Scientia Chromatographica 2017; 9(3):180-193
Instituto Internacional de Cromatografia
http://dx.doi.org/10.4322/sc.2017.015
ISSN 1984-4433

HPLC

Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenolicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L.

Fabiana Agostini[1]*, Francine da Motta Michelon[1], Vanessa Amanda Alves Gomes[1], Sabrina Bertolazzi[1], Joséli Schwambach[2] e Sidnei Moura[1]

[1]LBIOP - Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul – RS, Brasil.

[2]LBV - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul – RS, Brasil.

*fagosti1@ucs.br

Recebido: 01/11/2017
Aceito: 29/11/2017

Abstract

Among the main active compounds present in plants used in traditional medicine are the phenolic compounds. However, there is a methodological restriction for qualification and simultaneous quantification of several representative of this class. Thus, this study aimed to optimize and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection method for the simultaneous determination of 14 phenolic compounds. In order to confirm the method efficiency, decoctions of *Passiflora caerulea* L. (blue passion fruit), *Myrcia oblongata* DC. (Guamirim) and *Equisetum giganteum* L. (giant horsetail) were used. There are few studies in the literature with these species. Nevertheless, these plants have been widely spread and used in folk medicine for their antioxidant characteristics. The method showed linearity, repeatability and accuracy. The correlation coefficients were between 0.9972 and 0.9999; detection limits ranged from 0.01 to 4.48 µg/mL and the quantitation limit from 0.04 to 13.58 µg/mL. In the tested decoctions, 09 compounds were identified, the major ones being vitexin and naringin in Guamirim; chlorogenic acid and naringin in horsetail; and vitexin and gallic acid in passion fruit. It was observed that *Myrcia oblongata* has a higher antioxidant potential with respect to the concentration of phenolics and their phenolic compounds individually investigated.

Keywords: giant horstail; decoction; phytotherapy; guamirim; blue passion flower

Resumo

Dentre os principais compostos ativos presentes em plantas usadas na medicina tradicional encontram-se os compostos fenólicos. No entanto, existe uma restrição metodológica para qualificação e quantificação simultânea de vários representantes desta classe. Desta forma, este estudo buscou a otimização e validação de um método por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta (UV) para a determinação simultânea de 14 compostos fenólicos. Para confirmar a eficiência do método, foram utilizadas decocções de *Passiflora caerulea* L. (maracujá), *Myrcia oblongata* DC. (guamirim) e *Equisetum giganteum* L. (cavalinha). São escassos os estudos apresentados na literatura com essas espécies. No entanto, estas plantas têm sido amplamente difundidas e usadas na medicina popular pelas suas características antioxidantes. O método apresentou linearidade, repetitividade e precisão. Os coeficientes de correlação ficaram entre 0,9972 e 0,9999; os limites de detecção variaram de 0,01 a 4,48 µg/mL e os de quantificação de 0,04 a 13,58 µg/mL. Nas decocções testadas, foram identificados 09 compostos, sendo os majoritários a

vitexina e naringina no guamirim; ácido clorogênico e naringina na cavalinha; e ainda, vitexina e ácido gálico no maracujá. Observou-se que *Myrcia oblongata* tem um maior potencial antioxidante no que diz respeito à concentração de fenólicos totais e de seus compostos fenólicos avaliados individualmente.

Palavras-chave: cavalinha; decocção; fitoterapia; guamirim; maracujá.

1. Introdução

Na medicina tradicional, algumas plantas com potencial aplicação fitoterápica como *Passiflora caerulea* L. (maracujá), *Myrcia oblongata* DC. (guamirim) e *Equisetum giganteum* L. (cavalinha), tem recebido destaque pelo seu uso popular na forma de chás preparados por infusão ou decocção, como é o caso de outras ervas abundantes na dieta de milhares de pessoas em todo o mundo[1], sendo estes chás, uma das maiores fontes de compostos fenólicos em nossa dieta[2]. Estes compostos estão associados às propriedades sensoriais e aos efeitos benéficos destas bebidas[3], além de apresentarem atividades biológicas como a ação antioxidante[1]. Assim, a caracterização fenólica de preparados de ervas é importante para determinar seus benefícios à saúde[4].

Estudos a respeito do uso de *P. caerulea* indicam-na como sedativa, diurética, ansiolítica, antimicrobiana[5], anti-inflamatória e hipotensiva[6]. Já com relação ao gênero *Equisetum,* são citadas propriedades anti-inflamatória[7,8], antioxidante[9], diurética[10], anti-hipertensiva e bacteriostática[11]. O gênero *Myrcia*, é empregado na medicina popular para o tratamento de diabetes, diarreias, hemorragias e úlceras da boca[12]. No entanto, a composição fenólica nestas espécies não tem sido determinada de forma sistemática.

Não obstante, a qualificação e quantificação simultânea destes compostos em métodos sensíveis e precisos é um desafio tecnológico. Para tanto, as técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos e bebidas[13].

Cada vez mais observa-se a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer validação[13], uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório[14]. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência[13].

