



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

DÉBORA ODÍLIA DUARTE LEITE

**AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE RUTINA E QUERCETINA OBTIDAS A PARTIR DE *Dimorphandra gardneriana*
Tulasne.**

CRATO - CE

2015

DÉBORA ODÍLIA DUARTE LEITE

**AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE RUTINA E QUERCETINA OBTIDAS A PARTIR DE *Dimorphandra gardneriana*
Tulasne.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular (Linha de pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Coorientador:

Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro

CRATO – CE

2015

Leite, Débora Odília Duarte.
L533a Avaliação dos solventes extratores e atividade antioxidante de rutina e quercetina obtidas a partir de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne/ Débora Odília Duarte Leite. – Crato-CE, 2015
89p.; il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA. Linha de pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa
Coorientador: Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro

1. Rutina; 2. Quercetina; 3. *Dimorphandra gardneriana*;
4. Atividade antioxidante; 5. Extração. I. Título.

CDD: 615.32

DÉBORA ODÍLIA DUARTE LEITE

**AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES EXTRATORES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE RUTINA E QUERCETINA OBTIDAS A PARTIR DE *Dimorphandra gardneriana*
Tulasne.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Orientador)
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Junior (Avaliador interno)
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Jefferson Queiroz Lima (Avaliador externo)
Instituto Federal do Ceará - IFCE

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Suplente)
Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO – CE

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo que por meio da fé me fortaleceu nos momentos de fraqueza e desânimo.

Aos meus pais, Maria Rogenilma Leite e Odílio Duarte Freire (*in memoriam*), por ter me concedido o dom da vida, me amar e apoiar incondicionalmente.

Ao meu esposo, Rubens Dário Tavares Vieira por ser o primeiro a acreditar e incentivar o meu crescimento profissional, ser compreensivo e dedicado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa pela oportunidade, os ensinamentos e os valores passados ao longo da jornada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro pela oportunidade, pela disponibilidade e pela orientação sempre construtiva.

Aos meus familiares que me apoiaram e contribuíram de forma direta ou indireta para o andamento das atividades, em especial aos meus avós, Maria Albanita Gonçalves Tavares e Hilário Leite Tavares, e a minha tia Marcia Betânia Gonçalves Tavares.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular e toda sua equipe na pessoa do Coordenador Allysson Pontes Pinheiro.

Aos professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da URCA pelo incentivo e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao meu amigo Walmir Emanuel Miranda Cunha por estar sempre disponível a ajudar, ser paciente e solidário.

A minha amiga Cicera Jaciele Mattos Cassiano, que compartilhou de seus conhecimentos e de seu companheirismo em momentos diversificados.

Aos amigos Dr. Erlânio Oliveira Sousa e Ma. Camila Nobre, pelo auxílio nos testes antioxidantes.

A todos que fazem o Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), Ma. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues e os alunos de iniciação científica Janaine Camilo, Fábio Galvão, Carla Alves, Caroline Coelho e Wegila Costa que sempre torcem por resultados positivos e comemoram as conquistas.

Ao técnico em química do PADETEC Francisco José Elias Martins, pela disponibilidade e o auxílio no início dos testes, e em nome de quem agradeço a todos que fazem o PADETEC pelo acolhimento.

Aos meus colegas de mestrado que dividiram seus conhecimentos em estudos com aprendizagem cooperativa, Liana Oliveira, Ingrid Oliveira, Luciene Lima e Fernando Gomes.

Aos meus colegas de trabalho da Escola Wilson Dias Cabral, núcleo gestor que sempre compreendeu momentos em que estive ausente e professores que incentivaram a seguir sempre em frente.

A Universidade Regional do Cariri – URCA, pelo ambiente de convivência durante toda a minha história acadêmica e os bons frutos colhidos dela.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse projeto.

“Quando se decide trilhar o caminho do conhecimento há uma submissão ao sacrifício e a disciplina árdua que só se justifica com os resultados científicos alcançados.”

Rubens D.T. Vieira

RESUMO

Dimorphandra gardneriana, conhecida popularmente como fava d'anta, é uma árvore típica do cerrado brasileiro de amplo uso extrativista, por conta de seus frutos serem ricas fontes do flavonoide rutina, que apresenta propriedades farmacológicas de interesse comercial, em especial vasodilatadora e antioxidante. As principais formas de extração da rutina são pelo aquecimento, ebulição ou refluxo, sendo o solvente metanol o mais utilizado, que, devido à sua polaridade compatível com a rutina, resulta em um rendimento satisfatório. O metanol é um produto tóxico, prejudicial ao ambiente e às pessoas que fazem uso dele durante o manuseio no processo de extração. Técnicas que diminuam o tempo de extração, o volume do solvente e aumentem o rendimento da rutina vem sendo desenvolvidas, dentre elas: extração em fase sólida, cromatografia líquida de alta velocidade em contra corrente, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas e extração assistida mecanoquímica. No presente estudo a rutina foi extraída por meio do aquecimento dos frutos de *D. gardneriana*, testando a utilização de diferentes solventes, metanol (MeOH), etanol (EtOH), etanol/água (EtOH/H₂O) (1:1) e água (H₂O). A rutina foi hidrolisada para obtenção de quercetina, e analisada por meio de técnicas cromatográficas como Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As substâncias obtidas foram qualificadas e quantificadas. A capacidade antioxidante da rutina e da quercetina foram avaliadas em concentrações baixas utilizando os métodos de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH); espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS); poder de quelação do Fe²⁺; degradação da desoxirribose; e poder antioxidante pela redução do ferro (FRAP). O rendimento de rutina obtido em cada extração foi: 19,13% (Metanol), 18,23% (Etanol), 26,27% (Etanol/água) e 13,14 % (Água). Com exceção da extração com metanol, que quando possível apresentou grau de pureza de 83,59%, todas as demais atingiram pureza superior a 90%. A quercetina obtida por hidrólise da rutina foi quantificada com grau de pureza de 99,9%. Com exceção do poder de quelação de ferro, que não foi significativo nas concentrações testadas, em todos os demais testes a quercetina e a rutina apresentaram relevância significativamente estatística relacionada ao potencial antioxidante. É possível concluir com base nos resultados que o rendimento de rutina pode ser aumentado na extração das vagens de *D. gardneriana* Tulasne com a combinação de Etanol/água. A rutina e a quercetina em baixas concentrações são eficientes em testes antioxidante *in vitro* podendo ser utilizado em teste *in vivo* ou como controle positivo em teste *in vitro*.

Palavras-chaves: Rutina, quercetina, *Dimorphandra gardneriana*, atividade antioxidante, extração.

ABSTRACT

Dimorphandra gardneriana, popularly known as *fava d'anta*, is a typical tree of the Brazilian cerrado large extractive use, because of its fruits are rich sources of flavonoid rutin, which has pharmacological properties of commercial interest, especially vasodilator and antioxidant. The main forms of extraction by heating is rutin, boiling or reflux, with methanol as the solvent used, which, due to their polarity compatible with rutin, results in a satisfactory yield. Methanol is a toxic, harmful to the environment and the people that use it during handling in the extraction process. Techniques which reduce the extraction time, the solvent volume and increase the efficiency of the routine has been developed, among them: solid phase extraction, liquid chromatography high speed counter current, ultrasound-assisted extraction, extraction by microwave assisted and mechanochemistry assisted extraction. In the present study, the rutin was extracted by heating the fruit *D. gardneriana*, testing the use of different solvents, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), ethanol / water (EtOH / H₂O) (1: 1) and water (H₂O). Rutin was hydrolyzed to obtain quercetin, and analyzed by chromatographic techniques such as thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The obtained substances were qualified and quantified. The antioxidant activity of quercetin and rutin at low concentrations were evaluated using the methods sequestration radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH); reactive species with thiobarbituric acid (TBARS); chelating power of Fe²⁺; degradation of deoxyribose; and antioxidant power for the reduction of iron (FRAP). The yield of rutin obtained from each extraction was: 19.13% (Methanol), 18.23% (Ethanol), 26.27% (Ethanol / water) and 13.14% (water). Except extraction with methanol, showed that where possible purity of 83.59%, all other reached a purity exceeding 90%. The quercetida obtained by hydrolysis of rutin was quantified with a purity of 99.9%. Aside from the power of iron chelation, which was not significant at the concentrations tested, in all other tests quercetin and rutin had significantly statistical significance related to the antioxidant potential. It is possible to conclude from the results that the yield of rutin can be increased in the extraction pod *D. gardneriana* Tulasne with the combination of ethanol / water. The rutin and quercetin in low concentrations are effective in antioxidant in vitro tests can be used in in vivo test or as positive control in vitro test.

Keywords: rutin, quercetin, *Dimorphandra gardneriana*, antioxidant activity, extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esqueleto de um flavonoide.....	18
Figura 2 – Estruturas químicas dos flavonoides rutina e quercetina.....	19
Figura 3 – Mapa de ocorrência de fava d’anta.....	24
Figura 4 - Etapas da extração em fase sólida.....	26
Figura 5 – Diagrama de unidade HSCCC.....	28
Figura 6 – Cavitação acústica produzida pela onda ultrassônica.....	29
Figura 7 – Esquema de sonda de ultrassom e de banho de ultrassom.....	30
Figura 8 – Rendimento de rutina em extração aquosa e extração metanólica.....	31
Figura 9 – Espectro eletromagnético.....	32
Figura 10 – Movimento em moinho de bolas do tipo planetário.....	33
Figura 11 – Processo de peroxidação lipídica.....	35
Figura 12 – Fotografia da <i>Dimorphandra gardneriana</i> no local da coleta.....	39
Figura 13 – a) Sistema de refluxo a 80°C; b) filtração comum.....	44
Figura 14 – CCD da rutina extraída com diferentes solventes.....	54
Figura 15 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com MeOH.....	56
Figura 16 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com EtOH.....	58
Figura 17 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com EtOH+H ₂ O.....	60
Figura 18 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com H ₂ O.....	62
Figura 19 – Esquema da hidrólise da rutina.....	65
Figura 20 – Amostra em placa cromatográfica de camada delgada.....	66
Figura 21 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da quercetina hidrolisada.....	67
Figura 22 - Relação estrutura- atividade de Rutina e Quercetina. Em azul substituintes menos importantes à atividade antioxidante. Em vermelho substituintes importantes à atividade antioxidante.....	68
Figura 23 - Reação química entre o radical DPPH e uma espécie antioxidante.....	69

