrogênio (TAH) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Marinova e Batchvarov (2011), ainda destacam que o método é sustentado sob dois principais fatores: pela escolha do solvente (etanol-metanol) e a razão amostra/DPPH em termos de volume.

Diante disso, o método tem sido amplamente empregado pela sua praticidade e reprodutibilidade, em equipamentos mais sofisticados como leitores de microplacas ELISA, embora os protocolos adotados não pertencerem a um padrão universal, pois diferem em parâmetros para atender a objetivos específicos (KEDARE; SINGH, 2011). Nesse sentido, em amostras vegetais tem sido útil ao fornecer um panorama da atividade antioxidante total de extratos, proporcionando um boa perspectiva na bioprospecção de produtos naturais (ASADI-SAMANI et al., 2019; CAI et al., 2006).

Não obstante, a fim de aprimorar a técnica, novos métodos tem sido desenvolvidos para customizar o uso de reagentes e ampliar os resultados, a exemplo disso MUSA et al., (2013), aplicou DPPH seco para obter melhores rendimentos na taxa de antioxidantes. Três anos mais tarde, foi além, aplicou modelagem computacional na previsão de resultados por coloração de imagens reacionais, descartando o uso de um espectrofotômetro para obtenção de resultados semiquantitativos (MUSA; ABDULLAH; AL-HAIQI, 2016).

Bukman et al., (2013) propuseram uma adaptação do ensaio DPPH para um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) na determinação da atividade antioxidante de vinhos. Enquanto que outros autores desenvolveram um dispositivo em papel, baseado no método de laminação (IRIVIBULKOVIT; OUANTHAVONG; AMEENOI, 2018). Diante disso, novas propostas metodológicas são analisadas para minimizar ainda mais os custos com equipamentos e reagentes.

3.5.2 ABTS $^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

ABTS é uma técnica colorimétrica, cuja a redução do radical catiônico $ABTS^{\bullet+}$ é obsersevada por uma mudança gradativa na coloração da solução quando em contato com o substrato antioxidante, partindo de azul turqueza à verde escuro. Semelhante ao DPPH, o potencial antioxidante também pode ser medido no espectrofotometro pela diferança entre as absorvâncias iniciais e finais nas regiões próximas de 734, 645,e 815 nm (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

As principais vantagens da técnica estão na solubilidade tanto em meio orgânico quanto aquoso, sua estabilidade em uma ampla faixa de pH e uma boa reatividade em compostos puros, lipofílicos e hidrofílicos (RE et al., 1999a). Contudo, a solução de trabalho possui um tempo de vida útil de apenas 2 horas, devido à instabilidade do $ABTS^{\bullet+}$ que deve ser preparado em laboratório (NENADIS et al., 2004).

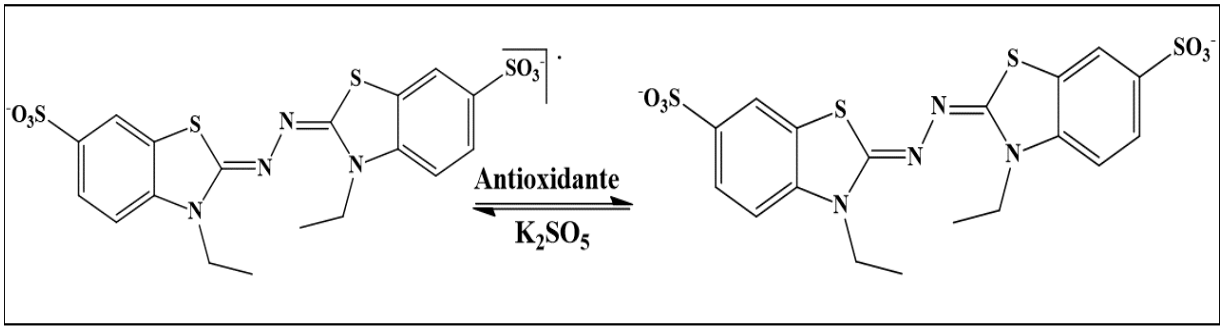
A técnica ao longo do tempo precisou de alguns ajustes devido às contestações acerca do método pioneiro, que ativava a metimioglobina pela reação com o peróxido de hidrogênio na presença do ABTS formando $ABTS^{\bullet+}$, dessa forma, a amostra era adicionada no meio reacional antes da formação do radical, o que sugeria a reação dos antioxidantes com seus produtos de oxidação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Por esse motivo, Re et al., (1999) aperfeiçoaram a técnica, na qual é realizada a oxidação prévia do ABTS em solução de

persulfato de potássio, promovendo a formação do cátion radical estável para posterior redução em contato com os substratos antioxidantes.

Desde sua criação, a técnica passou por algumas adaptações de acordo com as necessidades analíticas dos ensaios químicos, como exemplo, Ciou et al., (2020) desenvolveram um sensor eletroquímico com ABTS fixado em FTO modificado por filme de quitosana para determinação de creatina em urina. Nesse contexto, o potencial redox do radical $ABTS^{\bullet+}$, é 0,68 V, o que significa que as substâcias candidatas a antioxidantes precisam apresentar potenciais redox inferiores (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A reação de formação e estabilização do $ABTS^{\bullet+}$ é apresentada de forma simplificada na Figura 3., cuja interação do radical com uma espécíe antioxidante ocorre no sentido direto da reação, e a formação do radical na presença de persulfato de potássio é esquematizada no sentido inverso.

Figura 3 - Reação de estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ com um antioxidante (no sentido direto) e sua formação (no sentido reverso)



Fonte: (RUFINO et al., 2007). Adaptado pelo autor (2020).

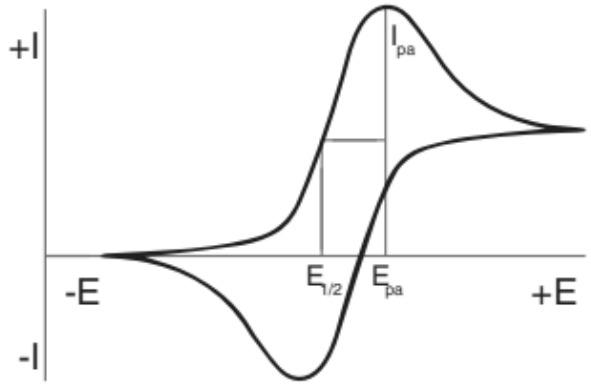
3.6 Técnicas eletroanalíticas

3.6.1 Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica trata-se de uma técnica eletroanalítica cuja magnitude da corrente elétrica produzida durante a reação, é medida em função de um potencial (E) em Volts aplicado dentro de uma faixa específica de trabalho. Dessa forma, a VC é capaz de fornecer informações termodinâmicas e cinéticas de interações redox, bem como o número de elétrons e prótons envolvidos na reação (PACHECO et al., 2013). A partir do voltamograma cíclico oriundo de uma varredura numa dada faixa de potencial, é possivel determinar a reversibilidade

do processo redox para a espécie em estudo, podendo ser classificado em: (i) reverssível, (ii) quase-reversível e (iii) irreversível (POLLET; CURNICK, 2012).

Figura 4 - Representação esquemática de um voltamograma cíclico onde: $E_{1/2}$, I_{pa} e E_{pa} representam: Potencial de meia onda, Corrente de pico anódico e Potencial de Pico anódico respectivamente.



Fonte: (SCHILDER et al., 2020).

A reversibilidade de uma reação redox pode ser determinada pela cinética da reação, para uma taxa rápida de transferência de elétrons que caracteriza um sistema em equilíbrio e reversível controlado por difusão, calculado pela diferença de potencial anódico e catódico de acordo com a equação (1), onde *n* é o número de elétrons envolvidos na semi-reação (SKOOG et al., 2013).

$$\Delta E\mathrm{p} = |E\mathrm{pa} - E\mathrm{pc}| = 0{,}059/n \qquad (1)$$

Também é necessário considerar os tipos de correntes geradas no sistema, podendo ser faradaícas (oriundas das reações redox entre eletrodo de trabalho e auxiliar) ou não faradaíca também denominada como corrente capacitiva (corrente residual do processo de carga/descarga da dupla camada elétrica) (HARVEY, 2000). A corrente capacitiva é um fator limitante no que infere a sensibilidade da técnica, reduzindo os níveis de detecção à um fator na ordem de 10^{-6} mol.L^{-1}.

No que concerne à aplicações na área da química, a VC compreende ánalises que vão desde sínteses de materiais à processos metabólicos, bem como na caracterização de estruturas, mecanismos de reações e estudo da cinética enzimática (CHOOTO, 2019). Dessa forma, a técnica é bem aceitável na determinação da capacidade antioxidante total de matrizes

complexas como extrato bruto de plantas, chás, sucos e vinhos (BATALOVA; NABOKOVA; REGER, 2016; SCHILDER et al., 2020).

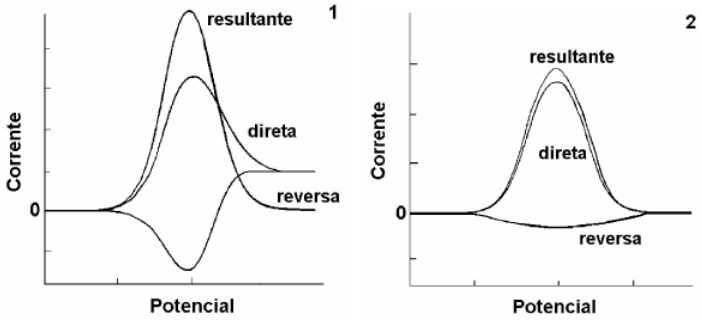
3.6.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

A técnica possui maior sensibilidade em relação à voltametria cíclica, isso porque a corrente só é medida no final de cada etapa de potencial aplicado, refletindo na redução significativa da corrente capacitiva, onde somente a corrente faradaica é registrada como resultante no voltamograma, proporcionando maior sensibilidade ao sistema e a qualidade dos dados voltamétricos. Além disso, o tempo de varredura é expressivamente menor em relação às outras técnicas de pulso e VC. (MIRCESKI et al., 2013; MIRCESKI; SKRZYPEK; STOJANOV, 2018).

As vantagens de rapidez e sensibilidade apresentadas pela VOQ, faz dela uma técnica apropriada para quantificação de importantes classes de compostos orgânicos, como proteínas, vitaminas, fenóis, benzoquinonas, pesticidas, herbicidas e fungicidas, alcaloide e terpenoides, assim como metais pesados e drogas (MIRCESKI et al., 2013).

Quanto à obtenção de informações mecanísticas e cinéticas das reações na superfície do eletrodo, os pulsos voltamétricos são aplicados na varredura direta e reversa, mas geralmente apenas os componentes líquidos (resultante) são mostrados na Figura 5. Além disso, a VOQ é indicada principalmente para sistemas irreversíveis, os quais ocorrem apenas oxidação ou redução. (MIRČESKI; STOJANOV; SKRZYPEK, 2018).

Figura 5 - Voltamogramas para um processo redox reversível (1) e um irreversível (2) na técnica de Voltametria de Onda Quadrada



Fonte: (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Obtenção do extrato e fases: hexânica, acetato de etila e aquosa

Amostras da espécie em estudo *C. erecta* foram coletadas na zona rural de São Luís (MA), bairro maracanã (2°36'60.0" Sul 44°17'48.6" Oeste), especificamente no mês de abril (2019), período chuvoso na região, favorável para o crescimento da planta. e posteriormente transportados à Universidade Federal do Maranhão, onde uma exsicata foi encaminhada ao Herbário e identificada (Nº tombo MAR: 11.595), eliminando as incertezas quanto às variações da espécie.

O restante do material foi levado ao laboratório do Grupo de Química de Produtos Naturais da UFMA, onde foram submetidos à secagem em estufa por 72 horas e, posteriormente, levadas a trituração por moinhos de faca a fim de facilitar o processo de extração. Para obtenção do extrato foi utilizada a técnica de percolação, na qual foram entumecidos 75 g da amostra em solução hidroetanólica durante 2 horas. Em seguida, transferiu-se a massa entumecida para o percolador, o qual foi calibrado a uma vazão de 3 gotas/minuto.

O tempo para a percolação foi 20 dias, onde em cada dia era adicionada uma alíquota de 100 ml de uma solução hidroetanólica (70%). Assim, ao final desse processo, obteve-se 2,5 L do extrato hidroalcoólico (percolado), que foi submetido à evaporação em um sistema de Rota Evaporador, para retirada do etanol a uma temperatura média de 40 ºC. Por fim, a fase aquosa restante, foi fracionada em recipientes 250 mL e levados ao congelador à -20 ºC por 48hs.