Assim, o objetivo deste estudo é indicar um método por CLAE-UV para determinação simultânea de compostos fenólicos em decocções. Como protótipos para este estudo, elegemos as espécies *Passiflora caerulea* L., *Myrcia oblongata* DC. e *Equisetum giganteum* L., com varias atividades fitoterapêuticas relatadas na literatura mas, no entanto, com pouca investigação de composição fenólica determinada de forma sistemática.

2. Experimental

2.2 Solventes, Reagentes e Padrões Analíticos

O reagente de Folin-Ciocalteau, a acetonitrila (C_2H_3N) com grau HPLC, o carbonato de sódio (Na_2CO_3) e o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Brasil). Os padrões analíticos ácido gálico (99,5%), catequina (97%), ácido

clorogênico (95%), epicatequina (98%), vitexina (95%), rutina (94%), ácido ferulico (99%), naringina (95%), hesperidina (97%), miricetina (98%), resveratrol (99%), quercetina (95%), apigenina (95%) e canferol (97%) também foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Brasil). Toda água ultra-pura utilizada nas extrações e análises foi obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q® Millipore (EUA).

2.2. Coleta e Preparo do Material Vegetal

O material vegetal de *E. giganteum* foi coletado na cidade de Garibaldi, de *M. oblongata* foi obtido na cidade de São Marcos e de *P. caerulea* na cidade de Caxias do Sul, todas localizadas no estado do Rio Grande do Sul - Brasil, em novembro de 2014. A identificação botânica do material coletado foi realizada no herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), no qual foram depositadas exsicatas das espécies (*E. giganteum* sob o n° 4014, *M. oblongata* sob o n° 41820 e *P. caerulea* sob o n° 41813). Após a coleta, as partes aéreas foram manualmente selecionadas e acondicionadas em estufa com circulação e renovação de ar forçada DeLeo® (Brasil) a 40ºC por 48 horas para desidratação.

2.3. Preparo das Decocções de estudo

As folhas de *M. oblongata* e *P. caerulea* e os talos de *E. giganteum* foram macerados com nitrogênio líquido e 5 g de cada espécie foi submetido à decocção com 150 mL de água Milli-Q® em agitador magnético com aquecimento IKA® HS7 (Brasil) a 80°C com agitação mecânica por 20 min, segundo adaptações de Saito[15]. Após, procedeu-se a filtragem e evaporação do líquido em Banho-Maria DeLeo® (Brasil) a 40°C, para obtenção do extrato seco de cada decocção. Antes de cada análise, os extratos secos foram ressuspendidos em água ultra-pura (Milli-Q®), na concentração de 5 mg mL^{-1}.

2.4. Validação do Método Analítico

Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, e os limites de detecção e de quantificação, segundo Ribani *et al*.[13]. A seletividade foi verificada através de comparação dos tempos de retenção dos picos dos compostos padrões injetados individualmente. Para avaliar a linearidade do método, foram construidas curvas analíticas de cada padrão através da injeção em triplicata das suas respectivas soluções em seis concentrações diferentes. A precisão do método foi verificada pela repetibilidade da mesma amostra analisada em nove replicatas, com valores expressos através da média e desvio padrão relativo. Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dividiu-se o coeficiente linear pelo coeficiente angular da curva analítica, para cada um dos padrões. Estes resultados foram multiplicados por 3 para LD e por 10 para LQ.[13]

2.5. Análise Química por CLAE – UV

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent HP 1100 (EUA), coluna Lichrospher® 100 RP_{18} (5 µm), detector UV a 210 nm e um sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi baseada em Morelli[16] e constituída de: solvente A – água Milli-Q® com 1% de ácido orto-fosfórico e solvente B – acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi do tipo gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5 min, 60% de A de 5 a 40 min e 90% de A de 40 a 50 min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min. Para definir as condições cromatográficas adequadas para a separação dos compostos fenólicos, utilizou-se uma solução dos padrões ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, vitexina, rutina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, apigenina e canferol com concentração de 1 mg mL^{-1}. A solução foi previamente filtrada em membrana de Nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos

foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU*s) do pico do composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado.

2.6. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos foi adaptada de Roesler *et al*.[17] onde a 0,5 mL da amostra, adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. O tubo foi agitado em Vórtex Quimis® Q 220-2 (Brasil) e incubado por 5 min em Banho-Maria DeLeo® (Brasil) a 50°C. A quantificação foi feita em espectrofotômetro UV-VIS Beckman DU®530 (Alemanha), com comprimento de onda de 760 nm. A concentração de fenólicos foi estimada correlacionando-se a absorbância das amostras a uma curva padrão realizada a partir de 6 pontos com concentração de 10 a 100 µg mL^{-1} de ácido gálico[18,19], onde o resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/g de material vegetal (mg EAG g MV^{-1}).