Figura 24 - Reação do DPPH com a quercetina e a rutina.....	71
Figura 25 - Poder antioxidante de redução do ferro.....	72
Figura 26 - Ação quelante de polifenóis.....	74
Figura 27 - Degradação da desoxirribose.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de calibração da quercetina.....	67
Gráfico 2 – Efeito de diferentes concentrações de rutina e quercetina frente ao radical DPPH.....	69
Gráfico 3 – Absorbância do complexo ferroso frente a quercetina e a rutina.....	73
Gráfico 4 – Atividade quelante de ferro (Fe^{2+}) de quercetina e rutina.....	74
Gráfico 5 – Efeitos de diferentes concentrações da quercetina e rutina sobre o radical hidroxil produzido pela reação Fe^{2+} (0,1 mM) e H_2O_2 (1 mM).....	76
Gráfico 6 - Efeitos de diferentes concentrações da quercetina e rutina sobre peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de gema de ovo na presença (induzido) de Fe^{2+} (20 μM).....	77

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Representação simplificada da metodologia de purificação da rutina.....	43
Fluxograma 2 – Representação simplificada do método de obtenção da quercetina hidrolisando rutina.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de extração da rutina para cada solvente utilizado.....	42
Tabela 2 – Preparo de soluções para o teste DPPH.....	46
Tabela 3 – Preparo de reagentes para o teste FRAP.....	47
Tabela 4 – Preparo de soluções para o teste FRAP.....	48
Tabela 5 – Preparo de soluções para o teste quelante de íons Fe^{2+}	48
Tabela 6 – Preparo de soluções para o teste da desoxirribose.....	49
Tabela 7 – Preparo de soluções para o teste de inibição da peroxidação lipídica.....	50
Tabela 8 – Rendimento da rutina de rutina extraída de fava d'anta com diferentes solventes antes e após purificação.....	54
Tabela 9 – Valores para equação da reta da rutina nos comprimentos de onda 274nm e 320nm.....	55
Tabela 10 – Quantificação da rutina extraída com diferentes solventes.....	55

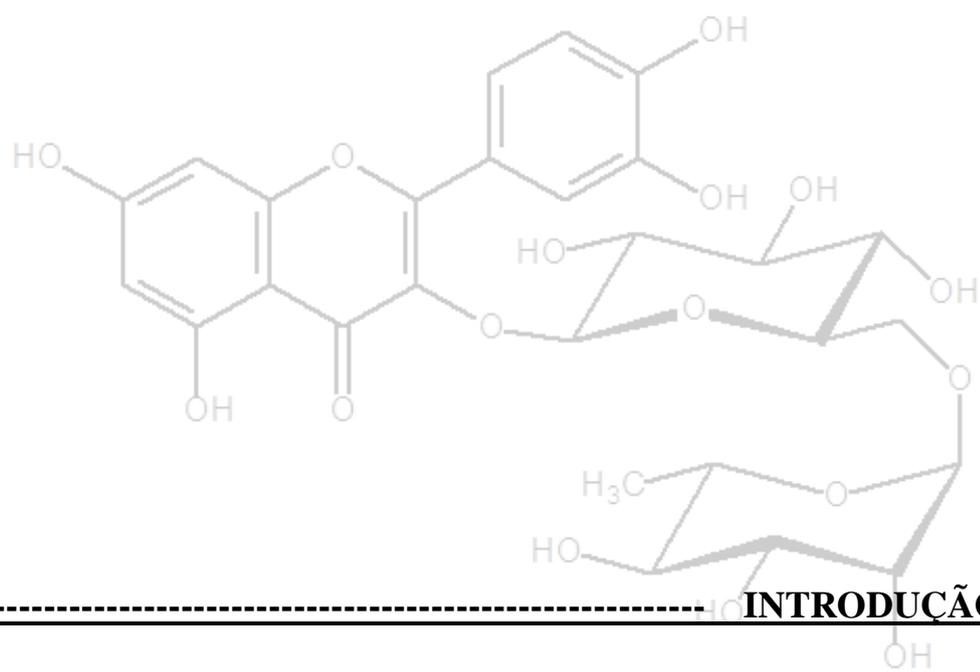
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- CBP – *Chemically Bound Phase* (Fase quimicamente ligada)
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CE₅₀ – Concentração eficiente capaz de inibir 50%
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
- FISPQ – Ficha de informação de segurança de produto químico
- FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power* (Poder antioxidante de redução do ferro)
- HCDAL - Herbário Cariense Dárdano de Andrade Lima
- HSCCC – *High-Speed Counter-Current Chromatography* (Cromatografia de alta velocidade em contracorrente)
- MAE – *Microwave-Assisted Extraction* (Extração assistida por micro-ondas)
- MDA - Malondialdeído
- pH – Potencial hidrogeniônico
- rpm – Rotação por minuto
- EPM – Erro padrão da média
- SPE – *Solid phase extraction* (Extração em fase sólida)
- TCA – *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloro acético)
- TBA – *Thiobarbituric acid* (Ácido tiobarbitúrico)
- TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
- TPTZ – 2,4,6 – tris (2-pirridil)-s-triazina
- UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 <i>Dimorphandra gardneriana</i>	24
3.2 Métodos de extração da rutina.....	25
3.2.1 Extração em Fase Sólida (SPE).....	26
3.2.2 Cromatografia de Alta Velocidade em Contracorrente (HSCCC).....	27
3.2.3 Extração assistida por ultrassom.....	29
3.2.4 Extração Assistida por Micro-ondas (MAE).....	31
3.2.5 Extração Assistida Mecanoquímica.....	33
3.3 Atividade antioxidante da rutina.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Materiais.....	39
4.1.1 Material Vegetal.....	39
4.1.2 Reagentes químicos e solventes.....	40
4.1.3 Equipamentos.....	40
4.2 Métodos Cromatográficos.....	41
4.3 Obtenção, purificação e quantificação da Rutina.....	41
4.3.1 Obtenção da Rutina.....	41
4.3.2 Purificação da Rutina.....	42
4.3.3 Quantificação da Rutina.....	43
4.4 Obtenção, purificação e quantificação da Quercetina.....	43
4.4.1 Obtenção da Quercetina.....	43
4.4.2 Purificação da Quercetina.....	44
4.4.3 Quantificação da quercetina.....	45
4.5. Avaliação da Capacidade Antioxidantes.....	46
4.5.1 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método DPPH.....	46
4.5.2. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de redução do ferro (FRAP)	47

4.5.3 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela capacidade quelante de íons Fe ²⁺	48
4.5.4 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela degradação da desoxirribose.....	49
4.5.5 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela inibição da peroxidação lipídica.....	50
4.6 Análise Estatísticas.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Obtenção da Rutina.....	53
5.2 Hidólise da Rutina: Quercetina.....	64
5.3 Atividade antioxidante de Rutina e Quercetina.....	67
5.3.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método DPPH.....	68
5.3.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de redução do ferro (FRAP).....	72
5.3.3 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela capacidade quelante de íons Fe ²⁺	73
5.3.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela degradação da desoxirribose.....	75
5.3.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pela inibição da peroxidação lipídica.....	76
6. CONCLUSÃO.....	79
7. PERSPECTIVAS.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	83



1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência e a reprodução das espécies constituem o principal objetivo de todos os seres vivos. Os constituintes químicos específicos, também chamados de produtos naturais, desenvolvidos por organismos vegetais, fazem parte de um conjunto de estratégias que surgiram de forma aleatória em determinadas espécies e se tornaram importantes armas em busca de sua perpetuação (FILHO, 1994).

O conhecimento empírico de comunidades que utilizam determinados vegetais para benefício próprio constitui uma importante fonte para nortear o início de muitas pesquisas científicas, tendo em vista que o relato de espécies botânicas por populares que carregam uma experiência significativa apresenta uma suposição tácita de maior sucesso na descoberta de novos fármacos (ALBUQUERQUE E HANAZAKI, 2006).

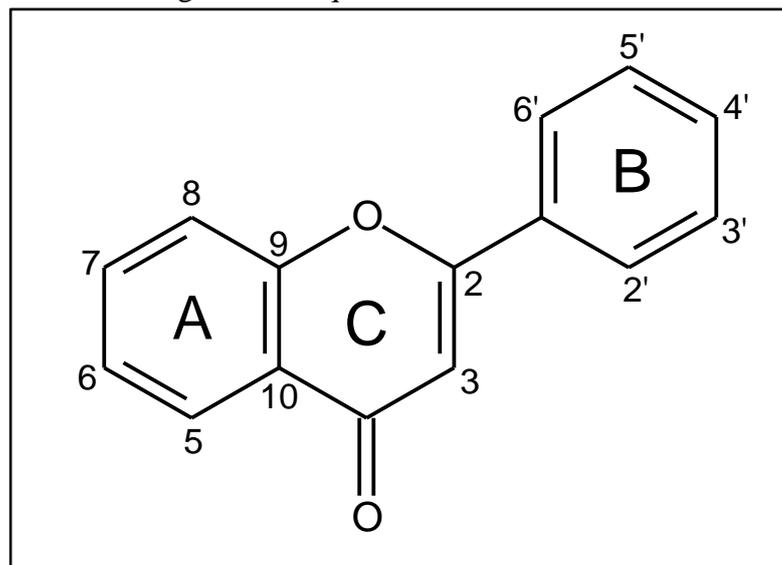
O Brasil se desenvolve em passos extremamente curtos no que se refere a pesquisas relacionadas a constituintes químicos de ação terapêutica, pois de acordo com Alves (2010), em 2010 este mercado movimentou cerca de 25 bilhões de dólares, com apenas 2-3% de participação do Brasil, o que é pouco justificável levando em conta a exuberância da natureza brasileira com propriedades medicinais.

Muitos metabólitos secundários já foram purificados e são utilizados hoje como aliados na sobrevivência da espécie humana, como precursores de produtos farmacológicos, cosméticos ou alimentícios e ainda na produção de tecidos, sempre visando uma melhor qualidade de vida. Dentre esta diversidade os mais relevantes são pertencentes à classe das cumarinas, polifenóis (flavonoides, taninos, antraquinonas), alcaloides, triterpenos e esteroides (SIMÕES et al., 2002).

A fitoquímica caracteriza-se pela análise dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais, visando a utilização desses recursos nas indústrias cosmética, têxtil, alimentícia e farmacêutica, visto que esses metabólitos são protagonistas do sucesso evolutivo de muitas espécies. Segundo Collins e colaboradores (2006), a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes por migração diferencial em duas fases (a fase estacionária e a fase móvel), que estão em contato íntimo. Esse método destaca-se na fitoquímica por ser considerado um dos mais relevantes em resultados satisfatórios e por apresentar uma diversidade maior de técnicas (MATOS, 2009).