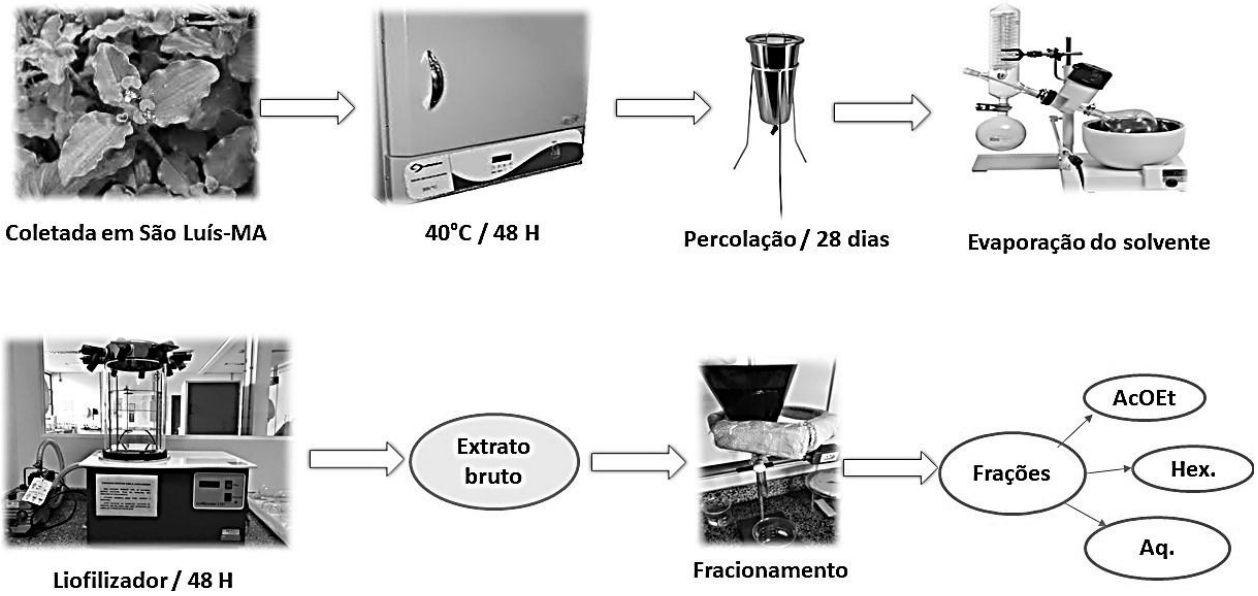
Após o tempo de congelamento, os recipientes contendo o extrato aquoso, foram acondicionados em um liofilizador, onde foram mantidos por 72 horas para sublimação da fase aquosa. Uma vez liofilizadas, as amostras secas foram transferidas para um único recipiente o qual foi pesado em uma balança analítica. A massa obtida foi 17,3 g de extrato bruto, cujo rendimento foi equivalente à 23 % da massa inicial da amostra.

Para obtenção das fases, foram pesados 7 g do extrato bruto e, posteriormente solubilizados em 150 mL de uma solução de água/metanol em uma proporção de 7:3. Em seguida a solução foi transferida para um funil de separação onde foram adicionados 50 mL hexano completando-se 200 mL de solução para a obtenção das partições aquosa e hexânica.

As frações de hexano eram removidas duas vezes ao dia, a cada 12 horas, por um período de 72 horas. Da mesma forma, o procedimento foi repetido para a partição acetato de

etila, no entanto, esta última obteve uma duração de 96 horas. Ao encerrar o fracionamento, foram obtidas três fases: hexânica, acetato de etila e aquosa, as quais foram submetidas à rota evaporação para retirada dos respectivos solventes, com exceção da fase aquosa que foi congelada e liofilizada. As etapas descritas anteriormente foram sintetizadas na Figura 6.

Figura 6 - Obtenção de extrato e frações



Fonte: do próprio Autor, (2020).

4.2 Caracterização do extrato bruto e fases por Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas

Todo o material obtido no LPQN da UFMA, foi encaminhado para caracterização no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais (UNESP - Baixada Santista) por Espectrometria de Massas (MS/MS). O extrato bruto e as fases hexânica, acetato de etila e aquosa foram analisados por injeção direta em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific®, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações obtidas em múltiplos estágios (MSn), em uma interface do tipo ion-trap (IT).

O modo positivo foi aplicado para o extrato bruto e o modo negativo para as fases, para a geração e análise dos espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -30 eV, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350 °C, gás de arraste (N_2) e fluxo

60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de m/z 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

A infusão de fluxo direto das amostras foi realizada num analisador do tipo *Ion trap* da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 10 μL.min^{-1}. A análise completa de varrimento foi registada na gama m/z de 100-1000.

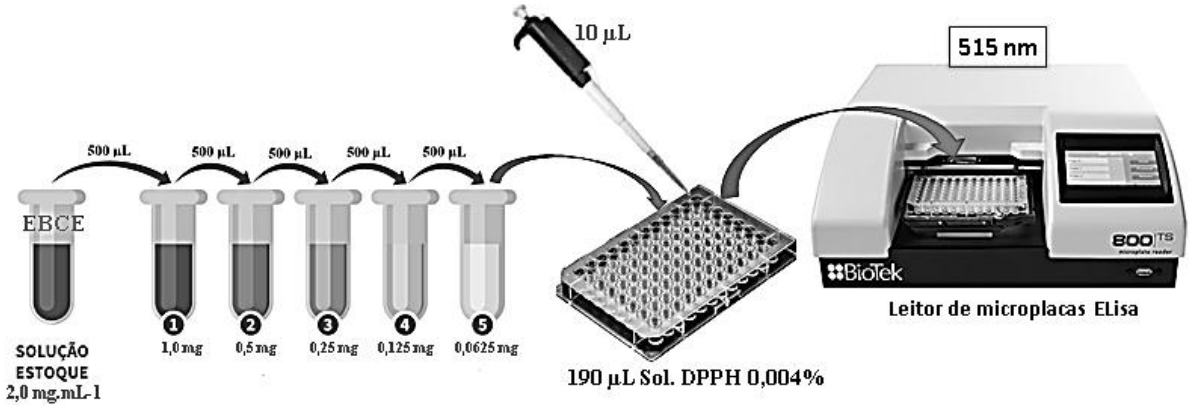
As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa m/z. O segundo evento de varredura consistiu em uma experiência MS / MS realizada utilizando varredura dependente de dados nas moléculas $[M-H]^-$ dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms.

Os íons de produto foram submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos do extrato hidroetanólico, fases hexânica acetato de etila e aquosa e foi realizada por meio de comparações com padrões de fragmentação (MS) obtidos na literatura.

4.3 Ensaios Espectrofotométricos para o estudo antioxidante

As medidas espectrométricas do radical DPPH foram adaptadas de acordo com BRAND-WILLIAMS et.,(1995), foi preparada uma solução de DPPH a 0,004% em álcool metílico para 100 mL e transferida para um frasco âmbar, devidamente etiquetado. Os extratos liofilizados foram diluídos em etanol sob diferentes concentrações (1000 – 62,5 μg/mL). Em vista disso, utilizou-se volumes fixos de solução DPPH (190 μL) e 10 μL de solução contendo a amostra (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de diluição seriada e análises espectrofotométricas



Fonte: do próprio Autor (2020).

As leituras foram realizadas em um Leitor de microplacas por absorbância (Elisa) à 515 nm, utilizando etanol como branco (para verificação dos parâmetros cinéticos), as leituras foram monitoradas a cada minuto, onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. Os resultados foram obtidos com aplicação da equação (1), onde AA%: atividade antioxidante A_c: absorbância controle, A_0: absorbância da amostra.

$$AA\% = \frac{Ac - A0}{Ac} = x\,100 \qquad (1)$$

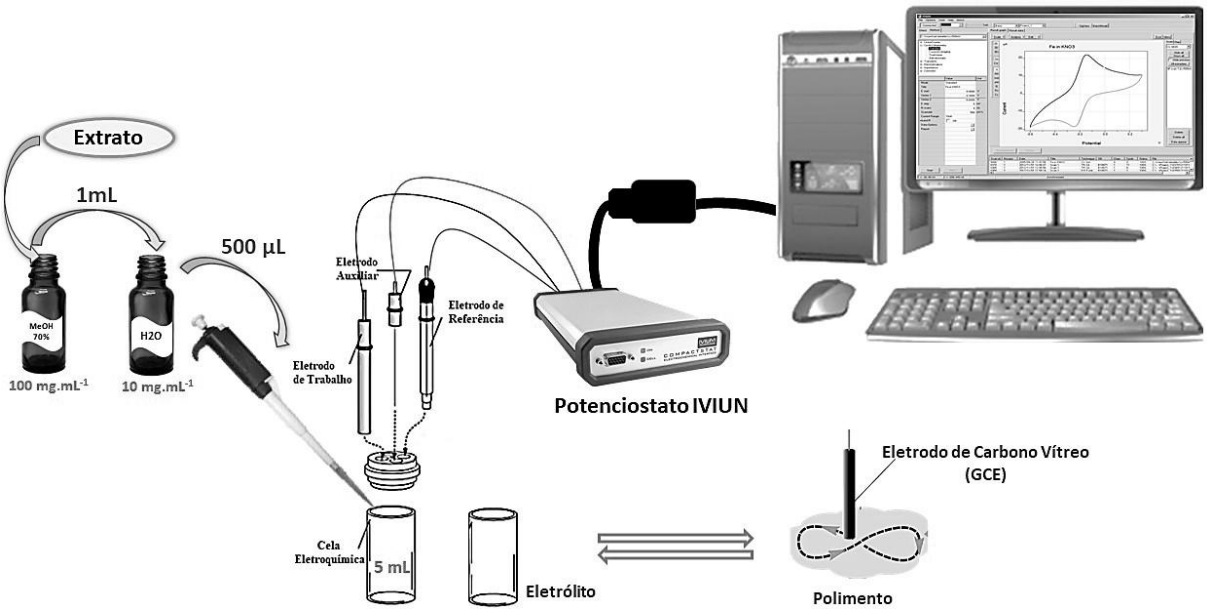
4.4 Ensaios Eletroquímicos

4.4.1 Parte experimental dos estudos eletroquímicos

Para as medidas voltamétricas, foi pesado 1 g do extrato bruto e dissolvido em 10 mL de etanol a 70% para obtenção de uma solução estoque hidroalcoólica a 100 mg. mL^{-1}. Desse modo, a solução padrão foi preparada a partir de uma alíquota de 1 mL da solução estoque, diluída para 9 mL de água deionizada. Sendo assim, a solução padrão a ser utilizada nas medidas tinha concentração de 10 mg. mL-^{1}, que por diluição diretamente na célula eletroquímica, apresentava concentração final de 1 mg. mL^{-1}.

A célula eletroquímica utilizada neste trabalho comportava três eletrodos: trabalho (Carbono vítreo), Contra-eletrodo (Platina) e Referência (Ag/AgCl), os quais foram conectados ao potenciostato (IVIUM). A solução contendo o extrato era adicionada na célula para a realização das medidas. O eletrodo de trabalho era previamente polido antes de cada leitura para obter-se o máximo de homogeneidade das medidas (Figura 8).

Figura 8 - Esquema das medidas eletroquímicas



Fonte: do próprio Autor, (2020).

As técnicas de VC e VOQ foram otimizadas, assim como os parâmetros reacionais da amostra: pH, eletrólito de suporte e concentração do eletrólito, com a finalidade de compreender as melhores condições em que o EBCE apresenta uma maior capacidade antioxidante. De modo análogo os mesmos parâmetros foram observados para a rutina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

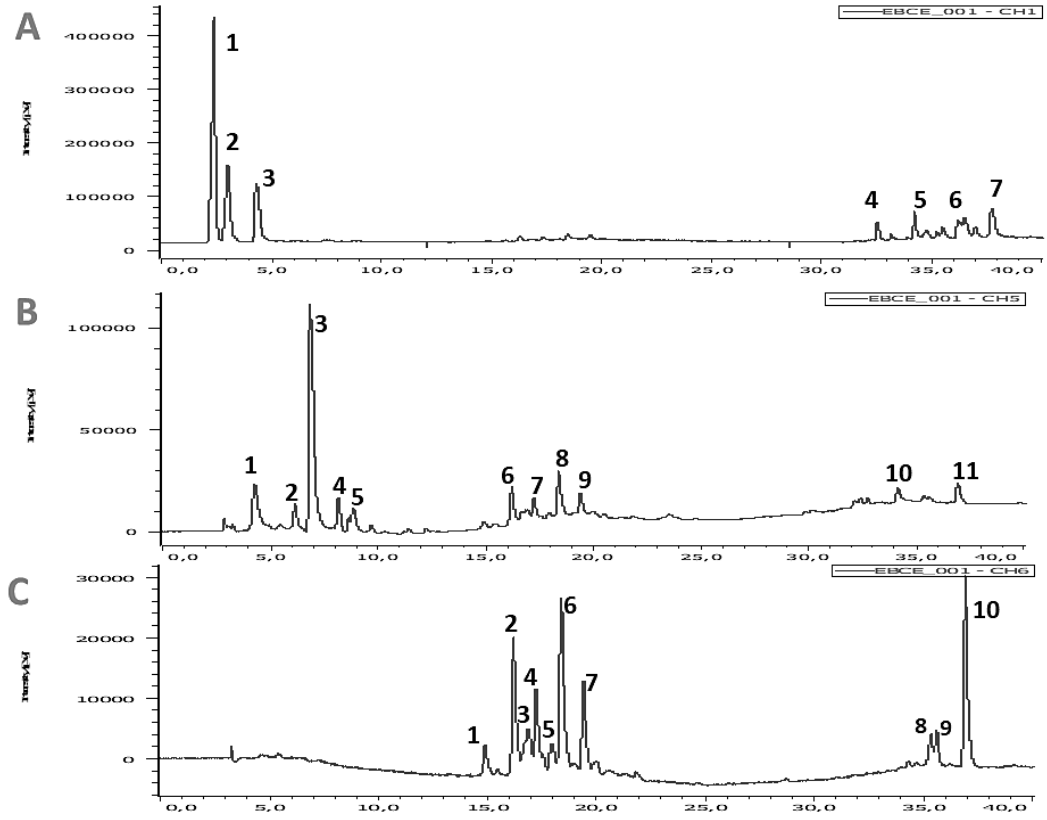
5.1 Caracterização química da *C. erecta*

5.1.1 Análise por Cromatografia Liquida: Detecção de Arranjo de Diodos (PDA) e Espalhamento de Luz Evaporativo (ELSD)

Enquanto o detector PDA identifica os compostos fenólicos por absorção no UV-VIS em comprimentos de onda conhecidos, o detector ELSD quantifica esses compostos indicado os componentes majoritários presentes na amostra.

Ao analisar os espectros A e B (Figura 9), virificou-se nos 10 minutos iniciais, a eluição de compostos de alta polaridade correspondente aos ácidos fenólicos presentes no extrato já confirmados por Trapp et al., (2016). Quanto aos picos que surgem na faixa de 15-20 min (espectros B e C) sugerem glicosídeos de média polaridade, e agliconas em 30-40 min (espectros A, B e C).