3. Resultados e discussão

3.1. Validação do Método Cromatográfico (CLAE)

O procedimento de validação teve início com a avaliação da seletividade para os padrões selecionados. Após todos os padrões estarem devidamente separados entre si (Figura 1A- padrões), procedeu-se com a análise da faixa linear de trabalho, a partir da contrução de curvas de calibração que podem ser visualizadas na Tabela 1, onde os níveis de concentração também podem ser observados. Percebe-se, através do R^2 de cada curva, e de seus limites de detecção e quantificação, que os resultados foram adequados e satisfatórios, além de permitir a determinação de concentrações baixas de compostos ativos.

Para a avaliação da repetibilidade, duas concentrações de cada padrão foram analisadas nove vezes consecutivas, verificando-se a área de cada composto (Tabela 2) e seu tempo de retenção (Tabela 3). Assim, foi comprovado que o desvio padrão relativo (DPR) de cada composto padrão e em cada concentração avaliada permanece dentro dos limites aceitáveis, segundo Ribani *et al*[13].

3.2. Análise química por CLAE – UV

A separação dos compostos presentes nas decocções de *E. giganteum*, *M. oblongata* e *P. caerulea*, com e sem adição de padrões, foi conduzida sob a melhor condição obtida para a mistura dos padrões, segundo Morelli[16], em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Os compostos identificados na decocção de *E. giganteum* foram os ácidos gálico e clorogênico, além de epicatequina, naringina e rutina. Na decocção de *M. oblongata*, também foram identificados os ácidos gálico e clorogênico, juntamente com catequina, naringina, vitexina, miricetina e quercetina. A decocção de *P. caerulea* teve os compostos ácido gálico, catequina, epicatequina, vitexina e quercetina identificados. Na Figura 1 visualiza-se o perfil cromatográfico das três decocções e podem-se observar as concentrações de cada composto identificado por CLAE e na Figura 2, suas estruturas químicas.

Comparando com dados publicados por Pereira *et al*.[20], *P. caerulea* apresentou os compostos rutina, vitexina, orientina e isoorientina, quando avaliada por CLAE, a partir de seu extrato hidroalcoólico. A fração aquosa do extrato metanólico também foi avaliada por CLAE, em estudo de Ozarowskia e Thiema[6], onde se observa a presença de vitexina, isovitexina, rutina, ácido clorogênico, luteolina e apigenina. A Análise