Os flavonoides são uma classe de compostos orgânicos fenólicos cujo esqueleto é constituído por 15 átomos de carbono distribuídos em três anéis, dois anéis fenólicos (anel A e anel B) e um heterocíclico pirano (anel C) acoplado ao anel A conforme apresentado na Figura 1 (BARBOSA, 2010; FERREIRA, OLIVEIRA e SANTOS, 2008). Sua ocorrência em plantas é na forma de flavonoides glicosilados, por estarem sempre acompanhados de glicídios, a forma isenta de glicosídeos recebe o nome de aglicona (MACHADO et al., 2008). O crescente interesse por flavonoides se explica devido às suas diferentes propriedades, que fazem com que apresentem efeitos significativos sobre os sistemas biológicos, dentre elas a ação antioxidante. Quimicamente, os flavonoides são doadores de elétrons, o potencial antioxidante desses compostos está relacionado com as hidroxilas em C4' e C3'. Estudos indicam que agliconas têm grande capacidade antioxidante, maior que de flavonoides conjugados (DORNAS et al., 2008; MACHADO et al., 2008).

Figura 1 – Esqueleto de um flavonoide.



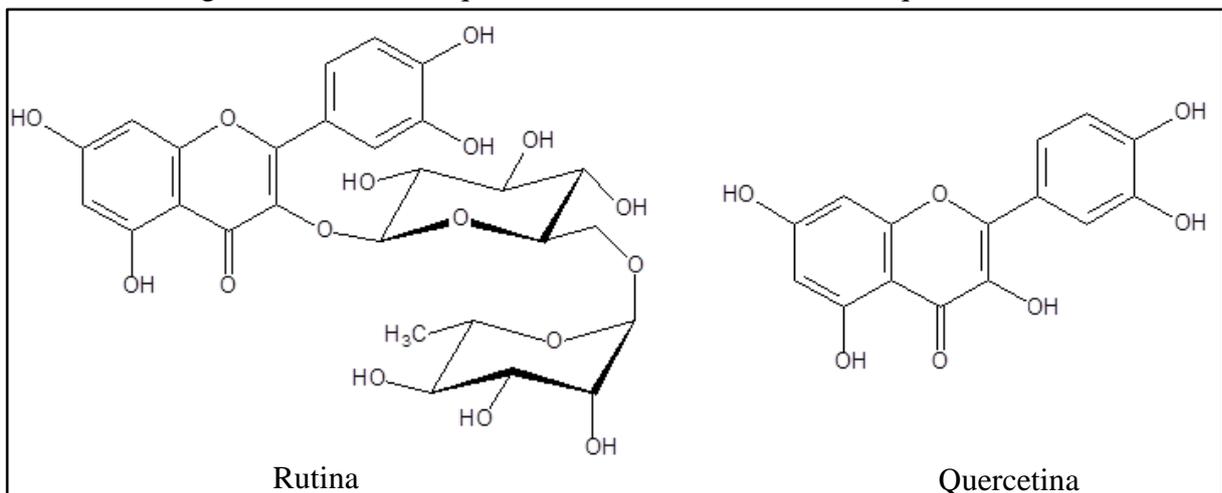
Fonte: Própria autora.

Os flavonoides também podem atuar como bioativos em estudos da atividade anti-inflamatória. Em algumas classes essa atuação é atribuída ao aumento da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que promove maior produção de óxido nítrico (VOLP et al., 2008). A agregação plaquetária, que diminui o processo inflamatório dos vasos, o que acarretaria problemas cardiovasculares, constitui mais um benefício dos flavonoides, benefício este associado a alterações na síntese dos eicosanoides celulares (VOLP et al., 2008). Outra atividade bastante importante é a inibição do ciclo celular. Já foi demonstrada essa propriedade por meio do bloqueio da duplicação celular na fase G1/S, o que pode diminuir a

reprodução de células indesejáveis. Muitas atividades bioquímicas poderiam ser atribuídas aos flavonoides, e todas elas estão intimamente ligadas à estrutura química desses compostos que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO et al., 2008).

A rutina, apresentada na Figura 2, pertence à subclasse dos flavonóis (BECHO, MACHADO e GUERRA, 2009), destacando-se devido às suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005), sendo a forma glicosídica mais comum da quercetina que por sua vez é o flavonoide mais estudado e o flavonol mais comum na dieta humana (ERLUND, 2004). A fórmula estrutural da quercetina está também apresentada na Figura 2, este é um flavonoide com maior potencial antioxidante quando comparado a rutina (MATERSKA, 2008).

Figura 2 – Estruturas químicas dos flavonoides rutina e quercetina.



Fonte: Própria autora.

Dimorphandra gardneriana é uma importante fonte de rutina, conhecida popularmente como fava d'anta ou faveiro, uma árvore leguminosa nativa do Brasil. Sua ocorrência é verificada nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (LANDIM e COSTA, 2012). A área de proteção ambiental da Chapada do Araripe desperta a atenção por suas riquezas, que consistem em importante fonte de renda para as comunidades. Dentre as espécies exploradas está a *D. gardneriana*, pois dos frutos do faveiro é obtida a rutina, comercializada na região por grandes indústrias farmacêuticas (SILVA, 2007).

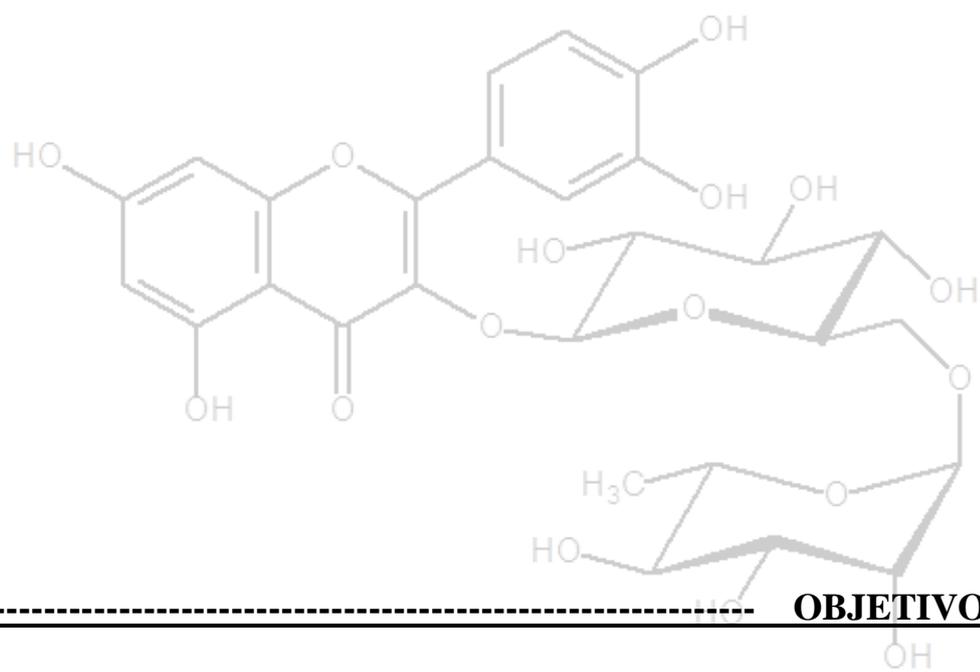
A principal forma de extração da rutina em *D. gardneriana* é por aquecimento com uso do metanol como solvente (SANTOS, 2006) que, devido à sua polaridade, dissolve

diversas substâncias, sendo importante insumo em pesquisas químicas (CAMARGO, 2007). O metanol é uma substância inflamável e tóxica, podendo provocar efeitos graves à saúde humana, possui propriedades narcóticas peculiares, e causa irritação nas mucosas. A ingestão massiva produz um estado de coma que poderá persistir até quatro dias. Considerado um veneno de efeito cumulativo, mesmo exposições curtas aos vapores, que não causariam efeitos prejudiciais, quando se tornam constantes podem provocar danos à saúde (PEREIRA e ANDRADE, 1998). Na atmosfera, a meia vida do metanol é de aproximadamente nove dias, este álcool poderá reagir com SO₂ e ácido sulfúrico presentes na atmosfera, tendo como produto sulfato de dimetila, que tem sido demonstrado em estudos ser altamente tóxico e mutagênico, tendo sido classificado como um provável agente cancerígeno para seres humanos (PEREIRA e ANDRADE, 1998).

Em atividades que objetivam a extração de substâncias naturais, a toxicidade, os riscos de manuseio, a disponibilidade e o custo do solvente devem ser observados, além da eficiência extrativa (FALKENBERG et al., 2000).

Técnicas de extrações aquosas de rotina a partir de *D. gardneriana* vem sendo testadas e aperfeiçoadas em diversas pesquisas científicas a fim de minimizar a contaminação ambiental e preservar a saúde humana com custos reduzidos e valorização do produto final (CRAVEIRO, 2012).

Além de pesquisas com diferentes solventes para minimizar os efeitos tóxicos na extração de rotina, uma diversidade de metodologias e técnicas extrativas que objetivam principalmente, um maior rendimento da substância vêm sendo abordadas em diversos trabalhos científicos (PEDRIALI, 2005; SANTOS, 2006).



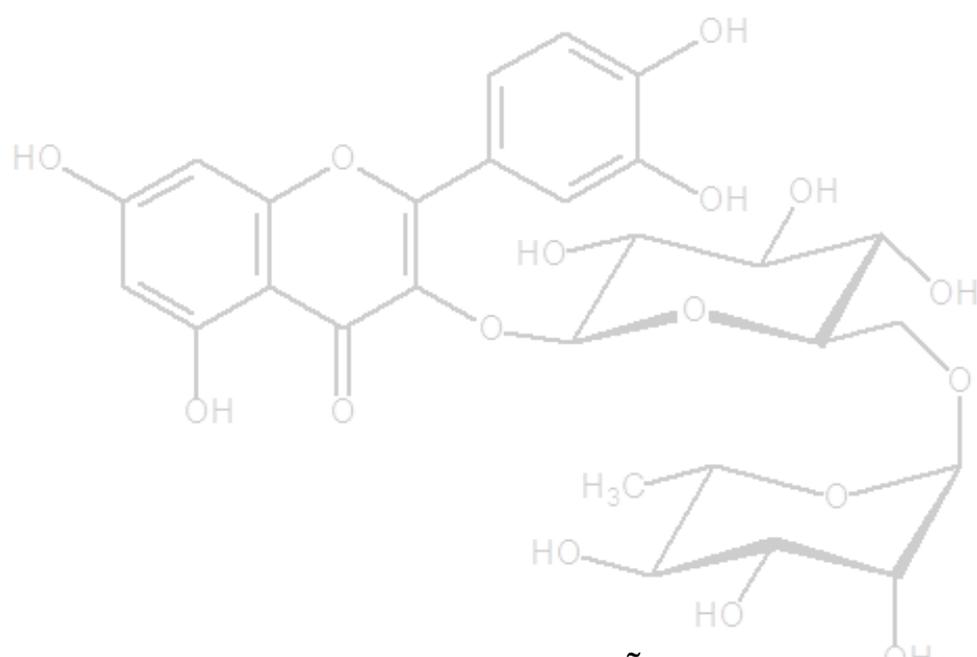
2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso de diferentes solventes na extração da rutina da espécie nativa *Dimorphandra gardneriana* Tulasne, seja em sua forma natural ou transformada na espécie hidrolisada quercetina, para aplicações farmacológicas relacionadas à sua atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o rendimento de diferentes solventes na extração da rutina para estabelecer um processo mais seguro e eficiente.
- Obter rutina pelo método de aquecimento utilizando diferentes solventes;
- Purificar e quantificar a rutina por cristalização e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Sintetizar quercetina por hidrólise ácida da rutina;
- Purificar e quantificar a quercetina por cristalização e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Verificar o potencial antioxidante da rutina e quercetina *in vitro*, utilizando os métodos sequestro do radical DPPH, espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), poder de quelação do metal Fe^{2+} , degradação da desoxirribose e redução do ferro (FRAP).