Figura 9 - Cromatogramas do EBCE em diferentes comprimentos de onda: (A) Detector ELS 210 – 600 nm; (B) Detector PDA 254 nm; (C) Detector PDA 360 nm



Fonte: do Próprio Autor (2020).

No estudo fitoquímico da *C.ereta*, Bezerra *et al.*, (2019) identificou a lactona do ácido sacarínico e o ácido chiquímico como principais constituintes das fases acetato de etila e hidroalcóolica, respectivamente. Diante disso, o cromatograma A (ELSD) apresentado na Figura 9 sugere os ácidos fenólicos como classe majoritária no EBCE, sobretudo o ácido chiquímico, precursor de metabólitos secundários como flavonoides, lignanos e alcaloides. Vale ressaltar que as porções ácidas contidas na amostra exercem influência antagônica na atividade antioxidante total do extrato, contudo não diminui seu potencial como possível candidata a fitofármaco.

5.1.2 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)

Os fragmentos iônicos obtidos por injeção direta no espectrômetro de massas (MS/MS) foram comparados com padrões disponíveis na literatura para elucidação dos compostos presentes na amostra. Diante disso, as informações foram organizadas na Tabela 1 com a massa molecular de cada espécie, seguida dos seus respectivos fragmentos e nomenclatura. Sendo assim, foi possível propor alguns derivados de apigenina, luteolina e quercetina na composição química do extrato a partir da fase acetato de etila devido esta apresentar maior contribuição de flavonoides.

Tabela 1 - Caracterização da fase acetato de etila do extrato hidroalcoólico da *C. erecta*.

(continua)

Nº	$[M-H]^-$	M	Fragmentos	Proposta de Identificação	Fórmula molecular	Referências
1	173	174	155; 111	Ácido Chiquímico	$C_7H_{10}O_5$	Nurazah et al., 2017
2	417	418	357; 327	Luteolina-6-*C*-arabinosídeo	$C_{20}H_{18}O_{10}$	Coutinho et al., 2016
3	447	448	427; 357; 327; 285	Luteolina-6-*C*-glucosídeo	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Marín et al., (2004)
4	463	464	373; 343; 301; 300	Quercetina-3-*O*-glucosídeo (Isoquercetrina)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Li et al., 2016; Ibrahima et al., 2015; Iswaldi et al., 2011
5	533	534	515; 473; 443; 425; 383; 353; 325	Apigenina - 6,8-di-*C*-pentosídeo	$C_{25}H_{25}O_{13}$	Geng et al., 2016; Gu et al., 2012; Qiu; zhang, 2019
6	549	550	531; 489; 459; 441; 429; 399; 369	Luteolina-6-*C*-Pentosil-8-*C*-pentosídeo	$C_{25}H_{26}O_{14}$	Roriz et al., 2014;

(continuação)

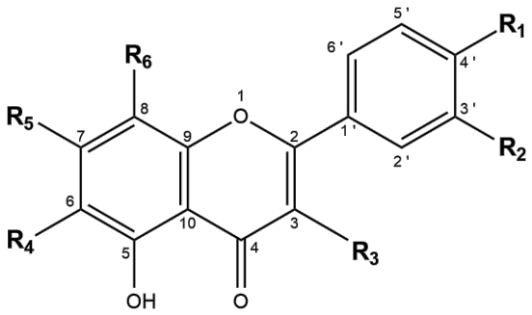
Nº	$[M-H]^-$	M	Fragmentos	Proposta de Identificação	Fórmula molecular	Referências
7	563	564	545; 473; 443; 425; 383; 353	Apigenina-6-*C*-arabinosil-8-*C*-glicosídeo	$C_{26}H_{27}O_{14}$	Coutinho et al., 2016; Zeraik et al., 2010
8	579	580	561; 519; 589; 459; 399; 369	Luteolina-6-*C*-pentosil-8-*C*-hexosil-	$C_{26}H_{28}O_{15}$	Geng et al., 2016
9	593	594	575, 503, 473, 383;353	Apigenina-6,8-di-*C*-β-glucopiranosil-(Vicenina-2)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Ibrahima et al., 2015; Martucci et al., 2014
10	609	610	**447**; 301	Quercetina-3-*O*-rhaminosil-7-*O*-glucosídeo	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Próprio Autor (2020)
11	609	610	447, **301**	Quercetina-3-*O*-Rutinosídeo (Rutina)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Sokkar et al., 2016
12	817	818	799; 691; 637; 545;	-	-	-

O composto nº 12 está em processo de elucidação.
Fonte: do próprio Autor (2020).

Nesse contexto, observou-se que os flavonoides *C*-glicosilados são majoritários na composição da *C. erecta*. Assim como em outras espécies vegetais essa subclasse de compostos aparece em maior quantidade em relação aos *O*-glicosídeos. Contudo, além do estudo fitoquímico, um dos propósitos deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante frente a estrutura atividade da espécie, para isso, levou-se em consideração todas as subclasses fenólicas contidas na amostra, que pudessem influenciar no antagonismo ou positivamente na eficácia sinergética do potencial antioxidante.

Os flavonoides foram principais compostos identificados na amostra. A Figura 10 apresenta os possíveis sítios de substituição para os glicosídeos propostos na Tabela 2, cuja identificação foi possível devido aos padrões de fragmentações de cada composto obtido nos espectros de massa da amostra.

Figura 10 – Estrutura Geral dos flavonoides com os principais sítios de substituição



Fonte: do próprio Autor (2020).

Tabela 2 – Grupos substituintes para os flavonoides propostos

Flavonoides	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
(2) Luteolina-6-*C*-Arabinosídeo	OH	OH	H	Arabinose	OH	H
(3) Luteolina-6-*C*-Glucosídeo	OH	OH	H	Glucose	OH	H
(4) Quercetina-3-*O*-glucosídeo (Isoquercetrina)	OH	OH	Glicosídeo	H	OH	H
(5) Apigenina-6,8-di-*C*-pentosídeo	OH	H	H	Xilose	OH	Xilose
(6) Luteolina-6,8-di-*C*-pentosídeo	OH	OH	H	Xilose	OH	Xilose
(7) Apigenina-6-*C*-arabinosil-8-*C*-glucosídeo	OH	H	H	Arabinose	OH	Glucose
(8) Luteolina-6-*C*-arabinosil-8-C-gluosídeo	OH	OH	H	Arabinose	OH	Glucose
(9) Luteolina-3-*C*-rhaminosil-7-*O*-glucosídeo	OH	OH	Ramnose	H	Glicose	H
(10) Quercetina-3-*O*-rhaminosil-7-*O*-glicosídeo	OH	OH	Ramnose	H	Glicose	H
(11) Quercetina-3-*O*-Rutinosídeo (Rutina)	OH	OH	Ramnose, Glicose	H	OH	H

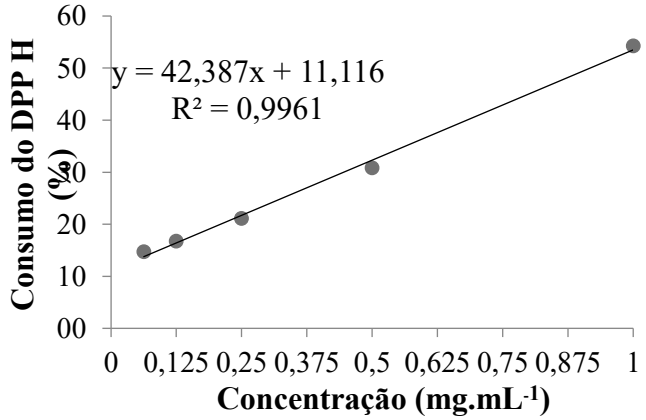
Fonte: Elaborada pelo Autor, (2020).

5.2 Ensaios Espectrofotométricos

5.2.1 Capacidade do EBCE reduzir o radical *DPPH* $^{\bullet}$

A Figura 11 mostra a correlação do percentual do consumo de radical DPPH$^{\bullet}$ *em* função das concentrações do extrato: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 (mg. mL^{-1}). Em resposta, o coeficiente $R^2 = 0,9961$ mostra uma boa correlação linear para os dados analisados.

Figura 11 – Consumo de radical DPPH em função das concentrações do EBCE



A partir dos resultados obtidos nos testes espectrofotométricos para a absorbância do radical, a atividade antioxidante do extrato bruto foi calculada e expressa pelos valores da concentração inibitória (CI_{50} - concentração de EBCE necessária para reduzir [DPPH$^{\bullet}$] inicial pela metade). Não obstante, os gráficos da Figura 12 apresentam o percentual do radical DPPH$^{\bullet}$ que sofreu redução ao reagir com diferentes concentrações do extrato (gráfico A) e com o padrão de quercetina (gráfico B).

Figura 12 – Gráficos para a determinação da capacidade do EBCE reduzir o radical DPPH•

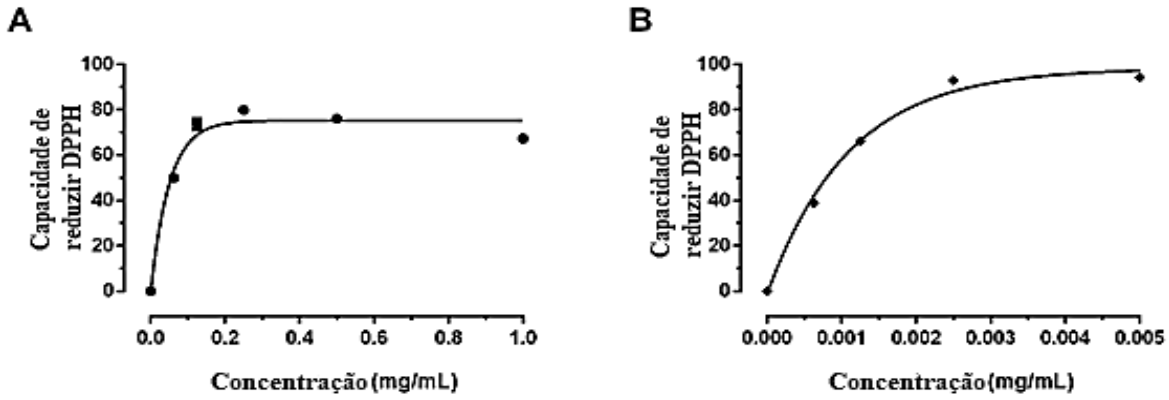


Figura 12-A: percentual de redução do radical DPPH• em função das concentrações do EBCE.
Figura 12-B: percentual de redução do radical DPPH• em função das concentrações de quercetina.
Fonte: do próprio Autor (2020).

Tabela 3 - Resultado do potencial antioxidante do extrato da *C. erecta*

Amostra	% redução DPPH[a]	IC_{50} (mg. mL^{-1})
EBCE	54,3 ± 2,37 (7,3%) *	0,07 ± 1,21 (6,4%)*

[a] Para a concentração de 1 mg. mL^{-1}. *Coeficiente de variação.

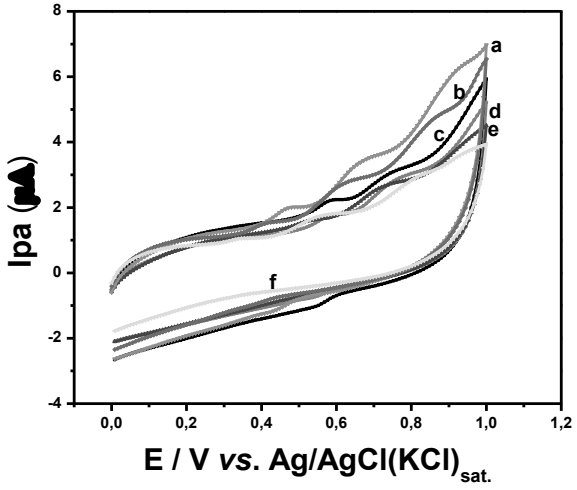
Silva, L. I. Da, (2015) obtiveram um CI_{50} de 0,07 mg. mL^{-1}, ou seja, três vezes maior do que o valor obtido neste trabalho, o que pode ser explicado pela variação circadiana e sazonal que influenciam diretamente no teor de metabólitos secundários de cada amostra. Em contra partida, Bezerra et al. (2019) aponta as fases acetato de etila e hidroetanólica como responsáveis pelo baixo percentual de redução do DPPH•, devido a presença dos ácidos fenólicos que atuam como pró-antioxidantes e inibem significativamente a capacidade antioxidante do extrato.