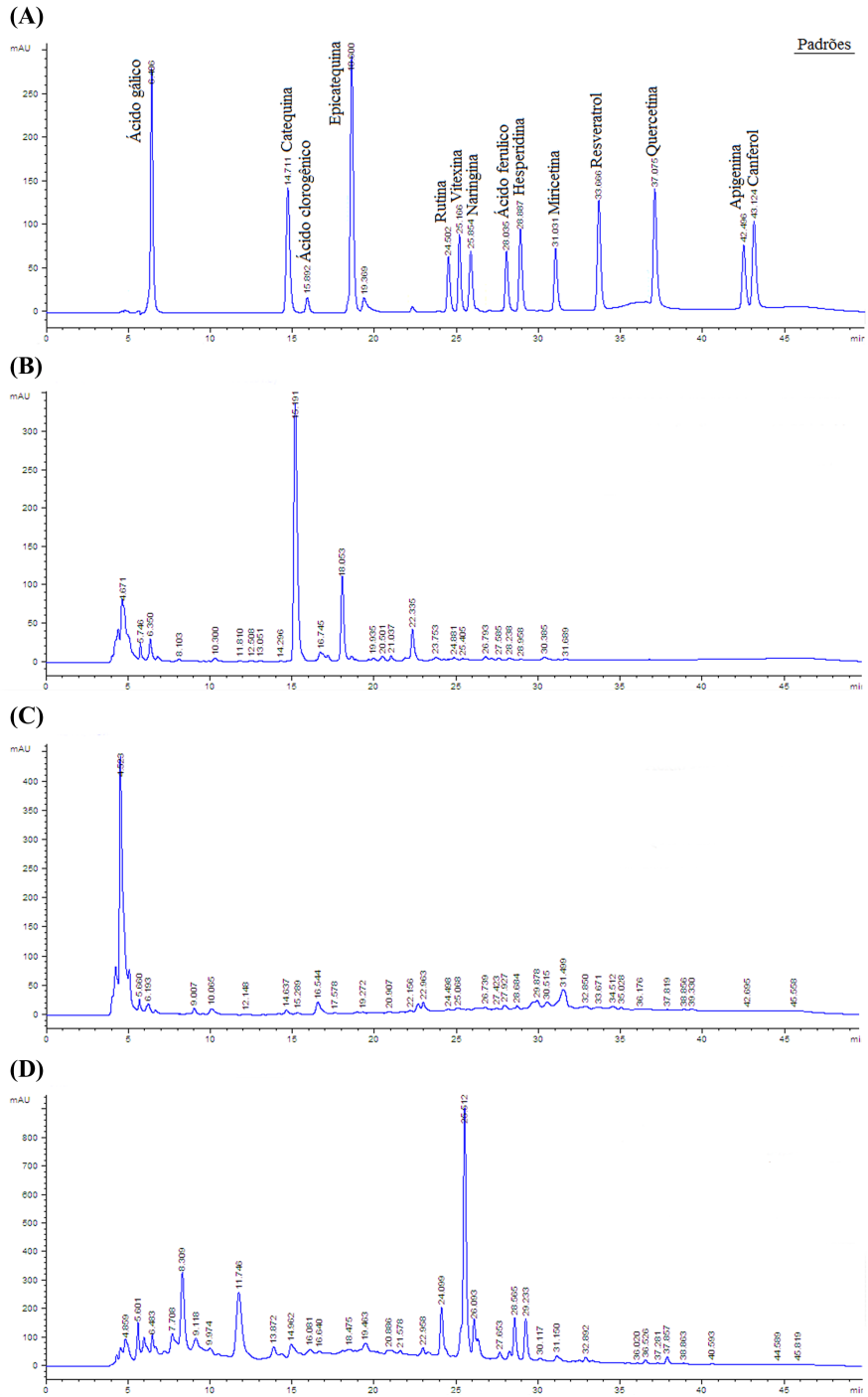


Figura 1. Perfil cromatográfico e concentrações (mg 100g^{-1} de material vegetal) dos compostos avaliados nos chás obtidos das respectivas decocções.

(A) padrões analíticos selecionados para a validação do método (ACG=Ácido gálico; CAT=Catequina; ACC=Ácido clorogênico; EPIC= Epicatequina; RUT=Rutina; VIT=Vitexina; NAR=Naringina; ACF=Ácido ferulico; HESP=Hesperidina; MIR=Miricetina; RESV=Resveratrol; QUER=Quercetina; APIG=Apigenina; CANF=Canferol.

(B) compostos fenólicos da cavalinha (ACC=44,56±3,15; ACF= 42,75± 1,44; ACG=2,52±0,09; EPIC=2,22±0,06; VIT=1,19±0,27);

(C) compostos fenólicos do maracujá (ACG=3,03±0,07; CAT=1,75±0,02; EPIC=2,67±0,05; MIR=24,43±1,90; QUER=0,64±0,03; VIT=4,79±0,49).

(D) compostos fenólicos do guamirim (ACC=84,58±6,65; ACF=658,55±12,72; ACG=34,92±2,82; CAT=23,26±0,79; MIR=10,62±0,12; QUER=1,21±0,18; RUT=1950,78±18,08; VIT=262,77±1,07).

Tabela 1. Parâmetros das curvas de calibração dos compostos avaliados (µg mL-[1])

Compostos fenólicos	Coeficiente (R^2)	Níveis de concentração	Curva de calibração	LD	LQ
Ácido clorogênico	0,9932	0,6-80	Y=12,14x – 16,49	0,15	0,50
Ácido ferulico	0,9990	0,1-50	Y=113,61x – 11,98	0,03	0,11
Ácido gálico	0,9999	0,1-30	Y=69,95x + 0,66	0,03	0,10
Apigenina	0,9999	0,1-50	Y=85,62x + 16,16	0,02	0,08
Canferol	0,9998	0,1-125	Y=63,95x – 21,68	0,03	0,10
Catequina	0,9982	0,06-16	Y=179,43x – 30,56	0,02	0,06
Epicatequina	0,9995	0,1-50	Y=123,22x – 54,57	0,04	0,09
Hesperidina	0,9993	0,1-12,5	Y= 40,76x + 4,50	0,02	0,08
Miricetina	0,9972	0,2-50	Y=105,82x – 64,59	0,05	0,18
Naringina	0,9926	0,1-16	Y=55,59x + 45,30	0,03	0,09
Quercetina	0,9999	0,1-25	Y=64,11x – 0,68	0,04	0,12
Resveratrol	0,9999	0,1-12,5	Y= 63,76x + 0,27	0,03	0,10
Rutina	0,9996	0,1-25	Y= 29,71x + 1,19	0,04	0,12
Vitexina	0,9972	0,2-60	Y=38,89x+1,62	0,06	0,19

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

cromatográfica do extrato aquoso de *P. alata* realizada por Colomeu *et al*.[21] resultou nos compostos vitexina, isovitexina e isoorientina; *P edulis* apresentou estes mesmos compostos em seu extrato aquoso segundo Silva *et al*.[22]. Comparando estes dados relatados na literatura com os obtidos na decocção de *P. caerulea* têm-se vitexina em comum.

Cinco espécies de *Equisetum* tiveram seus extratos hidroalcoólicos avaliados por CLAE, no estudo de Milovanović *et al*.[23], onde os compostos identificados foram apigenina, canferol e quercetina. Três ácidos fenólicos foram identificados no extrato aquoso de *E. arvense* por Mimica-Dukic *et al*.[24]; já, o extrato metanólico forneceu compostos como ácidos clorogênico, cafeico e ferulico, além de isoquercetina e luteolina-5-glicosídeo, para a mesma espécie, segundo Oniszczuka *et al*.[25]. Novamente encontrou-se apenas um composto em comum na decocção de *E. giganteum* e nas espécies citadas na literatura consultada, o ácido clorogênico.