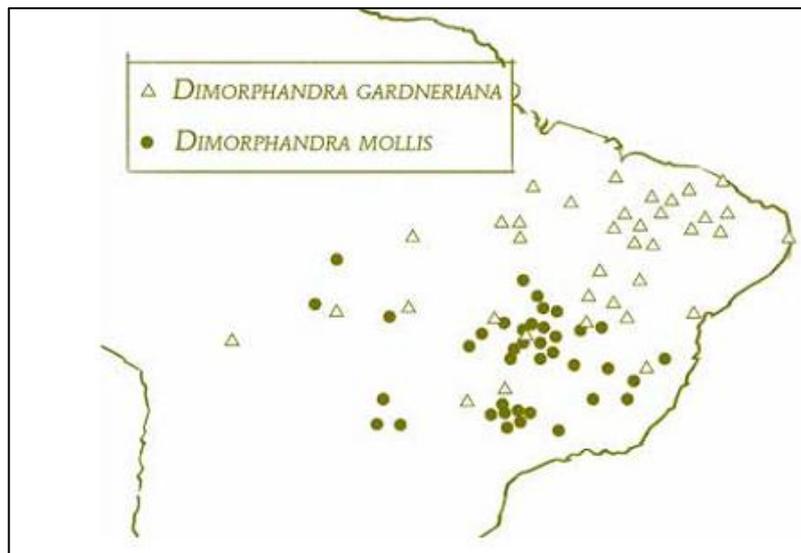
REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Dimorphandra gardneriana*

Dimorphandra gardneriana Tulasne, família Fabaceae (leguminosas), subfamília Caesalpinioideae, popularmente conhecida como fava d'anta, faveiro ou falso barbatimão, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro que se encontra amplamente distribuída nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (Figura 3) (FILIZOLA, 2013; LANDIM E COSTA, 2012). Caracterizada como uma árvore de porte médio, podendo atingir no máximo 20 m de altura (FILIZOLA, 2013), é considerada uma das mais importantes espécies do gênero devido ao grande uso na medicina juntamente com a *Dimorphandra mollis* (SUDRÉ, 2009).

Figura 3- Mapa de ocorrência de Fava D'anta.



Fonte: Adaptado de FILIZOLA, 2013.

D. gardneriana é uma espécie que tolera de forma positiva solos secos e pobres, sendo pioneira na sucessão ecológica, preparando o solo para espécies mais exigentes (FILIZOLA, 2013; SUDRÉ, 2009). Apresenta também importância na cadeia alimentar do ecossistema em que está inserida, por meio da qual fazem a dispersão de suas sementes, no entanto, informações ecológicas mais detalhadas ainda se encontram escassas na literatura, impossibilitando um estudo rigoroso do nicho ecológico da espécie (SILVA, SCARIOT E MEDEIROS, 2012).

A principal atividade ligada à fava d'anta é o extrativismo dos seus frutos devido a presença de um importante bioflavonóide de grande interesse na indústria farmacêutica, a rutina, que apresenta atividade vitamínica P, diminuindo a permeabilidade dos glóbulos vermelhos, protegendo a vitamina C contra a oxidação e normalizando a resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares (DÔRES, 2007), chegando a rendimentos em torno de 10% (LANDIM E COSTA, 2012). Além da rutina, *D. gardneriana* apresenta também quercetina, ramnosa, e galactomanano, substâncias químicas de interesse e usos diversificados na indústria química, farmacêutica e alimentícia (SILVA et al., 2012; DÔRES, 2007; SUDRÉ, 2009).

A rutina pode ser encontrada em uma diversidade de espécies vegetais, no entanto apenas um pequeno número de plantas apresenta quantidade de rutina de extração suficiente para viabilidade industrial (PEDRIALI, 2005). Com base em um levantamento realizado por Sudré (2009), a rutina está entre os dez produtos farmacológicos mais exportados pelo Brasil, sendo que as espécies *D. mollis* e *D. gardneriana* respondem por metade da produção mundial, estando distribuídas entre os estados do Maranhão (30%), Piauí (28%), Minas Gerais (23%), Ceará (6%), Bahia (4%), Mato Grosso e Goiás (3% cada). A exportação de rutina tem como responsáveis três empresas: a nacional Sanrisil – Goiás, a nacional Produtos Vegetais AS – Piauí e a Multinacional Merck - Maranhão. Os 50% restantes da produção mundial vem da espécie chinesa *Sophora japonica*. Embora existam outras fontes vegetais de rutina, o rendimento é o principal fator que inviabiliza a participação desses vegetais na produção mundial da substância.

O extrativismo dos frutos de fava d'anta para extração de rutina vem sendo ameaçado pela falta de práticas de manejo sustentável, o que diminui as populações naturais da espécie com crescente risco de extinção. Estudos recentes já alertaram para a necessidade de implantar medidas de conservação e preservação da espécie (FILIZOLA, 2013; SILVA, SCARIOT E MEDEIROS, 2012; SUDRÉ, 2009; SILVA, 2007).

3.2 Métodos de extração da rutina

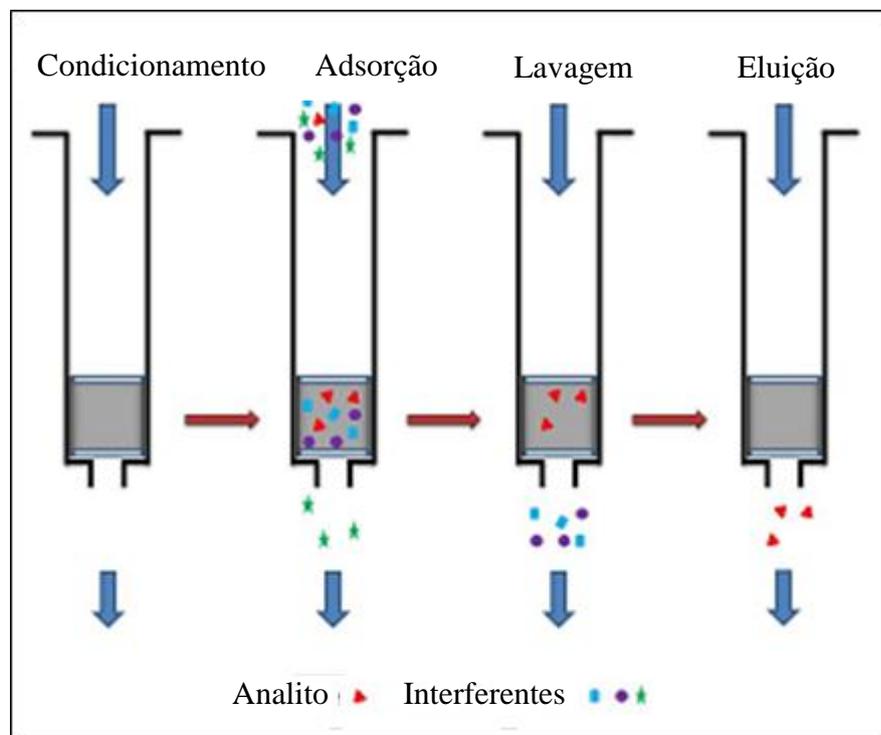
A extração de rutina é realizada com maior frequência por meio de métodos nos quais o material vegetal, juntamente com o solvente, é submetido a aquecimento, ebulição e extração sob refluxo. Esses métodos ocasionam considerável perda da substância, além do consumo de elevada quantidade de solvente e um longo período de extração (YANG e ZHANG, 2008). Métodos mais eficientes que minimizam esses efeitos negativos vêm

ganhando espaço na extração de rotina, e precisam ser difundidos e testados a fim de qualificar os métodos de extração de rotina oriunda de fontes naturais. A seguir serão descritos alguns métodos já utilizados.

3.2.1 Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida é uma técnica que emprega membranas, pequenas colunas descartáveis na forma de seringa ou cartuchos recobertos por um composto orgânico hidrofóbico (SKOOG et al., 2006). As etapas que compreendem a extração em fase sólida (SPE) são, segundo Bueno (2012): condicionamento, adsorção, lavagem e eluição, conforme mostrado na Figura 4. O condicionamento consiste em um pré-tratamento utilizando um solvente intermediário que possa tornar compatível solução aquosa e partículas esféricas adsorventes. A adsorção consiste na passagem da amostra aquosa pelo cartucho de extração. A lavagem trata da remoção dos interferentes que foram adsorvidos junto ao analito e por último a eluição, etapa utilizada para remoção dos analitos retidos nos adsorventes e que serão transferidos para a fase móvel.

Figura 4 – Etapas da Extração em Fase Sólida.



Fonte: Adaptado de LUCCI et al., 2012.

Em um isolamento de rutina utilizando essa técnica, feito por Buszewski et al. (1993), diferentes colunas SPE foram testadas, com fase quimicamente ligada (CBP) que variava de polar a não polar. Utilizando como fase móvel água-metanol (3:7 v/v) em fluxo de 0,5 mL/min à temperatura de 20°C, a maior capacidade de sorção da rutina foi obtida em embalagens não polares, especialmente na extração em fase sólida com adsorvente Octadecil (C18), cuja a fórmula da CBP era $-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. A capacidade de recuperação da rutina também foi maior na SPE C18, sendo de 97,4 % para rutina padrão, 97,1% para a rutina de *Flos hippocastani*, 97,3% para a rutina do fármaco Venescin®, e 97,1% para a rutina do fármaco Venacorn®, com desvio padrão nunca superior a 1%. O estudo concluiu a alta reprodutibilidade desta técnica no isolamento de substâncias.