5.3 Ensaios voltamétricos para o EBCE

5.3.1 Estudo da influência do pH para o EBCE

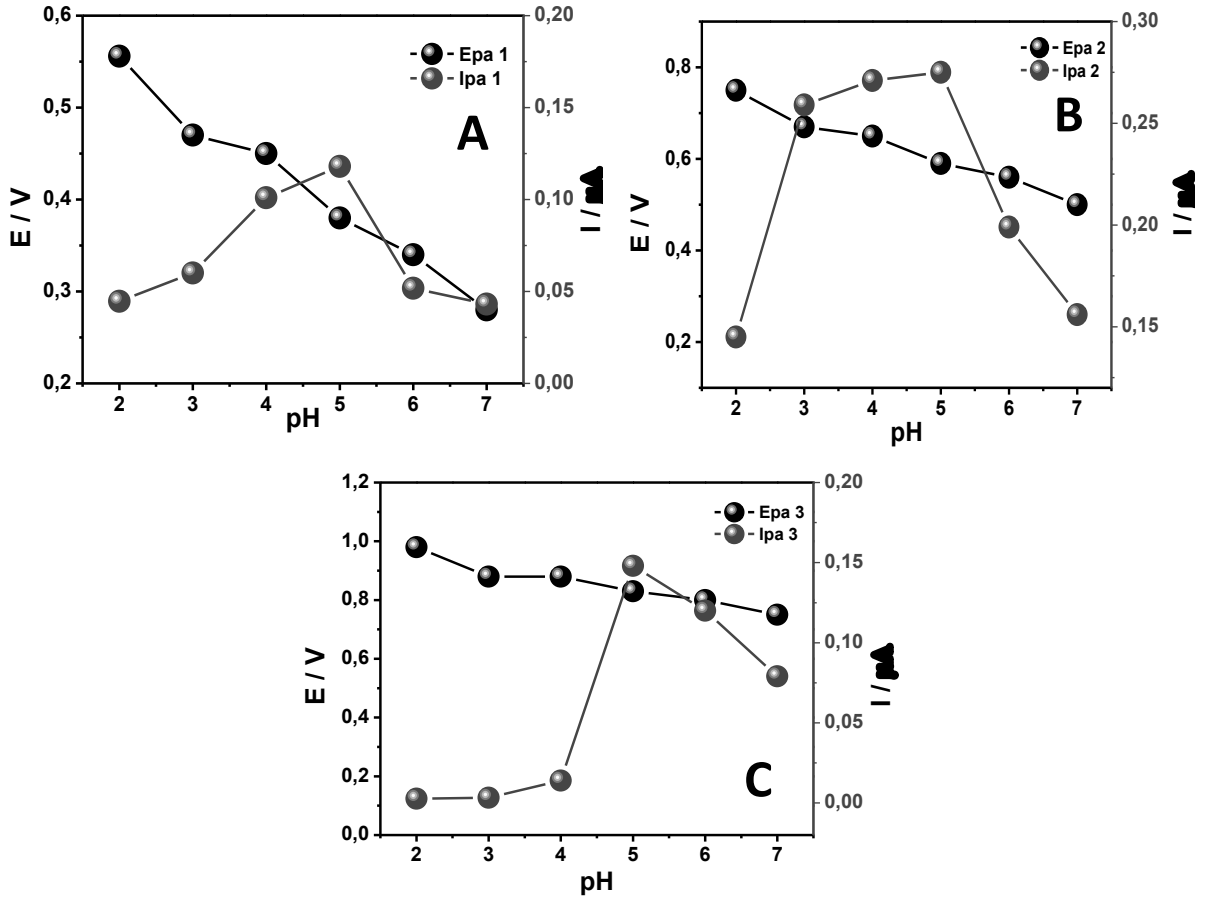
O estudo da influência do pH foi realizado em solução tampão Britton-Robinson 0,1 M com o auxílio da técnica de voltametria cíclica, cujo resultado mostrou que o extrato hidroalcóolico da *C. erecta* apresenta uma melhor resposta de Ipa em pH 5,0. Verificou-se também a presença de três processos de oxidação no primeiro voltamograma, indicando os diferentes potenciais de oxidação para os grupos fenólicos presentes na amostra (Figura 13).

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para o EBCE 1,0 (mg. mL^{-1}) em tampão Britton-Robinson 0,1 M sobre ECV à 100 $mV.s^{-1}$. (a) pH 2,0; (b) pH 3,0; (c) pH 4,0; (d) pH 5,0; (e) pH 6,0; (f) pH 7,0.



Foi avaliada uma faixa de pH 2,0-7,0. Essa delimitação ocorreu após a verificação da redução no valor de corrente de pico (Ipa) em função do aumento do pH, não sendo mais possível a leitura de sinal da corrente a partir do pH 8,0. Em contrapartida, em pH´s mais altos, há um deslocamento no Epa para valores mais baixos, o que implicaria em uma melhor resposta antioxidante (FILIPIAK, 2001; PIOVESAN, 2014). Essas variações podem ser observadas na figuras 14 (A, B e C).

Figura 14 - Influência do pH na magnitude das correntes de pico (Ip) e deslocamento de potencial (E) em tampão Britton-Robinson 0,1 M. (A): Ipa 1 x pH x Epa 1; (B): Ipa 2 x pH x Epa 2; Ipa 3 x pH x Epa 3.

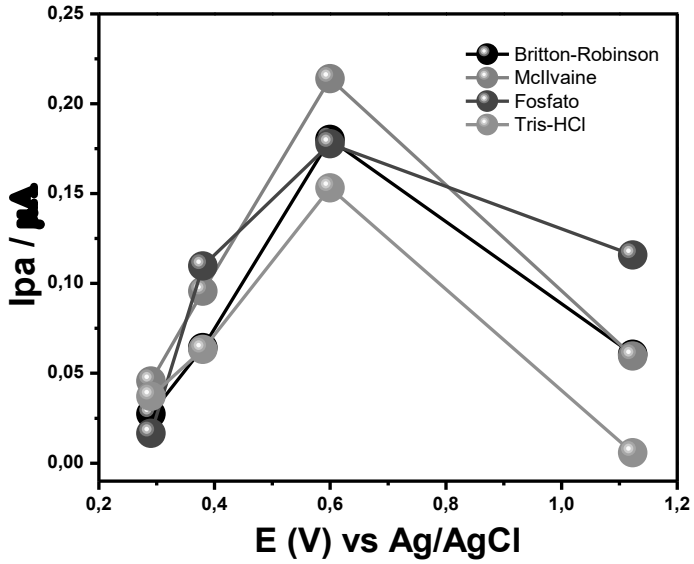


É o possível observar em cada caso acima, que os valores das Ipa (Ipa 1, Ipa 1 e Ipa 3) aumentam de forma diretamente proporcional ao pH, no entanto, após o pH 5,0, percebe-se um decréscimo na magnitude da Ipa nos três gráficos, isso ocorre devido uma redução de espécies desprotonadas em solução, uma vez que valores de pH´s mais elevados desfavorecem o processo de desprotonação de compostos fenólicos, ocasionando uma redução na taxa de transferência de elétrons.

5.3.2 Escolha do eletrólito de suporte para o EBCE

Para uma melhor escolha do eletrólito de suporte foi utilizada a técnica de voltametria cíclica a 100 $mV.s^{-1}$ com degraus de 5 mV, onde foi analisado o comportamento das Ipa frente a quatro eletrólitos tamponados em pH 5: Brinton-Robson, McIlvaine (Citrato-Fosfato), Fosfato e Tris-HCl. Na Figura 15 pode ser observado uma melhor resposta para o tampão McIlvaine, favorecendo a terceira Ipa.

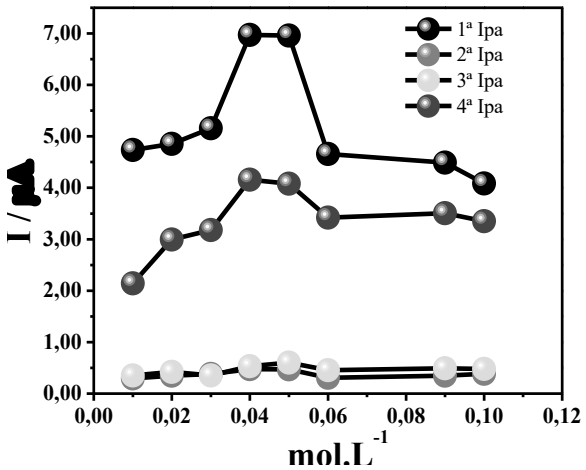
Figura 15 - 1ª, 2ª, 3ª e 4ª Ipa do EBCE em diferentes tampões



5.3.3 Determinação da concentração do eletrólito para o EBCE

A concentração do eletrólito McIlvaine foi otimizada em pH 5,0 com uma variação de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,08; 0,09 e 1,00 mol. L^{-1}. Na Figura 16 pode ser observado uma maior magnitude de corrente Ip para a concentração de 0,04 mol. L^{-1} nos quatro picos de oxidação do extrato.

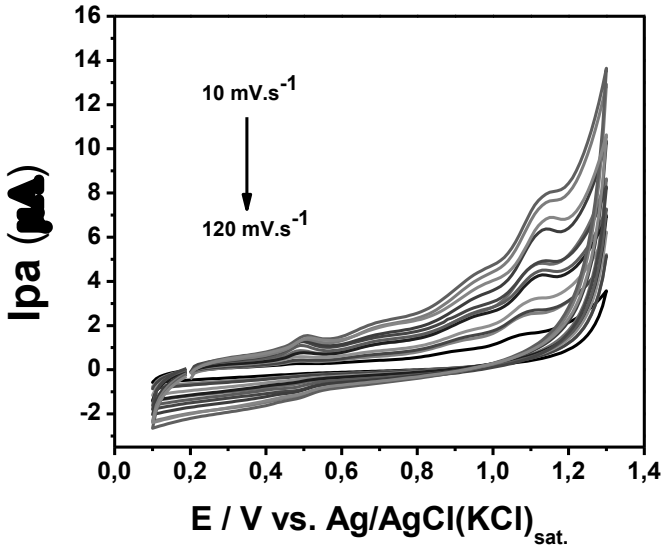
Figura 16 - Correntes de pico (Ipa) em função de diferentes concentrações (mol. L^{-1}) do eletrólito McIlvaine em pH 5,0.



5.3.4 Estudo de velocidade de varredura para o EBCE

A Figura 17 apresenta os resultados obtidos para a oxidação do extrato bruto da *C. erecta* sobre um eletrodo de carbono vítreo em meio de McIlvaine (0,04 M) à diferentes velocidades de varredura (20 – 120 mVs^{-1}). Os dados mostram um pico de corrente anódico em um potencial de 0,49 V vs Ag/AgCl. Em todos os experimentos de voltametria realizados, foi necessário realizar o polimento do eletrodo a fim de remover possíveis adsorbatos oriundos do processo de oxidação das moléculas contidas dentro do extrato.

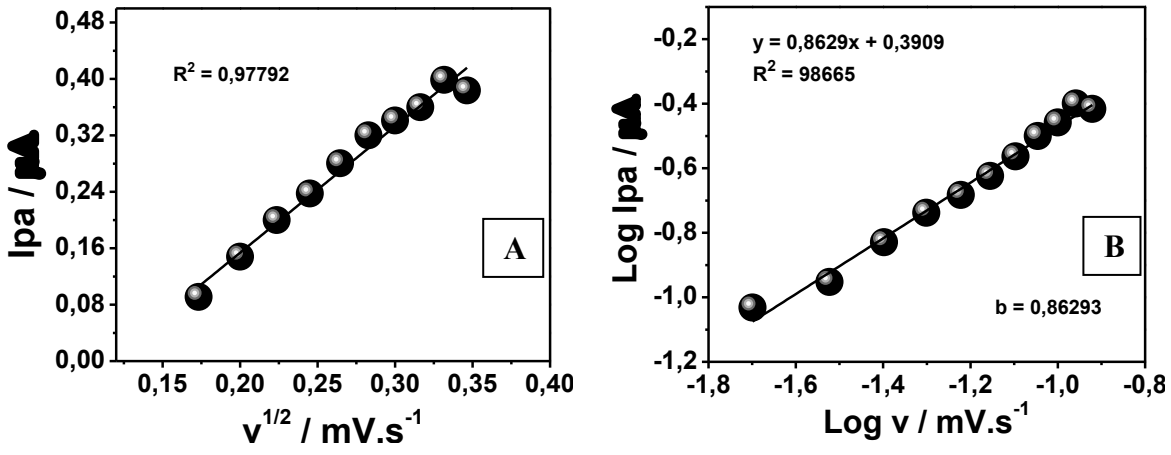
Figura 17 - Curvas voltamétricas obtidas para do Extrato de *C. erecta*



EBCE (1 $mg.mL^{-1}$) emmeio tamponado McIlvaine 0,04 M à diferentes velocidades de varredura (10 - 120 $mV.s^{-1}$) em ECV.

Para determinar se o processo de oxidação que ocorre na superfície do eletrodo em potencial de 0,49 V é adsortivo ou difusional (Figura 17), foi construído um gráfico corrente de pico anódico (Ip_a) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), e outro com o log da Ipa pelo log v. Os resultados podem ser observados nas Figura 18.

Figura 18 - Corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura (Ipa *v*s.$v^{1/2}$). Logaritmo da corrente de pico anódico pelo logaritmo da velocidade de varredura (log Ipa *v*s log v).



A Figura 18 (A) mostra uma correlação linear para Ipa e $v^{1/2}$, característico de um processo redox controlado por difusão enquanto que a Figura 18 (B) (log Ipa vs log v) apresenta uma inclinação (b) de 0,86293, revelando que oxidação do 1º pico anódico do EBCE é controlado tanto por difusão quanto por adsorção, pois o valor de inclinação obtido, está entre 0,5 (controlado por difusão) e 1,0 (controlado por adsorção) (SILVA; LOURENCAO; FATIBELLO-FILHO, 2015).

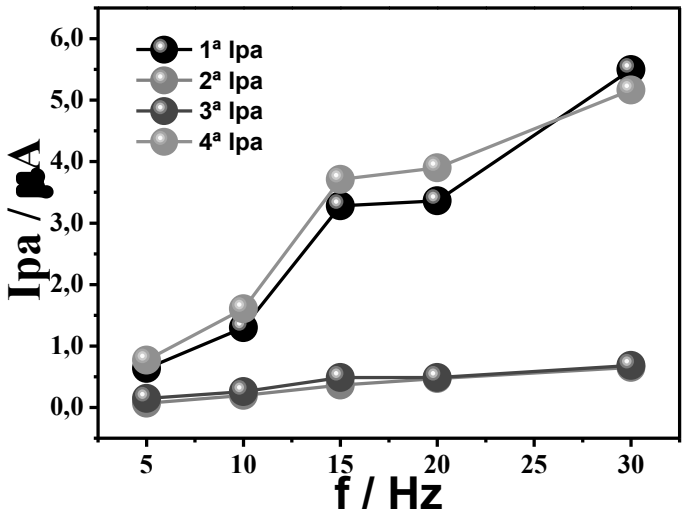
Por não se tratar de um sensor eletroquímico, já que não há especificidade molecular, uma das limitações para o eletrodo de carbono vítreo é o envenenamento por compostos fenólicos, logo não é possível realizar medidas consecutivas sem que haja perda de sinal analítico, pois o processo de passivação preenche os sítios ativos da superfície do eletrodo e consequentemente há uma queda de corrente de pico para medidas sucessivas.