Segundo Wubshet *et al*.[26], casuarinina, miricetina e quercetina foram os compostos identificados no extrato de acetato de etila de *Myrcia palustris*. Dos três compostos encontrados na literatura, miricetina e quercetina também foram encontrados na decocção de *M. Oblongata*. Observa-se ainda que a decocção de *M. oblongata* apresentou as maiores concentrações dos compostos identificados quando comparado com as decocções de *P. caerulea* e de *E. giganteum*.

Os dados de comparação apresentados para as três espécies demostram a grande diversidade de compostos existentes nas diferentes espécies de um mesmo gênero, as diferentes formas extração e a diferença na seletividade do solvente usado para a extração dos compostos de interesse.

Tabela 2. Avaliação da repetibilidade do método para os padrões, com relação à área e utilizando níveis de concentração baixo e intermediário

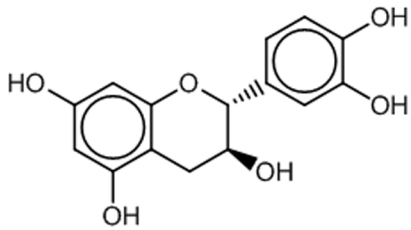
Compostos fenólicos	Nível de concentração baixo				Nível de concentração intermediário			
	Concentração (µg mL-^{1})	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Concentração (µg mL-^{1})	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido clorogênico	1,0	5,17	0,26	5,12	10,0	78,92	0,43	0,55
Ácido ferulico	0,5	52,21	0,78	1,50	6,0	607,17	0,66	0,11
Ácido gálico	0,2	16,08	0,15	0,95	7,5	936,71	3,97	0,42
Apigenina	0,4	36,49	0,35	0,95	6,2	564,55	1,47	0,26
Canferol	0,4	25,48	0,87	3,42	7,8	471,92	2,56	0,54
Catequina	1,0	169,79	1,60	0,94	8,0	1355,47	4,61	0,34
Epicatequina	1,0	116,24	0,43	0,37	6,2	618,94	0,56	0,09
Hesperidina	0,2	9,40	0,33	3,48	6,2	263,77	5,27	2,00
Miricetina	0,4	27,21	0,23	0,83	3,1	249,19	0,67	0,27
Naringina	0,2	38,46	0,35	0,91	3,9	310,63	1,94	0,63
Quercetina	0,8	51,29	0,42	0,82	12,5	794,64	0,80	0,10
Resveratrol	0,4	25,64	0,38	1,50	6,2	394,16	2,20	0,56
Rutina	0,4	11,43	0,34	2,96	12,5	381,18	2,30	0,60
Vitexina	0,7	30,77	0,35	1,15	15,0	630,89	0,41	0,06

DPR: Desvio padrão relativo

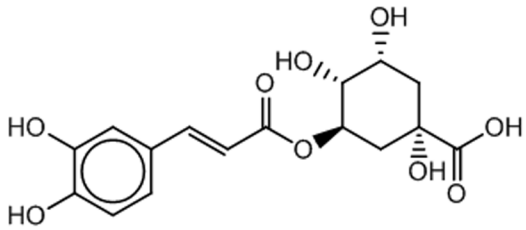
Tabela 3. Avaliação da repetibilidade do método para os padrões, com relação ao tempo de retenção e utilizando níveis de concentração baixo e intermediário

Compostos fenólicos	Nível de concentração baixo				Nível de concentração intermediário			
	Concentração (µg mL-^{1})	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Concentração (µg mL-^{1})	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido clorogênico	1,0	15,99	0,06	0,39	10,0	16,02	0,07	0,44
Ácido ferulico	0,5	28,18	0,06	0,23	6,0	28,29	0,05	0,21
Ácido gálico	0,2	4,46	0,01	0,27	7,5	4,47	0,02	0,43
Apigenina	0,4	42,87	0,66	1,54	6,2	42,73	0,44	1,04
Canferol	0,4	43,55	0,34	0,78	7,8	43,46	0,33	0,77
Catequina	1,0	14,74	0,24	1,65	8,0	14,71	0,21	1,41
Epicatequina	1,0	18,62	0,28	1,50	6,2	18,61	0,33	1,78
Hesperidina	0,2	28,91	0,29	1,02	6,2	28,68	0,26	0,89
Miricetina	0,4	31,44	0,41	1,32	3,1	31,36	0,34	1,08
Naringina	0,2	25,94	0,12	0,41	3,9	25,95	0,24	0,86
Quercetina	0,8	37,41	0,29	0,77	12,5	37,32	0,27	0,74
Resveratrol	0,4	33,54	0,28	0,84	6,2	33,58	0,33	0,98
Rutina	0,4	24,50	0,23	0,91	12,5	24,64	0,21	0,83
Vitexina	0,7	25,33	0,28	1,15	15,0	25,34	0,30	1,24