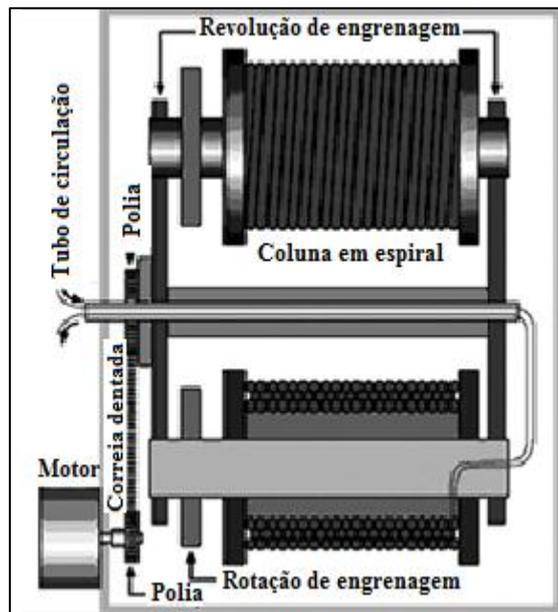
3.2.2 Cromatografia de Alta Velocidade em Contracorrente (HSCCC)

A Cromatografia de alta velocidade em contracorrente é derivada da cromatografia de partição líquido-líquido e é usada na separação de substâncias muito polares que ficam adsorvidas em fase estacionária sólida, evitando a perda de material por adsorção (SILVA et al., 2012; MENG et al., 2009). A HSCCC está entre as mais utilizadas para separação de produtos naturais, composta por uma bobina de tubo de teflon enrolado de forma espiral, que realiza movimento planetário em torno de um eixo central, conforme apresentado na Figura 5. Nesta técnica, a fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga e a fase móvel pode ser bombeada em alta velocidade permitindo, assim, menor tempo de análise por HPLC (LEITE et al., 2005). As fases para realização da análise compreendem seleção do sistema de solvente bifásico, determinação do coeficiente de partição dos analitos, preparo do sistema de solvente bifásico e da solução da amostra, seleção do modo de eluição, fluxo da fase móvel, velocidade de rotação e monitoramento das frações (BICALHO, 2011).

Meng e colaboradores (2009) realizaram a extração de rutina a partir da erva medicinal chinesa *Herba cirsi*. Utilizando a HSCCC, um sistema de solvente de duas fases foi preparado adicionando acetato de etila, n-butanol e água (5:1,5:5, v/v/v) a um funil de separação que foi equilibrado por agitação cuidadosa várias vezes. A fase superior constituiu a fase estacionária, a inferior constituiu a fase móvel. As duas fases foram bombeadas para a coluna de acordo com a relação de volume 50:50, em seguida ocorreu o bombeamento da fase móvel a um fluxo de 2 mL/min. O aparelho operava a 800 rpm e temperatura de 20°C. O equilíbrio hidrostático foi alcançado em 30 min. A solução da amostra, preparada por dissolução de 60 mg do extrato bruto em 5 mL da fase superior (estacionária), foi injetada na

coluna de separação e o efluente continuamente monitorado por um detector de UV com comprimento de onda ajustado para 254 nm. O cromatograma foi registrado após 50 min da injeção da amostra. Diferentes frações foram coletadas e evaporadas até a secura sob pressão reduzida. A análise por HPLC permitiu constatar a partir de 60 mg da amostra a obtenção de 25,2 mg de rutina com 99,2% de pureza.

Figura 5 – Diagrama da unidade HSCCC.



Fonte: Adaptado de <http://pubs.acs.org/subscribe/archive/tcaw/10/i07/html/07inst.html>.

Acesso em: 07 jan. 2015.

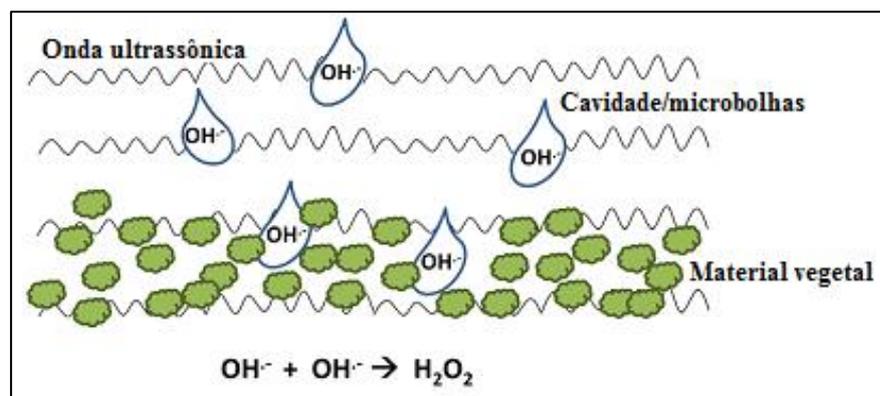
Dai e colaboradores (2013), em estudo mais recente, também fizeram uso da HSCCC para isolar rutina das folhas de *Eucommia ulmoides*, uma erva muito utilizada na medicina asiática. Éter de petróleo, acetato de etila, metanol e água (1:5:1:5, v/v/v/v) foram utilizados para preparação de um sistema de solventes bifásicos. A fase superior (estacionária) foi usada para preencher a coluna isoladamente, em seguida a fase inferior (móvel) foi bombeada a um fluxo de 1,5 mL/min, com o aparelho operando a 850 rpm. Com o equilíbrio hidrostático, a amostra formada pela dissolução de 100 mg de uma fração do extrato em 20 mL da fase móvel foi injetada no aparelho com monitoramento do efluente por meio de um detector de UV a 254 nm, coletando as frações do pico de acordo com o perfil cromatográfico. Por fim obteve-se 5,2 mg de rutina recolhidos durante 180-205 min. A análise por HPLC atribuiu 96,1% de pureza.

3.2.3 Extração assistida por ultrassom

Ultrassom é uma onda mecânica com frequências maiores que 20 kHz, podendo se propagar em meio sólido, líquido e gasoso, e constitui ferramenta com uma diversidade de aplicações na medicina, na biologia e na engenharia (CAVALHEIRO, 2013; KORN, ANDRADE e BORGES, 2003). Em laboratórios de química analítica, essa técnica pode ser utilizada na extração sólido-líquido, extração líquido-líquido, separação granulométrica, desgaseificação, degradação de matéria orgânica, separação por co-precipitação e geração de reagentes. As ondas de ultrassom aumentam a interação solvente e superfície dos sólidos, aumentando naquele a concentração de espécies presentes do material investigado (KORN, ANDRADE e BORGES, 2003).

A propagação no líquido cria uma vibração que causa uma variação na pressão, gerando a cavitação vista na Figura 6, em que os gases dissolvidos migram formando microbolhas que se expandem e se comprimem até implodirem com liberação de calor, que aumenta a solubilidade, e gerando pressão colidindo com superfícies sólidas. As colisões rompem as células vegetais, o que facilita a difusão do solvente (LUZ, 1998; CAVALHEIRO 2013).

Figura 6 - Cavitação acústica produzida pela onda ultrassônica.

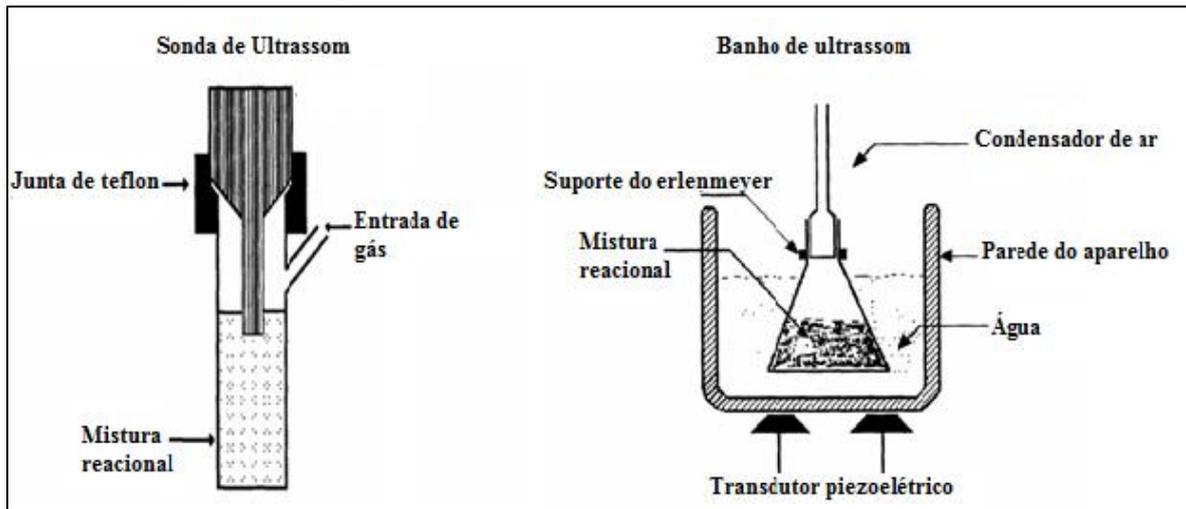


Fonte: Adaptado de CHUA, 2013.

A parte básica de um equipamento de ultrassom é o transdutor, ou vibrador, que converte energia mecânica ou elétrica em som de alta frequência, que pode ser a jato de ar ou gás, a jato de líquido e eletromecânico, devendo ser considerado o poder de vibração a determinada temperatura e pressão, a frequência de operação e a eficiência. (LUZ, 1998).

Os equipamentos de ultrassom mais utilizados são a sonda ultrassônica e o banho de ultrassom, cujos esquemas estão apresentados na Figura 7. A primeira com o passar do tempo tende a perder a intensidade e a uniformidade na distribuição de energia, já a segunda transmite energia a uma região mais discreta (CAVALHEIRO, 2013).