Dessa forma, há um decaimento da reprodutibilidade de sinal analítico, por isso, neste trabalho, a capacidade antioxidante total foi avaliada usando o método de Índice Eletroquímico, por este não exigir a quantificação de um padrão na amostra e eliminar as diferenças unitárias para comparação literária.

5.3.5 Otimização da Técnica de Voltametria de Onda Quadrada para EBCE

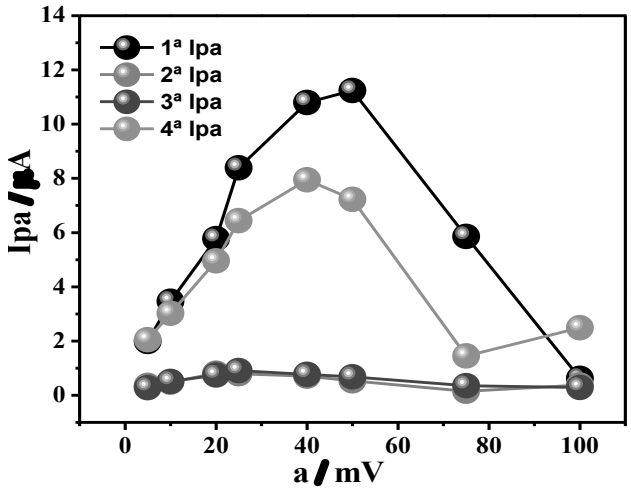
Para a otimização dos parâmetros em VOQ, foram considerados como critérios os maiores valores de corrente onde não houve perda de resolução do sinal. Dessa forma, a resolução dos quatro picos de oxidação e os valores mais altos de Ipa da primeira e quarta oxidação pertinente ao perfil do extrato, foram considerados como fatores limitantes para a otimização da técnica. Sendo assim, foi determinado a frequência (Hz) cuja variação foi de 5-30 Hz, onde o valor de amplitude foi fixado em 25 mV e o degrau em 10 mV, logo, observou-se uma perda de resolução para valores acima de 30 Hz, por isso a frequência otimizada foi 15 Hz, onde observou-se valores constantes nas correntes de pico, conforme mostrado Figura 19.

Figura 19 - Valores de Ipa Vs f (Hz) para os quatro picos de oxidação do EBCE



Uma vez fixada a frequência, variou-se a amplitude de 5 - 100 mV, conforme mostrado na Figura 20**,** cujo gráfico mostra uma redução da primeira e segunda Ipa a partir de 50 mV e 40 mV respectivamente. Com base nesses dados, a amplitude escolhida foi de 40 mV, cujos valores Ipa para o 1º e 4º processos de oxidação foram relativamente mais altos.

Figura 20 - Gráfico da otimização da amplitude: a Vs Ipa.



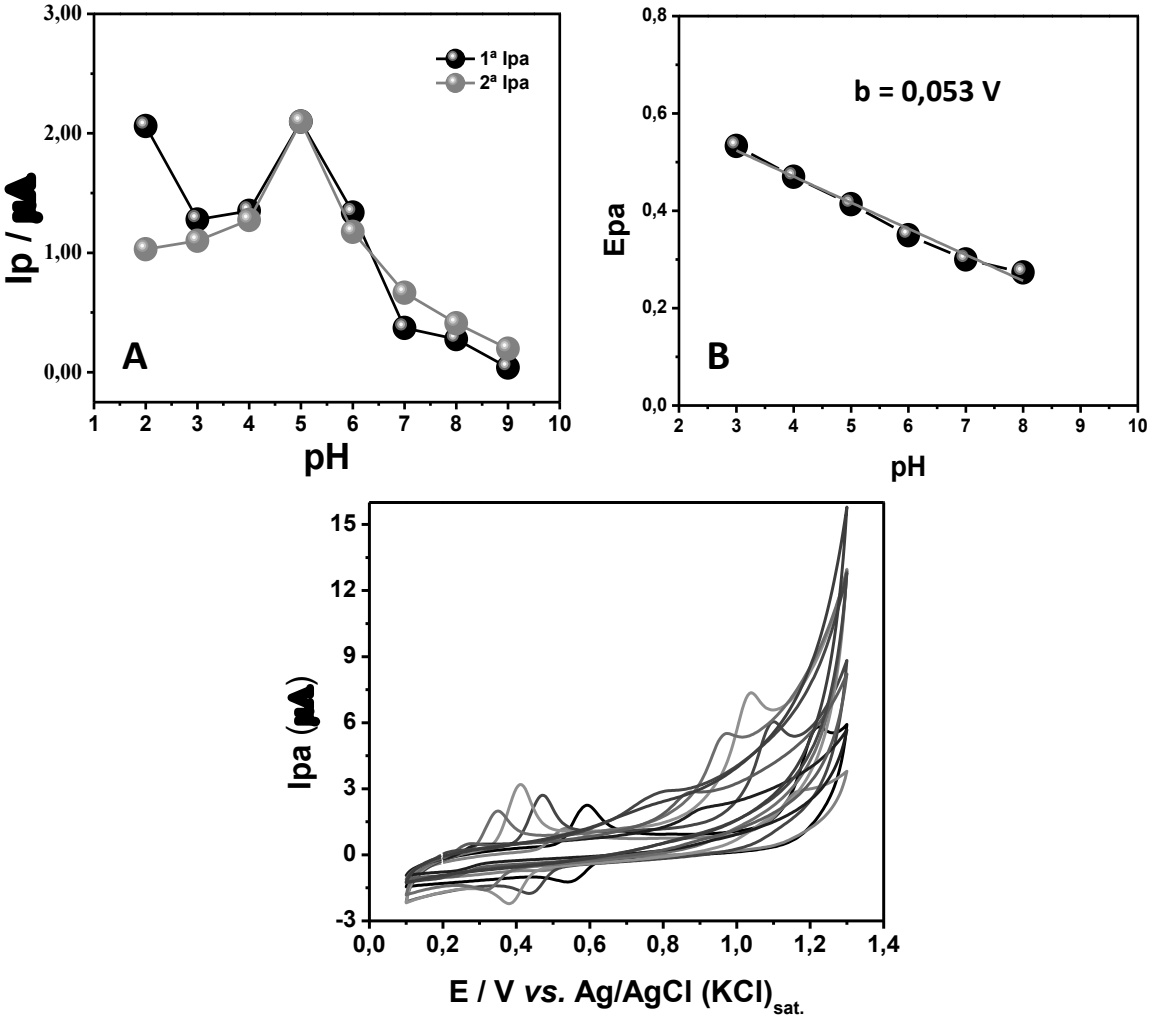
5.4 Ensaios voltamétricos para a rutina

Dentre os compostos fenólicos presentes na espécie, a rutina foi escolhida como composto modelo no estudo da relação estrutura atividade (SARS) dos flavonoides propostos na amostra. Para isso, foram otimizados os parâmetros eletroquímicos a fim de verificar o comportamento da espécie frente as condições já otimizadas para o EBCE. Dessa forma, para o estudo da atividade antioxidante total do extrato levou-se consideração todos os picos anódicos, de forma análoga, foram considerados os dois picos de oxidação da rutina.

5.4.1 Influência do pH no comportamento eletroquímico da Rutina

Os resultados obtidos para rutina foram semelhantes aos já determinados para o extrato, logo pode-se observar na Figura 21 que após atingir o pH 5,0 em tampão McIlvaine, a magnitude da Ipa decresce. Outro ponto importante, é o deslocamento de Epa inversamente proporcional ao aumento de pH, pois, embora baixos valores de potencias favoreçam o processo de oxidação, o sinal analítico equivalente a Ipa diminui. Os parâmetros foram otimizados para melhores respostas de Ipa para a rutina. Vale ressaltar que, em todos as otimizações foram consideradas as duas correntes de pico anódicas, para cálculo do potencial antioxidante total da rutina.

Figura 21 - (A) Dependência do pH em função da Ipa em tampão BR 0,1 M à 100 $mV.s^{-1}$. (B): Relação Epa em função do pH; (C): Voltamogramas oriundos do estudo de pH (2,0 - 9,0).

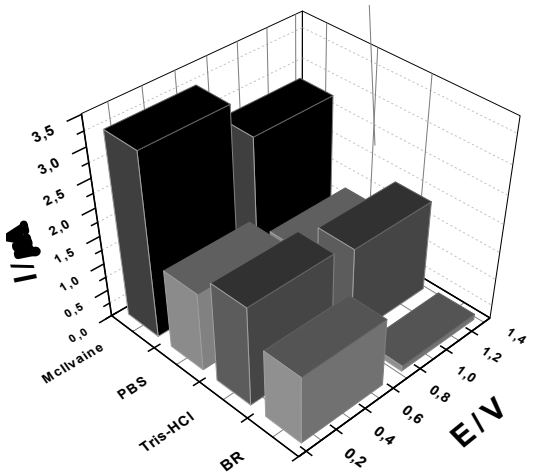


A Figura 21-b mostra uma inclinação (b) no valor de 53 mV para a relação pH vs Epa, indicando que as reações de oxidação para o primeiro pico anódico da rutina possuem o número de elétrons igual ao número de prótons, semelhante a outros compostos fenólicos. Não obstante, na Figura 21-c, é possível notar um deslocamento de potencial a partir dos picos de oxidação da amostra.

5.4.2 Escolha do eletrólito de suporte com melhor sinal analítico para a rutina

Após a determinação do pH 5,0, foi verificado em qual eletrólito de suporte a rutina apresentou melhor valor de Ipa. Sendo assim, os eletrólitos testados foram os mesmos usados para a amostra do EBCE (McIlvaine, PBS, Tris-HCl e BR), de modo análogo, o tampão McIlvaine se sobressaiu dos demais, provocando um aumento Ipa (Figura 22).

Figura 22 - Análise da magnitude das correntes em pH 5,0, nos tampões: McIlvaine, PBS, Tris-HCl e BR



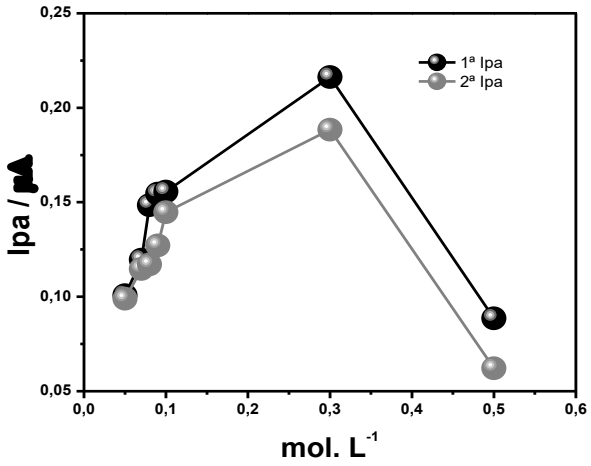
McIlvaine( ), PBS ( ), Tris-HCl ( ) e BR ( ) à 0,1 M à 100 $mV.s^{-1}$ pela técnica de Voltametria Cíclica.

5.4.3 Determinação da concentração do eletrólito de suporte

As concentrações analisadas foram dentro da faixa de 0,01-0,5 M de tampão McIlvaine em pH 5,0, parâmetros já otimizados anteriormente para o EBCE. Nesse estudo, obteve-se um melhor valor de Ipa na concentração de 0,3 M (

Figura 23), contudo, para os testes de comparação com a amostra, utilizou-se a mesma concentração do EBCE.

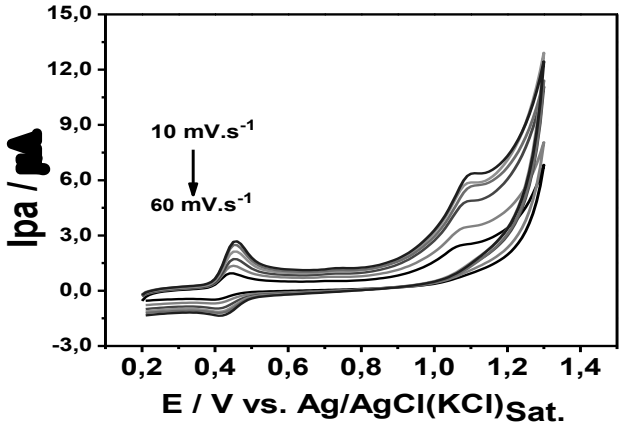
Figura 23 – Determinação da concentração de maior valor de Ipa para a rutina



5.4.4 Estudo da velocidade de varredura da Rutina

Para a investigação dos processos que controlam a reação redox da rutina na superfície do ECV, foi realizado o estudo de velocidade de varredura onde utilizou-se a técnica de VC cuja faixa analisada foi de 10-60 ($mV.s^{-1}$), em solução tamponada McIlvaine 0,3 M e pH 5,0. A partir dos voltamogramas obtidos (Figura 24), pode ser notado uma dependência de Ipa com a velocidade de varredura.