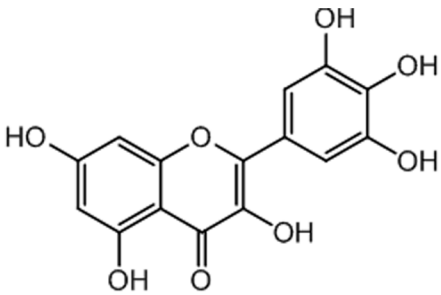
DPR: Desvio padrão relativo



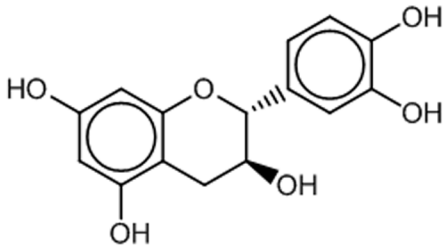
Catequina



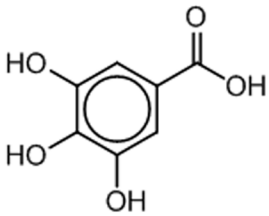
Ácido Clorogênico



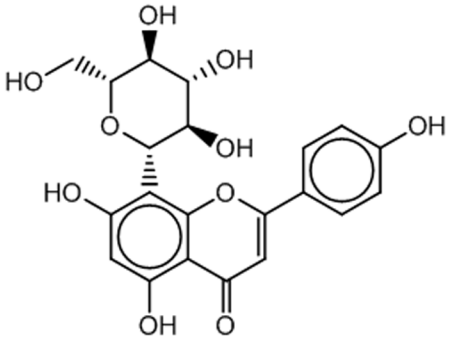
Miricetina



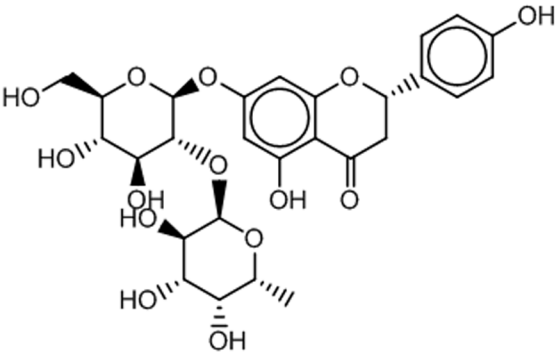
Epicatequina



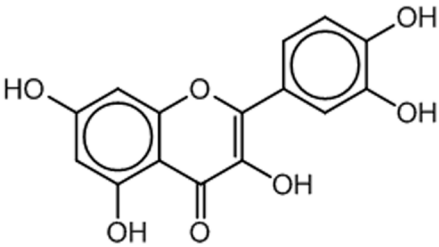
Ácido Gálico



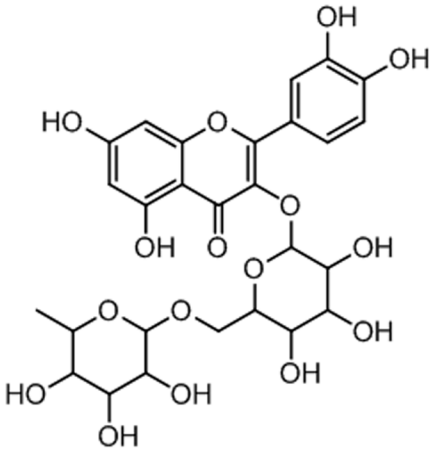
Vitexina



Naringina



Quercetina



Rutina

Figura 2. Estruturas químicas dos compostos avaliados nos chás obtidos por decocção de cavalinha (*E. giganteum*), maracujá (*P. caerulea*) e guamirim (*M. oblongata*).

Segundo Colomeu *et al*.[21], vitexina e rutina estão entre os compostos que apresentam potencial para neutralizar radicais livres presentes no organismo, juntamente com naringina (Thangavel *et al*.)[27], quercetina e miricetina (Dornas *et al*.)[28]. Muller *et al*.[29] citam que vitexina também apresenta atividades como anti-inflamatória, antiespasmódica, antimicrobiana e hipotensiva. À naringina também são atribuídas ações anti-inflamatória, anti-carcinogênica e na redução de lipídios (Thangavel *et al*.[27]). Segundo Garambone e Rosa e Belinati o ácido clorogênico também é considerado um excelente antioxidante[30,31] além de promover efeito hipotensor, reduzir a absorção de glicose pelo organismo e atuar como agente anti-inflamatório (Belinati)[29]. Barbosa[32] relata que propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antimutagênicas são atribuídas ao ácido gálico e seus derivados.

3.3. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A avaliação de fenólicos totais nas decocções indicou variações entre as espécies estudadas. Estas foram expressas em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de material vegetal (mg EAG g MV^{-1}). *P. caerulea* teve concentração de 13,82 mg EAG g MV^{-1} ± 0,27, *E. giganteum* apresentou 4,34 mg EAG g MV^{-1} ± 0,10 e *M. oblongata* 95,07 mg EAG g MV^{-1} ± 2,41.