Figura 7 – Esquema de sonda de ultrassom e de banho de ultrassom



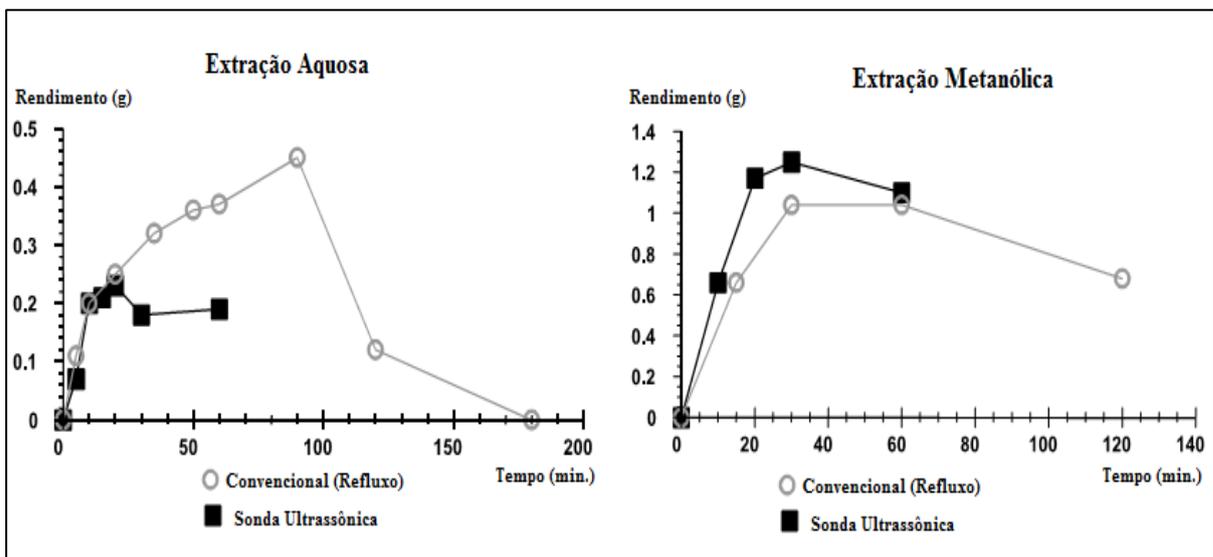
Fonte: Adaptado de LUZ, 1998.

Em estudo realizado por Yang e Zhang (2008), rutina foi extraída da espécie *Euonymus alatus* (Thunb.) por ultrassom. O equipamento utilizado foi o banho de ultrassom com transdutores de 50 kHz e potência de 100 W. A amostra foi preparada dissolvendo 0,5 g de talos secos triturados em 20 mL de solvente e depositados em um frasco com volume para 25 mL, em seguida o frasco foi imerso no banho de ultrassom que continha 2 L de água. As condições otimizadas pelos autores, indicaram o volume de 40 mL/g como sendo o melhor, e a proporção de solvente que estabelece melhor rendimento de extração foi o etanol 70%. O tempo que se mostrou mais eficiente foi 3 x 30 min, sendo que para cada 30 min ocorria a troca do solvente. O rendimento de rutina sob as condições otimizadas na extração assistida por ultrassom foi de 0,299 mg/mL com recuperação de 99,5%, rendimento este superior ao obtido no processo de extração por maceração comparado neste mesmo estudo.

Paniwnyk e colaboradores (2001) também realizaram estudo para isolamento de rutina utilizando sonda ultrassônica. A rutina foi isolada de botões florais secos da árvore chinesa *Sophora japonica*, onde 10 g do vegetal foram triturados com água (100 cm³), ajustado o pH entre 6-8 com NaOH (1M) e submetido a sonda ultrassônica de 20 kHz, 27 W a 23°C por períodos variados. A mistura foi filtrada e acidificada (pH 5-6) ficando em repouso durante a

noite para precipitação da rutina, que foi então recolhida por filtração a vácuo e purificada. Também utilizaram o metanol como solvente em substituição da água, para tanto não houve a necessidade de acidificação e o solvente foi removido utilizando evaporador rotativo. O resíduo foi dissolvido em água, seguido da precipitação a partir da solução, extraindo com éter dietílico para remoção da clorofila. O precipitado da fase aquosa foi recolhido por filtração a vácuo. A extração utilizando metanol com sonda ultrassônica mostrou-se mais eficiente do que o método convencional de extração sob refluxo, reduzindo o tempo de extração e aumentando o rendimento. A extração aquosa não foi eficaz devido a formação de radicais livres. Os resultados foram expressos em gráficos conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Rendimento de rutina em extração aquosa e extração metanólica.



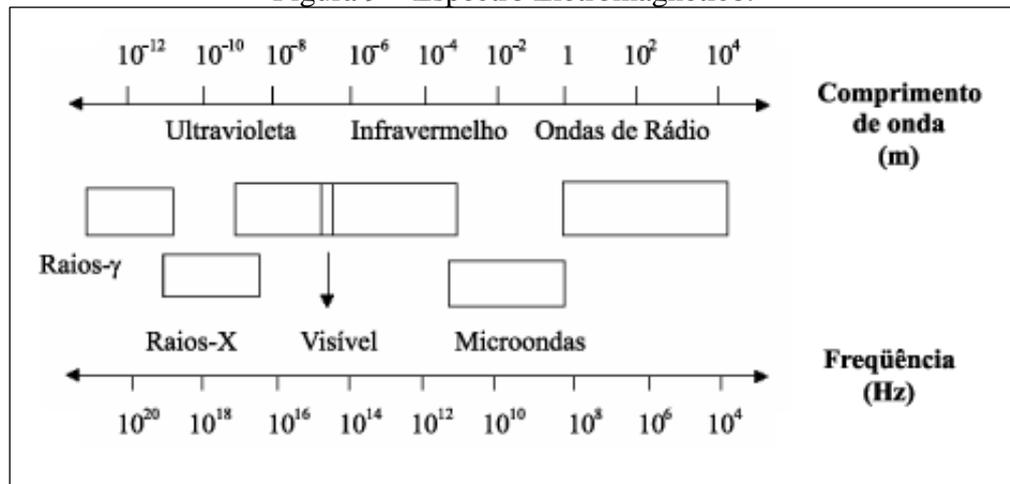
Fonte: Adaptado de PANIWNKY et al. (2001).

3.2.4 Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

As micro-ondas são radiação eletromagnética não ionizante situadas no espectro eletromagnético entre a região do infravermelho e ondas de rádio, representadas na Figura 9 (SANSEVERINO, 2011).

Em laboratórios de química analítica, a radiação micro-ondas ganhou diversas utilidades, entre elas: a dissolução de soluções analíticas, o isolamento de analitos orgânicos, o pré-tratamento de amostras para análise em cromatografia, a síntese de compostos orgânicos, a vulcanização de borracha, processamento de cerâmicas, síntese e obtenção de óleos essenciais e extratos vegetais (BARONI et al., 2011).

Figura 9 – Espectro Eletromagnético.



Fonte: SANSEVERINO, 2011.

As principais vantagens da utilização dessa técnica é a rapidez na extração, quase sempre inferior a 10 min, o uso reduzido de solventes orgânicos, a simplicidade de utilização, e extrações múltiplas, possível em aparelhos modernos que operam diferentes métodos simultaneamente considerando que existe disponibilidade de aparelhos apresentando de 2 a 6 vasos de reação, com controle autônomo na adição de reagentes e na temperatura, além de ajuste da incidência de radiação em cada vaso (NOBREGA et al., 2002).

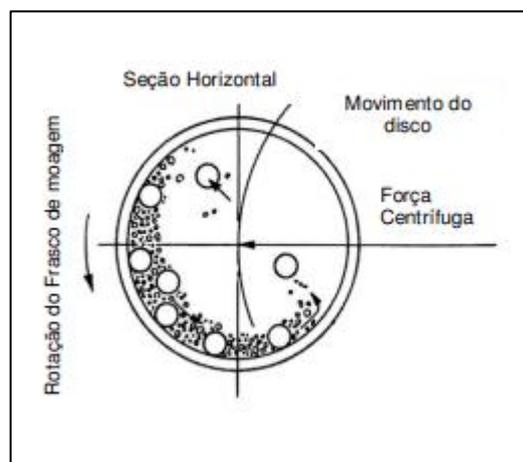
O aquecimento se dá pela interação entre a onda eletromagnética e o dipolo elétrico presente em algumas moléculas, o aumento da temperatura no interior da estrutura celular resulta na ruptura das paredes celulares liberando rapidamente os componentes vegetais (BARONI et al., 2011; CHUA, 2013). Os parâmetros a serem observados na utilização de aparelhos de micro-ondas são o solvente empregado, a potência e o tempo aplicado a fim de evitar perda de analitos ou interconversões indesejadas (SUÁREZ, 2010).

Zeng e colaboradores (2010) realizaram a extração de rutina de plantas medicinais chinesas por MAE, em comparação com outros métodos de extração como a assistida por ultrassom. A extração foi feita das ervas chinesas *Saururus chinensis* e *Sophora japonica* L. Diferentes líquidos iônicos foram utilizados como solventes, esses são compostos de cátions orgânicos e ânions inorgânicos ou orgânicos de natureza não molecular, pressão de vapor extremamente baixa e uma alta estabilidade térmica. As amostras de *S. chinensis* foram desengorduradas. O método de extração por micro-ondas mostrou-se mais eficiente em comparação com os demais. Apresentando um rendimento de rutina de 4,879 mg/g e 101,23% de recuperação para *Saururus chinensis* e 171,82 mg/g e 99,62% de recuperação para *Sophora japonica* L.

3.2.5 Extração Assistida Mecanoquímica

Mecanoquímica é caracterizada como uma reação química induzida pela absorção direta de energia mecânica, sendo aplicada em liga mecânica, na síntese de pó funcional superfino, modificações de fármacos, na decomposição de resíduos orgânicos e na fabricação de produtos naturais (XIE et al., 2011), muito eficiente na extração de compostos com baixa solubilidade em água (CHUA, 2013). Uma de suas divisões é a moagem reativa de sólidos que utiliza o método de maceração *Grinding* (graal e pistilo) ou moagem *Milling* (Moinho de bolas). Um dos moinhos mais usados é o planetário (PAVEGLIO, 2012). Na ativação mecanoquímica, aparelhos como britador de mandíbula, moinho de barras de aço inoxidável e moinho de rolo são utilizados (SILVA et al., 2011; AZEVEDO, MEDEIROS e GARRIDO, 2010). O princípio da moagem planetária é a moagem dos reagentes realizada através de impactos de alta energia entre as esferas de moagem com as paredes do frasco conforme mostrado na Figura 10 (PAVEGLIO, 2012).

Figura 10 – Movimento em um moinho de bolas do tipo planetário.



Fonte: Adaptado de PAVEGLIO, 2012.

Xie e colaboradores (2011) extraíram, por meio de processo mecanoquímico, rutina de folhas secas da espécie tradicional na medicina chinesa *Hibiscus mutabilis* L. que foram moídas com Na_2CO_3 e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (usada para proteger a rutina contra oxidação) em um moinho planetário contendo esferas com peso igual a 100g e diâmetro de 6 mm, sendo as mesmas constituídas de aço inoxidável. A mistura foi extraída e centrifugada a 2000 rpm durante 5 min, em seguida, o sobrenadante foi ajustado para um pH entre 2,0 e 6,0 com HCl 6M. O produto líquido foi condensado e analisado por HPLC. Os resultados foram positivos

comparados com outros métodos, obtendo-se 5,44 mg/g de rutina, em um tempo de extração equivalente a 15 minutos à temperatura de 25°C.