Figura 24 – Estudo de velocidade de varredura para a rutina

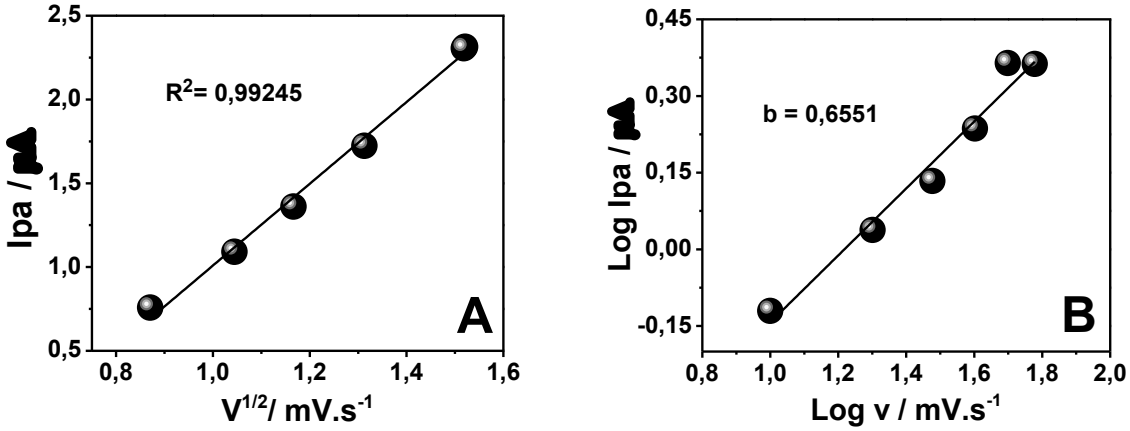


Estudo de velocidade em EC; v = 10-60($mV.s^{-1}$) para rutina 10 μM em tampão McIlvaine 0,3 M.

A partir desses dos dados extraídos da aplicação voltamétrica, verificou-se um comportamento linear (R^2 = 0,99245) para a primeira corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Ipa x $v^{1/2}$) (Figura 25-a). Esse comportamento caracteriza

um processo de transporte de massa controlado por difusão, o que pode ser confirmado pelo gráfico do logaritmo da corrente de pico (log Ipa) pelo logaritmo da velocidade (log v) (Figura 25-b) que apresenta uma inclinação (b) igual à 0,6551 (mV), ou seja, próximo de valor 0,5 mV característico de processo difusional, de acordo com a literatura (SILVA; LOURENCAO; FATIBELLO-FILHO, 2015).

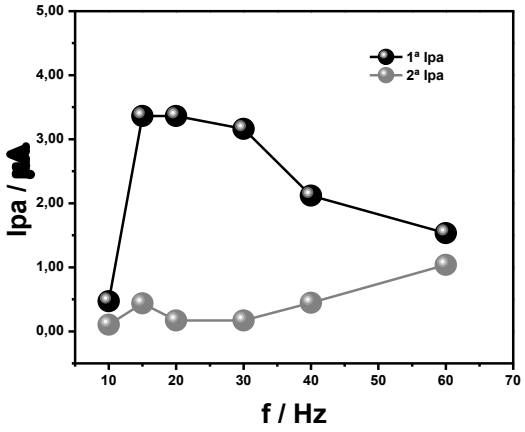
Figura 25 – (A): Gráfico Ipa vs. $V^{1/2}$; (B): Gráfico Log v vs. Log Ipa.



5.4.5 Otimização da técnica de voltametria de onda quadrada

A técnica de Voltametria de Onda Quadrada foi escolhida de acordo com os parâmetros estabelecidos para o extrato, sendo esta, uma técnica de maior sensibilidade, frente a voltametria cíclica. Para a otimização da frequência (f), foram testados valores de 10-60 (Hz), dos quais o 15 Hz foi o que apresentou melhor sinal de pico, sendo observado uma redução da primeira corrente de pico (1ª Ipa) a partir de 20 Hz (Figura 26).

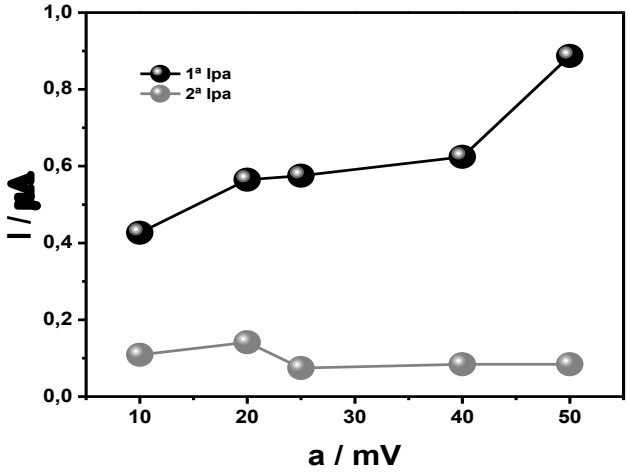
Figura 26 - Valores de Ipa Vs f (Hz) para a Rutina



Uma vez, fixado a frequência, foi determinado a melhor amplitude de pulso (a), cuja variação testada foi de 10-50 (mV). No entanto, embora tenha sido observado um aumento de corrente de pico à medida que havia um acréscimo no valor de amplitude (a), (

Figura 27), também houve um aumento de ruído nos voltamogramas. Logo, optou-se por um valor mais estável de 25 (mV).

Figura 27 - Dependência da Ipa (μA) no processo de oxidação da rutina em função da variaçãode a (mV).



5.6 Capacidade antioxidante via índice eletroquímico (IE)

A capacidade antioxidante total do extrato foi calculada pelo índice eletroquímico (IE), método proposto por F.M.A. Lino et al., (2014) e adaptado por Leite et al., (2018), cuja a relação é definida pela equação .

$$\mathrm{IE} = \frac{Ipa1}{Epa1} + \frac{Ipa2}{Epa2} + \frac{Ipa3}{Epa3} + \frac{Ipa4}{Epa4} \qquad (2)$$

Onde a corrente de pico (parâmetro cinético) é correlacionada com o potencial de pico (parâmetro termodinâmico). Logo, quanto maior o valor numérico do IE, maior a capacidade antioxidante atribuída à amostra analisada. Nesse sentido, os resultados obtidos para as duas técnicas aplicadas (VC e VOQ) podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de índice eletroquímico do EBCE para as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada

	Técnica	Ipa/Epa(1)	Ipa/Epa(2)	Ipa/Epa(3)	Ipa/Epa(4)	IE (µA/V)
EBCE	VOQ	7,1082	0,5944	0,32592	2,70635	10,73 ± 2,72
	VC	0,9658	0,2603	0,17794	1,46484	2,87 ± 0,52
Rutina	VOQ	7,0704	0,1721	-	-	7,24 ± 0,36
	VC	2,1149	1,3968	-	-	3,51 ± 0,42

A relação dos resultados obtidos para a técnica de VOQ em ambos os casos mostra uma atividade antioxidante superior à VC, isso acontece devido os valores de Ipa serem mais altos na técnica de VOQ, graças à não interferência da corrente capacitiva, outro ponto em destaque é um leve deslocamento nos potenciais de oxidação pois, foi observado que: Epa (VOQ) < Epa (VC), isso pode ser explicado à uma maior resistividade do sistema eletrolítico para a técnica de VC. Com base nesses resultados, a técnica de VOQ mostrou-se mais indicada para a determinação da capacidade antioxidante via índice eletroquímico.

Dessa forma, pode-se inferir que apesar de IE (EBCE) > IE (Rutina), o EBCE pode ser considerado moderado, devido aos sinergismos e antagonismos de todos os compostos contidos no extrato. Por outro lado, o EBCE apresentou boa atividade antioxidante frente aos resultados obtidos por Leite et al., (2018), como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antioxidante via índice eletroquímico (IE) de 10 extratos de plantas

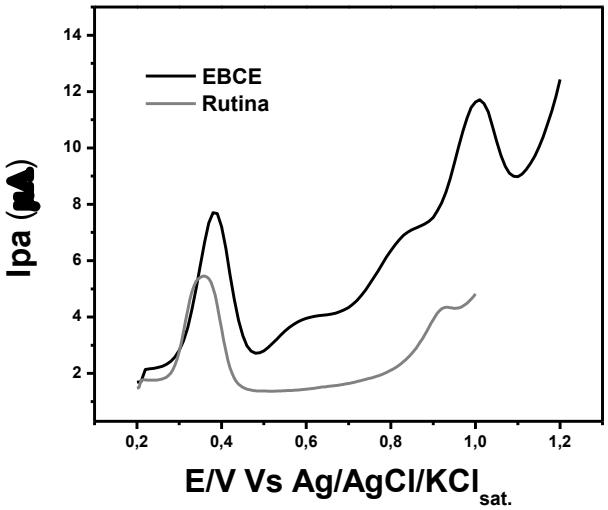
Extratos	EI ± SD (µA/V)
Hypericum perforatum	**24.66 ± 0.08**
Rosmarinus officinalis	**19.29 ± 0.23**
Vaccinium macrocarpon	**7.89 ± 0.07**
Morinda citrifolia	**7.74 ± 0.11**
Trifolium pretense	**7.58 ± 0.04**
Ginkgo biloba	**7.54 ± 0.03**
Centella asiatica	**4.69 ± 0.08**
Camellia sinensis	**3.76 ± 0.03**
Crataegus oxyacantha	**0.68 ± 0.05**
Aesculos hippocastanum	**0.35 ± 0.10**

Fonte: Leite et al., (2018).

Os mesmos avaliaram dez extratos de plantas diferentes, dos quais oito apresentaram IE menor do que EBCE, sendo o mais próximo 7.58 ± 0.04 (Vaccinium macrocarpon), em contra partida as outras duas mostraram valores expressivos, 24.66 ± 0.08 (Ginkgo biloba) e 19.29 ± 0.23 (Hypericum perforatum). Vale ressaltar que os valores utilizados foram obtidos por VOQ.

Para a compreensão da influência dos compostos flavonoides na amostra, os voltamogramas do extrato e da rutina foram sobrepostos para uma comparação dos potenciais de oxidação (Figura 28). Vale ressaltar, que todas as substâncias propostas, com exceção dos derivados de apigenina e ácidos fenólicos, possuem em sua estrutura o grupo catecol, logo, é aceitável que apresentem valores aproximados de potenciais de oxidação.

Figura 28 - Voltamogramas do extrato da *C. erecta* e rutina



Voltamograma obtido pela técnica de voltametria de Onda Quadrada para a oxidação do EBCE e da Rutina em tampão McIlvaine 0,3 M, pH 5,0 em eletrodo de carbono vítreo; f = 15 Hz e, a = 25 mV.

Os valores de potenciais de pico anódico (Epa) do extrato foram: 0,38; 0,59; 0;84; 1,00 V, enquanto que para a rutina, foram 0,35 e 0,92 V respectivamente. Nesse contexto, é notável que os potenciais de oxidação da rutina, 1º e 2º, são bem próximos do 1º e 3º potenciais de oxidação do extrato, o que indica a região aproximada de oxidação dos flavonoides no extrato.

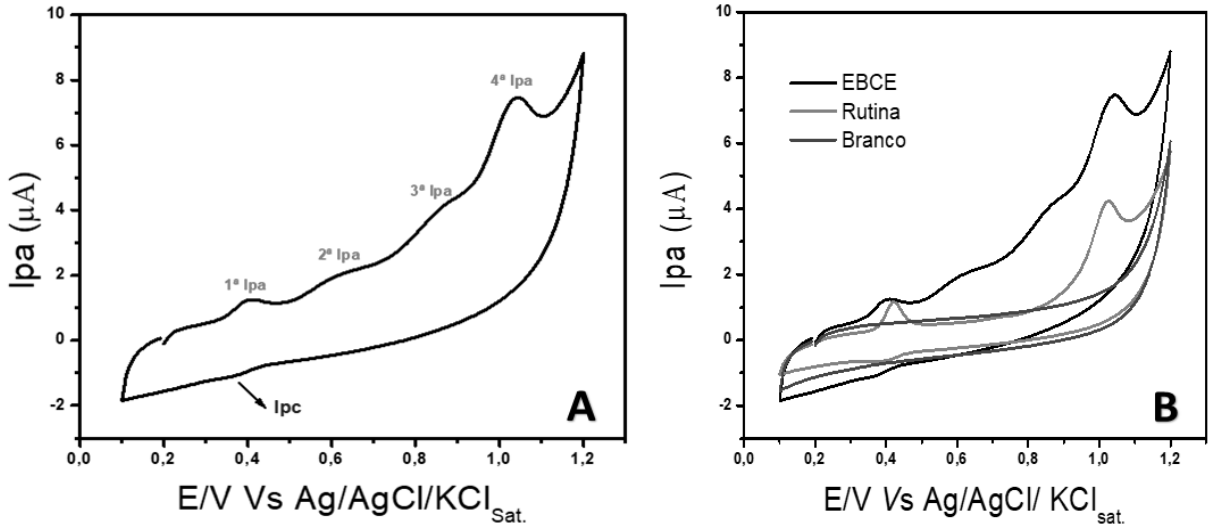
Segundo SIMIĆ et al., (2007) um potencial de pico anódico na faixa de 0,25 V – 0,45 V, indica uma atividade antioxidante moderada em relação aos compostos fenólicos, sendo assim, quanto mais negativo esse valor de potencial, melhor comportamento antioxidante para o extrato. Por outro lado, valores de potencial observados acima de 0,45 V o extrato apresentaria um comportamento pró-oxidante. Deste modo, quanto menor for o potencial aplicado para

oxidar as substâncias presentes na solução, maior será a espontaneidade do processo para doar elétrons, tornando sua capacidade redutora mais eficaz.

5.7 Relação estrutura-atividade antioxidante da rutina com o potencial antioxidante total do EBCE

A elucidação proposta para os compostos presentes no EBCE, como já mencionado, mostra o grupo catecol como principal sítio de oxidação nos flavonoides, o que sinaliza o primeiro processo de oxirredução. Não obstante, algo semelhante acontece com o extrato na mesma região de oxirredução da rutina, o que aponta para a reversibilidade dos flavonoides presentes na amostra (Figura 29-a). Nesse contexto, a diferença de potencial entre os pares redox (ΔE = Epa – Epc) para a rutina é 0,03 V, o que caracteriza a reversibilidade do sistema em relação a sua primeira oxidação.