Com relação à concentração de fenólicos totais observada na decocção de *P. caerulea*, pode-se afirmar que o valor encontrado está de acordo com dados relatados por Borneo *et al*.[33], que apontam uma concentração de 10,20 mg EAG g MV^{-1} obtida de infusão para a mesma espécie em estudo. *P. alata*, segundo Colomeu *et al*.[21], apresentou 9,50 mg EAG g MV^{-1} a partir de extrato aquoso e o mesmo tipo de extrato foi avaliado para *P. edulis*, onde a concentração de fenólicos totais foi de 8,30 mg EAG g MV^{-1}, segundo Silva *et al*.[22]. Desta forma, a concentração obtida no presente estudo mostrou ser maior do que as encontradas em outros trabalhos.

O extrato aquoso de *E. giganteum*, segundo Ricco *et al*.[34], apresentou uma concentração de 7,89 mg de equivalentes de ácido tânico g MV^{-1}, quase duas vezes o obtido no presente estudo. Para outras espécies do gênero, observaram-se valores maiores de fenólicos totais, como para *E. arvense* que apresentou um valor de 12,80 mg EAG g MV^{-1} no extrato aquoso, dado relatado por Nagai *et al*.[35]. Milovanović *et al*.[23] avaliaram o extrato hidroalcoólico de cinco outras espécies de *Equisetum* apresentando concentrações que variaram de 10,39 mg de equivalentes de ácido clorogênico g MV^{-1} em *E. arvense* a 39,44 mg de equivalentes de ácido clorogênico g MV^{-1} em E. *sylvaticum*. Com relação à decocção de *E. giganteum* pode-se observar uma concentração reduzida de fenólicos totais, quando comparada com outras espécies do gênero, mas semelhante àquela apresentada para a mesma espécie.

Na avaliação dos compostos fenólicos totais para a espécie de *Myrcia* estudada, o valor total obtido foi considerado alto. *Myrcia tomentosa*, espécie deste mesmo gênero, estudada por Borges *et al*.[36], teve seu extrato aquoso avaliado em diferentes meses nos anos de 2010 e 2011 frente à concentração de fenólicos totais, com uma variação de 45,00 mg de equivalentes de ácido tânico g MV^{-1} a 110,50 mg de equivalentes de ácido tânico g MV^{-1}. Comparando com este estudo, observa-se que a concentração de compostos fenólicos obtida na decocção de *M. oblongata* está de acordo com a literatura, no que diz respeito ao gênero, e que em comparação as outras duas decocções avaliadas, a concentração de fenólicos totais é bastante superior para esta espécie.

Em estudo com infusões de diferentes espécies, Moraes-de-Souza[37] avaliou o teor de compostos fenólicos, apresentando concentrações que variaram de 5,20 a 46,46 mg EAG g MV^{-1} em *Pimpinella anisum* L. (anis) e *Melissa officinalis* L. (melissa), respectivamente. Entre eles estão *Iex paraguariensis* A. St.-Hil. (chá mate) com 42,45 mg EAG g MV^{-1}, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (chá verde) com 40,02 mg EAG g MV^{-1} e

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze (chá preto) com 38,22 mg EAG g MV^{-1}.

Em outro estudo, Moraes-de-Souza *et al.*[38], compararam infusões de cinco espécies e o chá verde (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) apresentou as maiores concentrações (59,18 a 103,98 mg EAG g MV^{-1}) sendo anis (*Pimpinella anisum* L.) o chá com menores concentrações (5,24 a 8,90 mg EAG g MV^{-1}). Chá preto *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), chá mate (*Iex paraguariensis* A. St.-Hil.) e chá de camomila (*Matricaria recutita* L.) tiveram concentrações intermediárias.

Comparando-se o chá obtido por decocção de *M. oblongata* com os diferentes chás ou infusões de uso popular relatados na literatura observa-se uma maior concentração de compostos fenólicos totais, mesmo no que diz respeito ao chá verde, conhecido por seu poder antioxidante. Em contrapartida, os chás obtidos por decocção de *P. caerulea* e *E. giganteum* estão entre aqueles que apresentam menores concentrações citadas na literatura consultada.

4. Conclusões

A validação do método mostrou-se eficaz demonstrando, através da seletividade, ser linear e preciso. Para os 14 padrões avaliados, os coeficientes de correlação ficaram acima de 0,99 e a repetitividade do método permaneceu dentro dos limites aceitáveis, segundo a literatura. Permitindo que este protocolo de identificação e quantificação seja utilizado de forma eficiente e rápida para a caracterização de compostos fenólicos em espécies vegetais.