Com base nos dados em cada estudo de extração da rutina por meio de diferentes métodos não é possível identificar o mais adequado devido à utilização de diferentes espécies vegetais e variantes diferenciadas como o tempo e a quantidade de solvente. No entanto o método que teve maior poder de recuperação foi a extração assistida por micro-ondas no estudo realizado por Zeng e colaboradores (2010) cuja recuperação nas espécies estudadas foi superior a 99,60%.

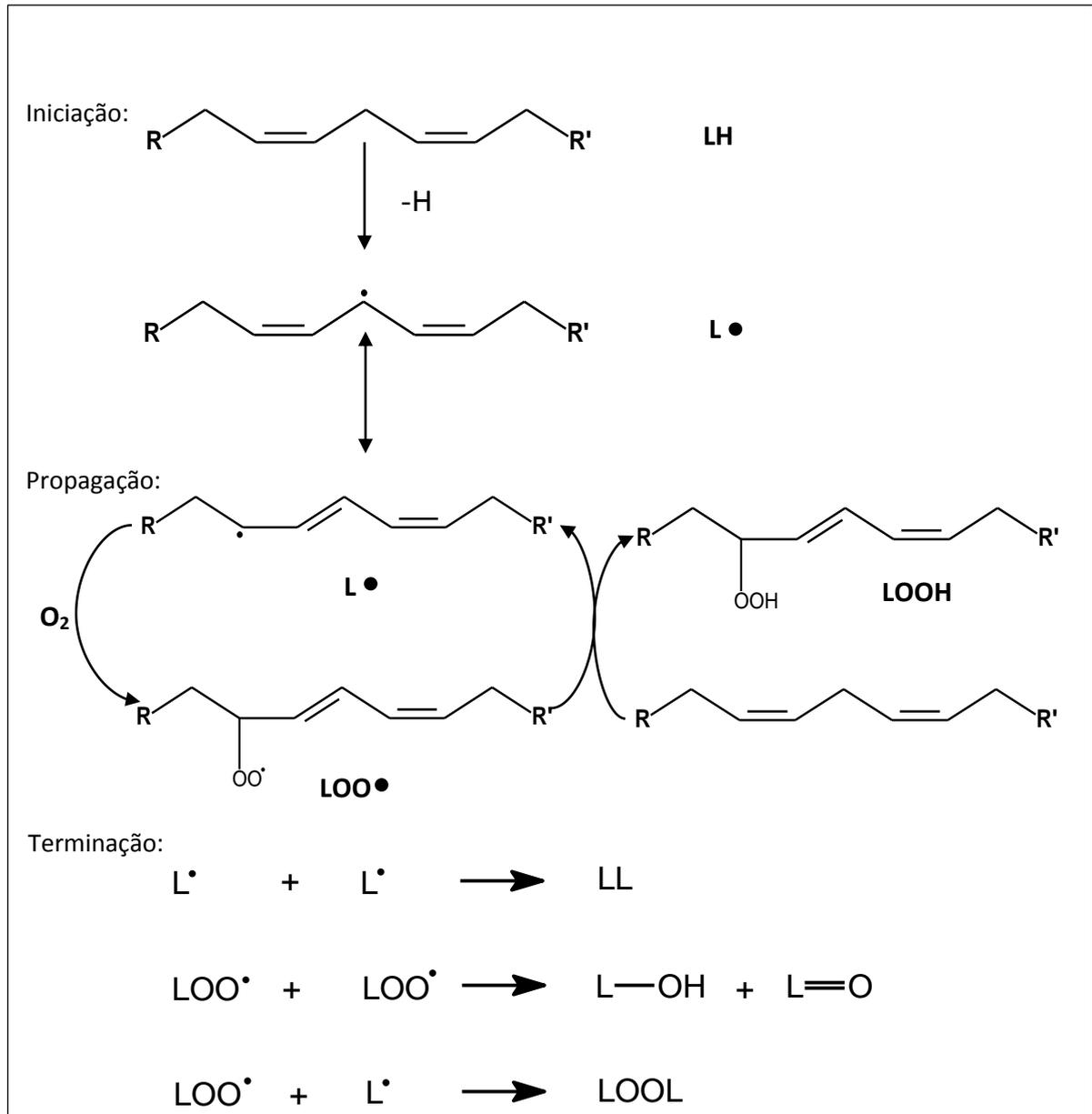
3.3 Atividade antioxidante da rutina

Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (LIMA e ABDALLA, 2011), sendo sua formação considerada um processo fisiológico que ocorre de forma contínua nas membranas celulares, citoplasma e mitocôndrias atuando na produção de energia, fertilização do óvulo, ativação de genes e defesa em células como neutrófilos (SOUSA, 2013). Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, reduzem a velocidade ou previnem a oxidação do substrato por diversos mecanismos, entre eles a inibição de radicais livres, complexação de metais e a decomposição de produtos primários a compostos que não são radicais (MATTOS et al., 2009; LOLIGER, 1991; PIETTA, 2000; SUCUPIRA, et al., 2012; TENREIRO, 2010). A classificação dos antioxidantes é diversificada: sintéticos ou naturais, enzimáticos ou não enzimáticos, e ainda de forma mais específica podem ser classificados conforme seu mecanismo de ação em: preventivos, de “limpeza”, reparadores e sinalizadores (SUCUPIRA, et al., 2012; SOUSA, 2013).

A relação entre os radicais livres formados naturalmente durante o metabolismo e a presença de antioxidantes naturais no organismo, e obtidos na dieta, mantém um equilíbrio satisfatório. Porém alterações internas e fatores externos como poluentes, radiação, cigarro e praguicidas podem ocasionar um excesso de radicais livres cuja quantidade de antioxidantes presentes não neutraliza suas ações de danos a moléculas (DNA, RNA, proteínas e lipídios) o que acarreta graves prejuízos para o organismo (SOUSA, 2013). Esse desequilíbrio entre sistemas pro-oxidantes e antioxidantes desencadeia o processo de estresse oxidativo, tendo como principal consequência a peroxidação lipídica, esquematizada na Figura 11, que causa a deterioração dos corpos graxos. Após início da peroxidação lipídica o processo torna-se

autocatalítico e somente termina quando se esgotam as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (BORGES, et al, 2011; NASCIMENTO et al, 2011).

Figura 11 – Processo de peroxidação lipídica.



Legenda: LH: ácido graxo; L• : radical lipídico; LOO• : radical peroxila; LOOH: hidroperóxido. Fonte: BORGES et al., 2011.

Uma alternativa preventiva ou até mesmo terapêutica para patologias como aterosclerose, diabetes, obesidade e câncer, bem como o envelhecimento, é a redução do estresse oxidativo, por isso a necessidade de pesquisas por substâncias antioxidantes (SOUSA, 2013). Alguns fatores conferem às substâncias características de bom antioxidante,

são eles: substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio, capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura, capacidade de quelar metais de transição e acesso ao local de ação que é dependente da natureza hidrofílica ou lipofílica (SUCUPIRA et al, 2012). Vale salientar que doses elevadas podem acarretar possível efeito tóxico, sendo que, em determinadas situações, antioxidantes podem agir como pró-oxidantes, nesse caso concentrações baixas podem ser favoráveis (BORGES et al, 2011).

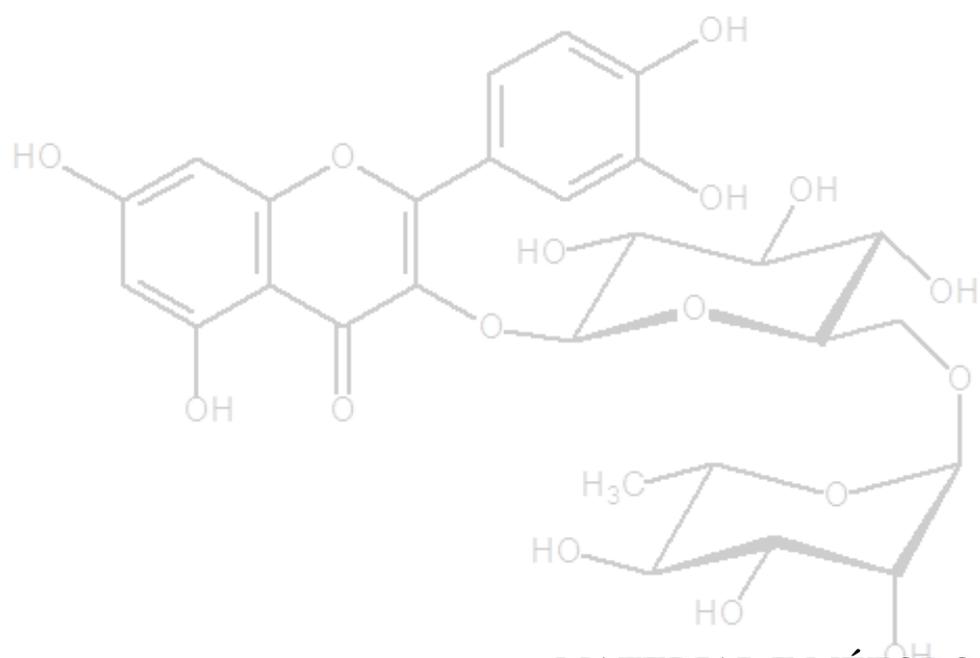
Segundo Borges e colaboradores (2011), os métodos para avaliação da atividade antioxidante estão divididos em: colorimétricos, biológicos, eletroquímicos e instrumentais. Estudos que utilizam duas ou mais técnicas são mais viáveis, pois nenhum ensaio isolado reflete de fato a capacidade antioxidante total da amostra (SUCUPIRA et al, 2012).

A rutina é um polifenol da classe dos flavonoides. Os polifenóis atuam nas plantas protegendo-as contra danos provenientes da ação dos subprodutos da fotossíntese, protegem também contra danos aos seus tecidos e contra o ataque de plantas herbívoras. Os flavonoides, em especial, defendem contra a ação dos radicais livres (SUCUPIRA et al, 2012). Estudos demonstram que quando adicionados à dieta humana, os polifenóis previnem diversas doenças provenientes do estresse oxidativo. Acredita-se que sua atuação está ligada à modulação de vias metabólicas por meio da ação antioxidante. Fatores estruturais como, número e posição de grupos hidroxilas, tipo e posição da glicosilação e grau de impedimento estérico no sítio de abstração do hidrogênio, influenciam a atividade antioxidante destes compostos, ocasionando diferentes potenciais antioxidantes nos diversos compostos polifenólicos (SOUSA, 2013).