Figura 29 – (A): Processos redox para o EBCE; (B): Processo redox para rutina sob as mesmas condições do EBCE



Voltamogramas cíclicos dos processos de oxidação e redução dos: EBCE 1 mg.ml^{-1} (**A**); EBCE1 mg.ml^{-1} e Rutina 10 μM vs Branco (**B**);1º, 2º, 3º e 4º (Ipa) processos de oxidação do EBCE e o processo de redução (Ipc) corresponde ao primeiro pico anódico (1ª Ipa); Tampão McIlvaine 0,3 M, V= 100 mV.s^{-1} Step = 10 mV.

Entretanto, para uma correlação (SARS), é necessário considerar os padrões de hidroxilação, uma vez que foram constatados que a substituição do tipo 3′, 4′, 5′- trihidroxi e, 3′, 4′- dihidroxi são mais facilmente oxidáveis em relação ao tipo 1′, 3′, 5′- hidroxi, dessa forma, é compreensível a reversibilidade de todos os flavonoides contidos no EBCE. (HENDRICKSON; KAUFMAN; LUNTE, 1994).

Além disso, a quantidade de hidroxilas e suas respectivas posições nos anéis aromáticos influenciam diretamente na capacidade dos polifenois doarem elétrons, assim como a concentração dos compostos presentes na amostra e pH do meio (ISMAIL et al., 2018). Nesse contexto, foi constatado que em ambos os estudos de pH (EBCE e rutina), houve um decréscimo do valor do pico de corrente anódica (Ipa) a partir do pH 6,0.

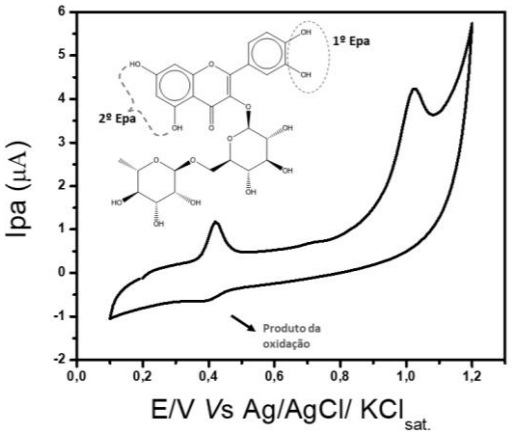
Isso acontece devido uma redução na concentração das espécies presentes na solução em suas formas protonadas, pois a medida que o pH aumenta, há um deslocamento de potencial para valores menores, o que favorece a oxidação dos compostos fenólicos e consequentemente a atividade antioxidante, no entanto, com o aumento do pH, menor será a concentração de espécies protonadas capazes de fornecer elétrons para a superfície do eletrodo, logo, menor será a resposta da Ipa.

De acordo com Zielińska e Zieliński (2011), os flavonoides possuem o primeiro potencial de oxidação numa faixa de 0,1 - 0,8 V, o que pode estar associado à capacidade antioxidante total do extrato da *C. erecta*, cujo potencial de pico anódico foi 0,42 V na técnica de VC. Com base nisso, na caracterização química observou-se a presença de compostos fenólicos *C*-glicosilados, semelhante aos resultados encontrados por Trapp et al., (2016) e Bezerra et al., (2019), que de acordo com Wen et al., (2017), a *C*-glicolação favorece o potencial antioxidante desses compostos frente aos radicais DPPH e hidroxila.

Em contra partida, os *O*-glicosilados, bem como a quantidade e posição da glicosilação, desfavorecem o potencial antioxidante dos flavonoides (WEN et al., 2017). Para o EBCE foram identificados três *O*-glicosídeos na amostra, sendo eles os compostos 4, 10 e 11 da tabela 2, isoquercetrina, rutina e o isômero da rutina: quercetina-3-*O*-rhaminosil-7-*O*-glucosídeo. Contudo, não se pode chegar uma conclusão da influência desses compostos, na atividade antioxidante total do EBCE.

De acordo com Ghica e Brett (2004), a rutina sofre dois processos de oxidação: o primeiro é reversível, e gera um produto de oxidação (3', 4'-diquinona) que reduz em potencial ligeiramente inferior ao Epa; o segundo é irreversível, oriundo da oxidação do grupo 5, 7-hidroxil do anel A (Figura 30). De modo análogo, o Epc da amostra sugere a redução dos produtos de oxidação do EBCE, enquanto o 2º e 3º Epa correspondem à oxidação de outros grupos fenólicos e potenciais 0,61 e 0,86 V respectivamente. A oxidação em potenciais menores que 1,0 V é o principal fator a caracterizar os flavonoides como candidatos antioxidantes frente ao radical peroxila cuja oxidação ocorre em 1,0 V (HENDRICKSON; KAUFMAN; LUNTE, 1994; LIU et al., 2008).

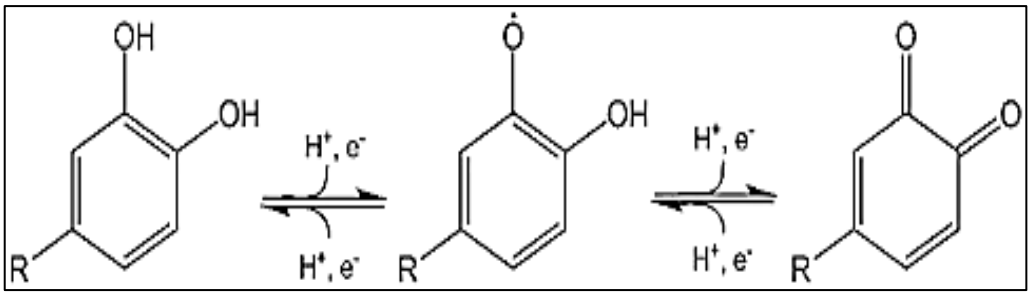
Figura 30 - Representação dos sítios de oxidação da rutina correspondentes ao 1º e 2º pico de peroxida oxidação no anel B e A.



Voltamograma cíclico e esquema dos sítios de oxidação da rutina 100 μM correspondentes a primeiro potencial de oxidação; Tampão McIlvaine 0,3 M, V= 100 mV.s^{-1} Ster = 10 mV, faixa de potencial de 0,1-1,2 V.

Um fator importante na eletroquímica da rutina é a oxidação dos substituintes 3′, 4′- de hidróxidos no anel B os quais adsorvem na superfície do eletrodo, característica pertinente aos fenóis, responsável pela passivação dos sítios ativos do eletrodo conforme investigado por Kang et al., (2002). Nesse contexto, Ghica & Brett (2005) também destacaram que o primeiro sítio de oxidação da rutina envolve dois elétrons e dois prótons (Figura 31) seguido da oxidação irreversível do grupo 5, 7- dihidroxila correspondente ao 2ª Epa, sendo um total de quatro hidroxilas oxidáveis.

Figura 31 – Oxidação dos substituintes 3′, 4′- de hidróxidos do anel B (catecol), correspondente ao primeiro sítio de oxidação da rutina e os demais flavonoides



Fonte: Ghica & Brett (2005).

Nas condições propostas para a rutina, também foi possível calcular o número de elétrons (*n*) envolvidos na reação, conforme a equação 2:

$$\Delta E\mathrm{p} = |E\mathrm{pa} - E\mathrm{pc}| = 0{,}059/n \qquad (2)$$

Uma vez calculado ΔEp = 0,02mV, temos: n = 0,059 / 0,03;
Logo, n = 1,9666 ≈ 2,0 *e*.

O que implica na transferência de 2 elétrons e 2 prótons na oxirredução da rutina. Sendo assim, compreende-se oxidação incompleta do segundo sítio de oxidação da molécula, sugerindo que a substituinte hidroxila na posição 7′ permanece estável. Nesse sentido, é possível traçar uma analogia com os outros compostos do EBCE, pois apresentam características estruturais semelhantes à da rutina, promovendo o perfil voltamétrico observado.

6 CONCLUSÕES

Com base nos critérios avaliados, as técnicas eletroanalíticas de VC e VOQ apresentaram simplicidade e eficácia na determinação da capacidade antioxidante total de extratos de plantas via Índice Eletroquímico. Além disso, *C. erecta* mostrou-se uma ótima candidata à fonte de metabolitos secundários, em especial flavonoides, para aplicações em fitofármacos.

Outro ponto a considerar, trata-se da influência do pH na relação estrutura-atividade antioxidante, uma vez que os parâmetros eletroanalíticos foram otimizados para condições de melhor sinal analítico, não foi levado em consideração o pH biológico. Sendo assim, os resultados obtidos, são aceitáveis no ponto de vista eletroanalítico da estrutura-atividade dos compostos propostos, nos quais os *C*-glicosilados além de serem maioritários na composição química do extrato, também conferem maior capacidade antioxidante frente aos *O*-glicosídeos.

Ressalta-se também que devido à complexidade da matriz analisada, alguns fatores intrínsecos à uma compreensão sistêmica da atividade antioxidante e os potenciais de oxidação, não poderam ser avaliados, são: I) Os processos de oxidação de outras classes de compostos não identificados no vegetal; II) A influência desses compostos nos potenciais REDOX das substâncias propostas; III) Os produtos de oxidação das espécies.

Por fim, nesse estudo foi investigado especificamente a relação estrutura atividade da rutina (como molécula modelo dos flavonoides propostos) com a atividade antioxidante total do EBCE. Dessa forma, os resultados apresentam um aspecto teórico e qualitativo, não sendo possível um aprofundamento dos processos eletroquímicos, devido às limitações de padrões específicos para cada substância proposta e o tempo de obtenção de cada substância por isolamento em coluna cromatográfica.

REFERÊNCIAS

ABD EL-HAMID, H. A.; EL BOUS, M. M. The Invasive Species Commelina Benghalensis L .: A Step Towards The Biological Flora of Egypt. **Catrina**, [s. l.], v. 18, p. 7–23, 2019.

AHAMED, K. R. et al. Electrochemical characterization of catechol-dimethylamine adduct at different pH values. **Portugaliae Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 51–70, 2019.

AHMAD, M. H. et al. Design and synthesis of sulfur-containing butylated hydroxytoluene: antioxidant potency and selective anticancer agent. **Journal of Chemical Sciences**, [s. l.], v. 131, n. 10, 2019.

AIGBEDION-ATALOR, P. O. Weed or not a weed? Density, perceptions and management of Chromolaena odorata (Asteraceae) in West Africa: Voices from Ghana. **Weed Research**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 406–414, 2020.

AKUTAM, A. et al. Phytoremediation potential of indigenous ghanaian grass and grass-like species grown on used motor oil contaminated soils. **Journal of Ecology and Environment**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 41–51, 2014.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. **Free Radical Biology and Medicine**, STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USA, v. 100, p. 81–85, 2016.

ARTEAGA, J. F. et al. Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 5126–5138, 2012.

ASADI-SAMANI, M. et al. A screening of anti-breast cancer effects and antioxidant activity of twenty medicinal plants gathered from Chaharmahal va Bakhtyari province, Iran. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 213–222, 2019.

BAAN, R. et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The lancet oncology**, STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USA, v. 8, n. 4, p. 292–293, 2007.

BALDAUF, C. et al. "Ferveu, queimou o ser da erva": Conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 282–291, 2009.

BARRAZA-GARZA, G. et al. Antioxidant effect of phenolic compounds (PC) at different concentrations in IEC-6 cells: A spectroscopic analysis. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 227, p. 1–8, 2020.

BATALOVA, V.; NABOKOVA, E.; REGER, A. Assessing antioxidant activity of tea extracts and some of chemicals using voltammetry and potentiometry. **AIP Conference Proceedings**, [s. l.], v. 1772, 2016.

BEZERRA, J. A. et al. Phytochemical Study and Antioxidant Evaluation of Commelina erecta (Commelinaceae) Stems. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 255–263, 2019. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=1021&nomeArquivo=v11n1a18.pdf>

BONETTI, L. P.; DAMBROZ, A. P. B.; TOLENTINO, S. As plantas nem sempre apenas daninhas. In: AS PLANTAS FANERÓGAMAS 2017, **Anais**... [s.l: s.n.]

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BUKMAN, L. et al. DPPH Assay Adapted to the FIA System for the Determination of the Antioxidant Capacity of Wines: Optimization of the Conditions Using the Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 1424–1432, 2013.

CAI, Y. Z. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 25, p. 2872–2888, 2006.

CERDEIRAS, M. P.; PIANZZOLA, M. J.; VÁZQUEZ, A. The antibacterial activity of Commelina erecta extracts [2]. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 423–424, 2001.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHACON TORRES, A. **Agentes Oxidantes E Antioxidantes**. [s.l: s.n.]

CHENG, A. J. et al. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. **Journal of Physiology - London**, 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA, v. 594, n. 18, p. 5149–5160, 2016.

CHIMEZIE, E. **Phytochemical study on Commelina diffusa burn (1)**. 2018.

CHO, E. et al. Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies. In: ANNALS OF INTERNAL MEDICINE 2004, INDEPENDENCE MALL WEST 6TH AND RACE ST, PHILADELPHIA, PA 19106-1572 USA. **Anais**... INDEPENDENCE MALL WEST 6TH AND RACE ST, PHILADELPHIA, PA 19106-1572 USA: AMER COLL PHYSICIANS, 2004.

CHOI, D. G.; VENKATESAN, J.; SHIM, M. S. Selective anticancer therapy using pro-oxidant drug-loaded chitosan–fucoidan nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND, v. 20, n. 13, 2019.

CHOOTO, P. Cyclic Voltammetry and Its Applications. In: **Voltammetry**. [s.l: s.n.]. p. 1–14.
CIOU, D. S. et al. Colorimetric and amperometric detection of urine creatinine based on the ABTS radical cation modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, PO BOX 564, 1001 LAUSANNE, SWITZERLAND, v. 314, 2020.

COUTINHO, I. D. et al. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 21, p. 4198–4206, 2016.