Dos 14 padrões avaliados, nove foram verificados nas decocções testadas, sendo que os compostos majoritários foram vitexina e naringina em *M. oblongata*, ácido clorogênico e naringina em *E. giganteum* e ainda, vitexina e ácido gálico em *P. caerulea*. Observou-se que a espécie *Myrcia oblongata* tem uma maior concentração de fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados individualmente. As diferentes ações benéficas dos compostos presentes nos chás obtidos por decocção de maracujá, guamirim e cavalinha, juntamente com seus teores de fenólicos totais, sugerem que a introdução destes chás na dieta pode favorecer o funcionamento do organismo, auxiliar na metabolização de compostos e prevenir danos causados por disfunções fisiológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, a CAPES, CNPq e à FAPERGS.

Referências

[1] Morais SM de, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia 19 (2009) 315-320.

[2] Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry 89 (2005) 27-36.

[3] Yaoa L, Jianga Y, Dattab N, Singanusongc R, Liud X, Duana J, Raymonte K, Lislee A, Xuf Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. Food Chemistry 84 (2004) 253-263.

[4] Zielinski AAF, Haminiuk CWI, Alberti A, Nogueira A, Demiate IM, Granato D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. Food Research International 60 (2014) 246-254.

[5] Patel SS, Soni H, Mishra K, Singhai AK. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology 1 (2011) 1-16.

[6] Ozarowskia M, Thiema B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. Revista Brasileira de Farmacognosia 23 (2013) 937-947.

[7] Michielin EMZ. Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico do óleo resina de cavalinha (*Equisetum arvense*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2002. 105p.

[8] Nascimento MA, Silva AK, França LCB, Quignard ELJ, Lopez JA, Almeida MG. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. Bioresource Technology 97 (2006) 1387-1391.

[9] Martins DMFH, Santos JGJr, Russe M, Lanziotti VMND, Leal LKAM, Cunha GMA. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. Pharmacological Research 49 (2004) 239-243.

[10] Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. Talanta 105 (2013) 192-203.

[11] Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5a. ed., Editora da UFRGS / Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2004. 833p.

[12] Borges LL, Alves SF, Sampaio BL, Conceição EC, Bara MTF, Paula JR. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia 23 (2013) 230-238.

[13] Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quimica Nova 27 2004 771-780.

[14] Ribeiro FAL de, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR da, Schneider R P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Quimica Nova 31 (2008) 164-171.

[15] Saito ST. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) Cultivar IAC-259. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. 108p.

[16] Morelli LLL. Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2010. 133p.

[17] Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos 27 (2007) 53-60.

[18] Baydar NG, Özkan G, Sagdiç O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. Food Control 15 (2004) 335-339.

[19] Waterhouse AL, Ignelzi S, Shirley JR. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. American Journal of Enology and Viticulture 51 (2000) 383-389.

[20] Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters J-N, Tits M, Angenot L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. Phytochemistry Analysis 15 (2004) 241-248.

[21] Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CBB, Schumacher NSG, Maróstica Jr MR, Meletti LMM, Zollner RL. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). International Immunopharmacology 18 (2014) 106-115.

[22] Silva JK da, Cazarin CBB, Colomeu TC, Batista AG, Meletti LMM, Paschoal JAR, Júnior SB, Furlan MF, Reyes FGR, Augusto F, Maróstica Jr MR, Zollner RL de. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. Food Research International 53 (2013) 882-890.

[23] Milovanović V, Radulović N, Todorović Z, Stanković M, Stojanović G. Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian Equisetum species. Plant Foods for Human Nutrition 62 (2007) 113-119.

[24] Mimica-Dukic N, Simin N, Cvejic J, Jovin E, Orcic D, Bozin B. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. Molecules 13 (2008) 1455-1464.

[25] Oniszczuka A, Podgórskia R, Oniszczukb T, Zukiewicz-Sobczakc W, Nowakd R, Waksmundzka-Hajnosa M. Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. *Industrial Crops and* Products 61 (2014) 377-381.

[26] Wubshet SG, Moresco HH, Tahtah Y, Brighente IMC, Staerk D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR: a-Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). Phytochemistry 116 (2015) 246-252.

[27] Thangavel P, Muthu R, Vaiyapuri M. Antioxidant potential of naringin – a dietary flavonoid – in N-Nitrosodiethylamine induced rat liver carcinogenesis. Biomedicine & Preventive Nutrition 2 (2012) 193-202.

[28] Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 28 (2007) 241-249.

[29] Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M, Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from Passiflora alata medicinal extracts and leaves. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37 (2005) 399-403.

[30] Garambone E, Rosa G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. Alimentos e Nutrição Araraquara 18 (2007) 229-235.

[31] Belinati KD. Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos *in vivo*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010. 62p.

[32] Barbosa VF de. Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2010. 83p.

[33] Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. Food Chemistry. 112 (2009) 664-670.

[34] Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML, Gurni AA. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10 (2011) 325-332.

[35] Nagai T, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. Food Chemistry 91 (2005) 389-394.

[36] Borges LL, Alves SF, Sampaio BL, Conceição EC, Bara MT, Paula JR. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia 23 (2013) 230-238.

[37] Moraes-de-Souza RA. Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007. 59p.

[38] Moraes-de-Souza RA, Oldoni TLC, Cabral ISR, Alencar SM de. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no brasil. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 29 (2011) 229-236.