CUÉLLAR CUÉLLAR, A.; OKORI, O. D. Preliminary Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of the Fresh and Dried Whole Plant Extracts from Commelina benghalensis. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 104–116, 2010.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>

DE OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba, PR. Disponível em: <http://omnipax.com.br/livros/2011/BMPD/BMPD-livro.pdf>

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **Square wave voltammetry. Part I: Theoretical aspects**, Sociedade Brasileira de Quimica, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 26 out. 2020.

FALEIRO, E. A. et al. Integrated management of tough lovegrass (Eragrostis plana nees): Associating chemical control tools and plant physiology. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 1–7, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200271>

FERREIRA, R. D. Q.; AVACA, L. A. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 2169–2173, 2008.

FILIPIAK, M. Electrochemical analysis of polyphenolic compounds. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 17, p. 1667–1670, 2001. Disponível em: <http://www.jsac.or.jp/analsci/fulltext.php/17/ICAS2001/i1667/>

GAVILANE, M. L.; CARDOSO, C.; BRANDÃO, M. 1º Encontro sobre Plantas Medicinais no Espírito Santo. In: PLANTAS DANINHAS COMO MEDICAMENTOSAS DE USO POPULAR; PLANTAS DANINHAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA 1988, Rio Novo do Sul. **Anais**... Rio Novo do Sul: Biblioteca Central: EMATER-ES, 1988.

GENG, P. et al. HHS Public Access. **J Mass Spectrom.**, [s. l.], v. 5520, n. 10, p. 914–930, 2016.

GHICA, M. E.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 313–318, 2004.

GIL, E. D. S. et al. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 949–953, 2009.

GU, D. et al. Characterization and identi fi cation of chemical compositions in the extract of Artemisia rupestris L . by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of- fl ight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], n. August 2011, p. 83–100, 2012. Disponível em: <wileyonlinelibrary.com>

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 81, n. 1 Suppl, p. 268S-276S, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.268S>

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**, James M. Smith; Peterson, Kent A; Bensink, Jennifer L., 2000. Disponível em: <www.mhhe.com>

HENDRICKSON, H. P.; KAUFMAN, A. D.; LUNTE, C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 325–334, 1994.

HILLOCKS, R. J. The potential benefits of weeds with reference to small holder agriculture in Africa. **Integrated Pest Management Reviews**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 155–167, 1998.

HOSSAIN, F. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of Commelina benghalensis linn. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 25–32, 2014.

IBRAHIMA, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from securigera securidaca flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 134–141, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.008>

IRIVIBULKOVIT, K. S.; OUANTHAVONG, S. N.; AMEENOI, Y. S. Sirivibulkovit K et al 2018. **Analitical Siences**, [s. l.], v. 34, n. July, p. 795–800, 2018.

ISMAIL, N. I. et al. Evaluation of Radical Scavenging Capacity of Polyphenols Found in Natural Malaysian Honeys by Voltammetric Techniques. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 2939–2949, 2018.

ISWALDI, I. et al. Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (Aspalathus linearis) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 400, n. 10, p. 3643–3654, 2011.

JI, Z. et al. Tuning the functional groups on carbon nanodots and antioxidant studies. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–12, 2019.

KANG, J. et al. Investigation on the electrochemistry of rutin and its analytical application. **Analytical Letters**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 677–686, 2002.

KARAM, D.; MELHORANÇA, A. L. Cultivo do milho. **Embrapa**, [s. l.], n. 2, p. 7, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/485064/cultivo-do-milho-irrigado>

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KEENE, K. A.; RUDDY, R. M.; FHANER, M. J. Investigating the Relationship between Antioxidants and Fatty Acid Degradation Using a Combination Approach of GC-FID and Square-Wave Voltammetry. **ACS Omega**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 983–991, 2019.

KHURANA, R. K. et al. Administration of antioxidants in cancer: debate of the decade. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 763–770, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.021>

KOWLURU, R. A.; MISHRA, M. **Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy**, Elsevier, 2015.

KUPPUSAMY, P. et al. In Vitro Anticancer Activity of Au, Ag Nanoparticles Synthesized Using Commelina nudiflora L. Aqueous Extract Against HCT-116 Colon Cancer Cells. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 173, n. 2, p. 297–305, 2016.

LASSMANN, H.; VAN HORSSEN, J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1862, n. 3, p. 506–510, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.018>

LECCI, R.; LOGRIECO, A.; LEONE, A. **Pro-Oxidative Action of Polyphenols as Action Mechanism for their Pro-Apoptotic Activity**, 2014.

LEITE, K. C. de S. et al. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 325–332, 2018.

LI, Z. H. et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (Rubus idaeus L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, [s. l.], v. 13, p. 757–772, 2018.

LIMA, D. et al. Levantamento de plantas daninhas em área rotacionada com as culturas da soja, milho e arroz irrigado no cerrado de Roraima Weeds survey of rotational crops of soybean , corn , and irrigated rice in the savannah (cerrado) of Roraima. **Revista Agroambiente On-line**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 58–63, 2009.

LIU, A. et al. Electrochemical oxidation of luteolin at a glassy carbon electrode and its application in pharmaceutical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 745–748, 2008.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, CAMPUS, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND, v. 16, n. 1, 2018.

MARÍN, A. et al. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (Capsicum annuum L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 3861–3869, 2004.

MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V. methods DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 11–24, 2011.

MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus Vernonia Schreb. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2014.

MIRCESKI, V. et al. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 2411–2422, 2013.

MIRCESKI, V.; SKRZYPEK, S.; STOJANOV, L. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 0, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0>
MIRČESKI, V.; STOJANOV, L.; SKRZYPEK, S. Recent Advances and Prospects of Square-Wave Voltammetry. **Contributions, Section of Natural, Mathematical and Biotechnical Sciences**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 103, 2018.

MORROGH-BERNARD, H. C. Fur-rubbing as a form of self-medication in Pongo pygmaeus. **International Journal of Primatology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1059–1064, 2008.

MOSKAL, A. et al. Alcohol intake and colorectal cancer risk: A dose-response meta-analysis of published cohort studies. **International Journal of Cancer**, DIV JOHN WILEY & SONS INC, 111 RIVER ST, HOBOKEN, NJ 07030 USA, v. 120, n. 3, p. 664–671, 2007.

MUSA, K. H. et al. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 4102–4106, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.112>

MUSA, K. H.; ABDULLAH, A.; AL-HAIQI, A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 194, p. 705–711, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>
NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 2004.

NOON, J.; MILLS, T. B.; NORTON, I. T. The use of antioxidant rutin hydrate Pickering particles to combat lipid oxidation in O/W emulsions. **Journal of Food Engineering**, THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, OXON, ENGLAND, v. 274, p. 109830, 2020.

NURAZAH, Z. et al. Metabolomics unravel differences between Cameroon Dura and deli Dura oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) genetic backgrounds against Basal stem rot. **Journal of Oil Palm Research**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 227–241, 2017.

OLIVEIRA, A. R.; FREITAS, S. P.; VIEIRA, H. D. Controle de Commelina benghalensis, C. erecta e Tripogandra diuretica na cultura do café. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 823–830, 2010.

OLIVEIRA, M.; DORS, G. Atividade Antioxidante E Antifúngica De Extratos Vegetais. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 267–275, 2007. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/163>

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Quimica**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PALEARI, L. M. Plantas ruderais: o mato que alimenta, protege e embeleza o ambiente. . 2012, p. 27.

PANIGO, E. S. et al. Glyphosate-induced structural variations in Commelina erecta L. (Commelinaceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 135–142, 2012.

PANNEERSELVAM, P. et al. Transforming labor requirement, crop yield, and profitability with precision dry-direct seeding of rice and integrated weed management in Eastern India. **Field Crops Research**, [s. l.], v. 259, n. March, p. 107961, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107961>

PIOVESAN, J. V. **Determinação eletroanalítica de compostos fenólicos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(vinilpirrolidona)**. 2014. Universidade Federall de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/123276>

POLJSAK, B.; MILISAV, I. The Role of Antioxidants in Cancer, Friends or Foes? **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 24, n. 44, p. 5234–5244, 2019. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/169261/article>. Acesso em: 4 maio. 2020.

POLLET, B. G.; CURNICK, O. J. Introduction to Electrochemistry. In: **Power Ultrasound in Electrochemistry: From Versatile Laboratory Tool to Engineering Solution**. [s.l: s.n.]. p. 1–20.

PREVC, T. et al. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. **Talanta**, [s. l.], v. 109, p. 13–19, 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

QASEM, J. R. A Survey on the phytotoxicity of common weeds, wild grown species and medicinal plants on wheat. **Allelopathy Journal**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 181–196, 2017.

QIU, X. L.; ZHANG, Q. F. Chemical profile and pancreatic lipase inhibitory activity of Sinobambusa tootsik (Sieb.) Makino leaves. **PeerJ**, [s. l.], v. 2019, n. 9, p. 1–12, 2019.

RAQUIBUL HASAN, S. M. et al. **Analgesic activity of the different fractions of the aerial parts of Commelina benghalensis Linn**, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 9–10, 1999. a.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Appling an Improved ABTS Radical decolorization Assy. **Free Radical Biology & Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999. b.

RIAZ, A. T. et al. Antioxidant, antibacterial, antidiarrheal and antipyretic activities of organic crude fractions of Commelina paludosa. **AYU**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 101–106, 2018.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROCHA, D. C. et al. Efeito de herbicidas sobre quatro espécies de trapoeraba. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 359–364, 2007.

RORIZ, C. L. et al. Pterospartum tridentatum, Gomphrena globosa and Cymbopogon citratus: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. **Food Research International**, [s. l.], v. 62, p. 684–693, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.036>

RUFINO, M. do S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o}+**, Embrapa, 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/426954/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pela-captura-do-radical-livre-abts>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SAHA, S. K. et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International Journal of Molecular Sciences**, ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND, v. 18, n. 7, 2017.

SAHYON, H. A.; RAMADAN, E. N. M.; MASHALY, M. M. A. Synergistic Effect of Quercetin in Combination with Sulfamethoxazole as New Antibacterial Agent: In Vitro and In Vivo Study. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s. l.], v. 53, n. 9, p. 803–813, 2019.

SAMA FONKENG, L. et al. Anti-Staphylococcus aureus activity of methanol extracts of 12 plants used in Cameroonian folk medicine. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 4–9, 2015.

SANTOS, G. P. et al. Centro Universitário da Grande Dourados I Congresso Binacional Brasil - Paraguay. In: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMMELINA CAYENNENSIS 2011, **Anais**... [s.l: s.n.]

SCHILDER, W. H. et al. Determining the antioxidant properties of various beverages using staircase voltammetry. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e04210, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04210>

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 1202–1205, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

SILVA, S.O. MATSUMOTO, S.N. BEBÉ, F.V. JOSÉ, A. R. S. Diversidade e freqüência de plantas daninhas em associações entre cafeeiros e grenvileas126. **Coffee Science**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 126–134, 2006.

SILVA, C. M. et al. **Guia de Plantas visitadas por abelhas na Caatinga**. 1ª ed. Fortaleza - CE: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012.

SILVA, L. I. Da. **Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e análise fitoquímica preliminar de plantas medicinais utilizadas pelas populações da região do Vale do Juruena e microrregião no Norte Araguaia, Mato Grosso, Brasil**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2015. Disponível em: <http://ri.ufmt.br/handle/1/693>

SILVA, L. P.; LOURENCAO, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous Voltammetric Determination of Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide in Synthetic Urine Samples Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 801–806, 2015.

SIMIĆ, A. et al. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2327–2340, 2007.

SINGH, R.; SINGH, A. WEEDS : An Important Source of Natural Medicine. **Journal of Drug Metabolism & Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/weeds-an-important-source-of-natural-medicine.pdf>

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. [s.l.] : Cengage Learning Brasil, 2013.

SOKKAR, N. M. et al. The phenolic composition of the hepatoprotective and antioxidant fractions of Albizia lebbeck L. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 973–978, 2016.

SOUSA, F. F. et al. Identificação de Plantas Espontâneas Com Propriedades Terapêuticas em área cultivada Jatropha Sp. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 6, p. 258–262, 2011. Disponível em: <http://revista.gvaa.com.br>

SOUZA, F. H. D.; ALVES, E.; FUSHITA, A. T. **Trapoeraba: problema para produção e comercialização de sementes de capimComunicado Técnico 48, EMBRAPA**. São Carlos, SP.

SOUZA, L. S. et al. Teores de macro e micronutrientes e a relação c/n de várias espécies de plantas daninhas. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 163–167, 1999.

SULTANA, T.; MANNAN, M. A.; AHMED, T. Evaluation of central nervous system (CNS) depressant activity of methanolic extract of Commelina diffusa Burm. in mice. **Clinical Phytoscience**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–7, 2018.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. **Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms**, 2003.

THOMPSON, H. J. et al. Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage The goal of this study was to test the hypothesis that increased consumption of vegetables and fruit would reduce markers of oxidative cellular damage that can be . **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 2261–2266, 1999.

THYAGARAJAN, A.; SAHU, R. P. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. **Integrative Cancer Therapies**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 210–216, 2018.

TRAPP, K. C. et al. Análise Proliferativa e Fitoquímica de Commelina erecta L. Pelo Teste Allium cepa L. In: **Enciclopédia Biosfera**.Centro Científico Conhecer, 2016.

VASCONCELOS, M. C. C.; SILVA, A. F. A.; LIMA, R. S. Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas. **Agropecuaria cientifica no semiárido**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–6, 2012.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, 84 THEOBALDS RD, LONDON WC1X 8RR, ENGLAND, v. 22, n. 1, p. 3–13, 2011.

WEN, L. et al. Identification of a flavonoid C-glycoside as potent antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 110, n. October 2016, p. 92–101, 2017.

WSSA. Do you have a weed, noxious weed, invasive weed or "superweed"? Simple distinctions make all the difference. [s. l.], p. 1, 2016.

YEHYE, W. A. et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 101, p. 295–312, 2015.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: Um alimento functional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 459–471, 2010.