Analisando a estrutura química da substância para justificar seu potencial antioxidante, destaca-se um fator especial que influencia a atividade de compostos fenólicos, como os flavonoides, que é a posição de substituição e o número de grupos hidroxila. Compostos com dois grupos hidroxila substituintes no anel benzênico possuem maior atividade do que os monohidroxilados, quando a presença dos dois grupos hidroxila está no anel B do esqueleto de um flavonoide, sendo um deles em posição *para*, há uma potencialização da atividade antioxidante (SCOTTI et al., 2007). A presença de um grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C, contribui significativamente para o potencial antioxidante da molécula, assim como a dupla ligação C2-C3, conjugada ao grupo 4-oxo(C4) deste mesmo anel (PANNALA et al., 2001).

Estudos recentes de atividade antioxidante envolvendo a rutina tem mostrado resultados satisfatórios. Hernández-Herrero e Frutos (2015) investigaram a estabilidade da atividade antioxidante de antocianinas com a adição da rutina, por meio do teste da capacidade equivalente a vitamina C e utilizando o radical ABTS. Constataram que a adição

da rutina não influencia a atividade antioxidante das antocianinas, demonstrando a ausência de um efeito sinérgico da rutina. Drinkwater e colaboradores (2015) estudaram as concentrações de rutina e a atividade antioxidante em talos de *Aspargos officinales* após o cozimento. Por meio dos testes FRAP e ORAC ocorreu um aumento da capacidade antioxidante, atribuída aos compostos polifenólicos, dentre os quais destaca-se a rutina. Cho e colaboradores (2014) utilizaram material enriquecido com rutina para fortificar alimentos à base de trigo. Os testes para atividade antioxidante foram DPPH, ABTS e FRAP, e demonstraram aumento na atividade antioxidante em macarrões, porém essa atividade diminuiu com o cozimento. No estudo realizado por Nguyer e colaboradores (2013), a atividade antioxidante de complexos de inclusão supramoleculares entre rutina e ciclodextrinas foram testadas, e por meio dos testes ABTS, DPPH e poder redutor de ferro, os resultados para a complexação foram superiores ao controle rutina. Araújo e colaboradores (2013) demonstraram que rutina hidrolisada com hesperidinase e naringinase mostraram maior atividade antioxidante em comparação com a rutina, onde DPPH e branqueamento do β -caroteno foram dois dos métodos utilizados. Estudos em células realizados por Jiménez-Aliaga e colaboradores (2011) demonstraram a capacidade da rutina e da quercetina em diminuir quase que completamente as espécies reativas de oxigênio evitando a peroxidação lipídica, sendo um dos testes utilizados o TBARS. Yang, Guo e Yuan (2008) realizaram teste antioxidante *in vitro* para a rutina, entre os métodos utilizados estavam eliminação de radicais superóxidos, eliminação de radicais DPPH e ensaio de peroxidação lipídica. Para todos os métodos a rutina demonstrou resultados satisfatórios.



MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material Vegetal

Vagens secas de fava d'anta, representada na Figura 12, foram adquiridas entre Junho e Julho de 2013, no distrito de Horizonte, cidade de Jardim, estado do Ceará, Brasil. Exemplares da espécie foram coletados, sendo o material identificado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri. Exsicatas da espécie, registradas sob nº 10.862, foram depositadas no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) na Universidade Regional do Cariri (URCA).

Figura 12 – Fotografia da *Dimorphandra gardneriana* no local da coleta.



Fonte: Própria autora

4.1.2 Reagentes químicos e solventes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de pureza com grau analítico, apresentados conforme a lista que segue:

- Acetato de sódio;
- Acetato de sódio triidratado;
- Acetona;
- Acetonitrila;
- Ácido acético glacial;
- Ácido clorídrico;
- Ácido sulfúrico;
- Ácido tiobarbitúrico (TBA);
- Ácido tricloro acético (TCA);
- Água destilada e mili-q;
- Álcool etílico;
- Álcool metílico;
- Carvão ativo em pó;
- Celite;
- Cloreto férrico hexahidratado;
- Desoxirribose;
- Fenantrolina;
- Fosfato de potássio mono e dibásico;
- Fosfolipídio de ovo;
- Malandialdeído (MDA);
- Peróxido de hidrogênio;
- Quercetina padrão (99,9%);
- Rutina padrão (99,9%);
- Sulfato férrico;
- Sulfato ferroso heptahidratado;
- TRIS HCl;
- 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH);
- 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ).

Os solventes e reagentes foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

4.1.3 Equipamentos

- Cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20AT, com coluna shim-pack CLC-ODS (250 x 4,6 mm) e detector UV, forno ausente e bomba quaternária;
- Espectrofotômetro Ultravioleta Visível (UV-VIS) da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S, cubeta de quartzo;
- Leitor de microplaca ELISA da marca Thermoplate, modelo TP-Reader com saída RS 232.

4.2 Métodos cromatográficos

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi usada como análise qualitativa no acompanhamento dos processos de isolamento e purificação de substâncias. Foram utilizadas placas cromatográficas pré-fabricadas, sem necessidade de ativação, tendo como adsorvente a sílica. Para a fase móvel os solventes foram: clorofórmio e metanol, isoladamente ou em misturas binárias de modo a obter-se a polaridade adequada. As amostras a serem analisadas foram diluídas e aplicadas nas cromatoplasas utilizando tubos capilares de vidro, a cerca de 1,5 cm acima da borda inferior. O desenvolvimento ocorreu de forma unidimensional ascendente em cuba devidamente vedada e saturada com a fase móvel. Quando a fase móvel atingiu a parte superior da placa, esta foi retirada e seca ao ar livre. A placa cromatográfica foi revelada com uma solução metanólica de cloreto férrico, sendo realizado registro fotográfico para documentação.

Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para realização da quantificação dos materiais isolados, utilizando o mecanismo de cromatografia líquido-sólido também conhecido como adsorção. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (20%), metanol (40%) e água bidestilada (40%), purificada pelo sistema Milli-Q. A coluna utilizada estava preenchida com sílica constituindo a fase estacionária. O desenvolvimento ocorreu por meio de eluição isocrática, sendo a combinação de solventes utilizada para compor a fase móvel bombeada até obtenção de uma linha de base estável. Todas as amostras a serem injetadas no cromatógrafo foram filtradas em membranas de 0,20 µm, e 20 µL foram injetados por meio de válvula manual com o auxílio de uma seringa, o bombeamento ocorreu a um fluxo de 0,5 mL/min. As substâncias foram registradas ao passar por um detector UV acoplado ao cromatógrafo, sendo os espectros armazenados em um microcomputador para análises posteriores.

4.3 Obtenção, purificação e quantificação da rutina

4.3.1 Obtenção da rutina

Frutos de fava d'anta submetidos à moagem e em seguida à extração pelo método de aquecimento adaptado de Paniwnyk et al.(2001) utilizando diferentes solventes, a fim de obter um método que possibilite maior rendimento da substância e diminuição dos efeitos tóxicos no processo de extração, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Condições de extração da rutina para cada solvente utilizado.

Solvente	Volume (L)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
Metanol	0,5	2	50	19,13 ^a ± 1,82
Etanol	1	2	50	18,23 ^a ± 0,74
Etanol e Água (1:1)	1	2	50	26,27 ^b ± 2,13
Água	2	4	90	13,14 ^c ± 2,51

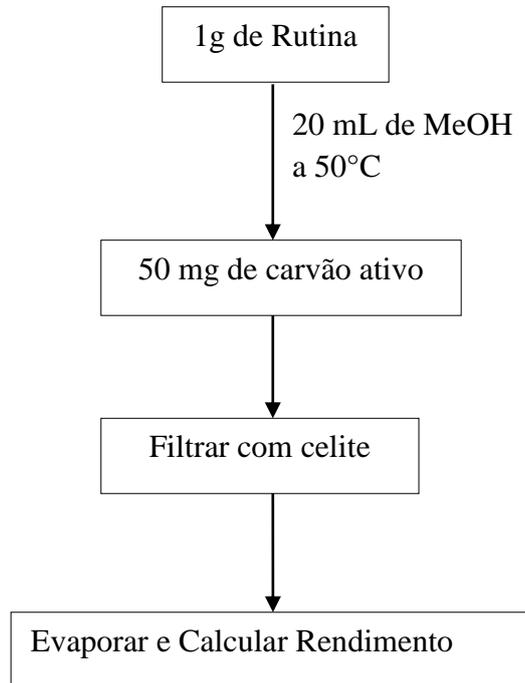
Os resultados são expressos como média ± desvios-padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Transcorrido o tempo de extração, o material passou por filtração comum e a fase líquida foi submetida a aquecimento para evaporação do solvente, seguido do resfriamento com adição de água, e precipitação da rutina. A extração com água não passou pelo processo de evaporação, tendo em vista que a rutina é uma substância pouco solúvel em água a temperatura ambiente, necessitando apenas o resfriamento do filtrado para precipitação da rutina. O sólido foi separado por filtração comum, seguido de secagem em estufa com temperatura em torno de 60 °C. Utilizou-se processo de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em sílica-gel, para confirmar a obtenção da rutina em procedimentos aplicados anteriormente. Para isso foi utilizado como padrão a rutina com percentual de pureza de 99,9%. Empregou-se como fase móvel o metanol, seguindo metodologia descrita anteriormente.

4.3.2 Purificação da rutina

A rutina obtida com o uso de diferentes solventes passou pelo processo de purificação por meio da cristalização. A massa de 1g de cada material obtido foi dissolvida em 20 mL de metanol, em seguida 50 mg de carvão ativo em pó foram acrescentados, e a solução passou por filtração sobre uma camada de celite. Em seguida promoveu-se a evaporação do metanol por aquecimento em chapa quente, o material foi levado a estufa para secagem e posterior cálculo do rendimento (Fluxograma 1, pag. 43). A Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi realizada utilizando como fase móvel o metanol, conforme metodologia descrita anteriormente. O material foi quantificado por meio de CLAE.

Fluxograma 1 – Representação simplificada da metodologia de purificação da rutina.



4.3.3 Quantificação da rutina

Para construção da curva de calibração da rutina, uma solução estoque metanólica de 0,2 mg/mL de rutina padrão foi preparada em um volume de 25 mL. A partir da solução estoque 6 diluições foram preparadas obtendo soluções com concentrações de 0,12 mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL. Uma solução estoque da rutina obtida com o uso de diferentes solventes foi preparada conforme descrito para rutina padrão e a diluição na concentração de 0,08 mg/mL utilizada para análise. Todas as amostras foram injetadas em triplicata no cromatógrafo líquido, conforme método descrito anteriormente. O detector UV foi ajustado para comprimento de onda de 275 nm e 320 nm

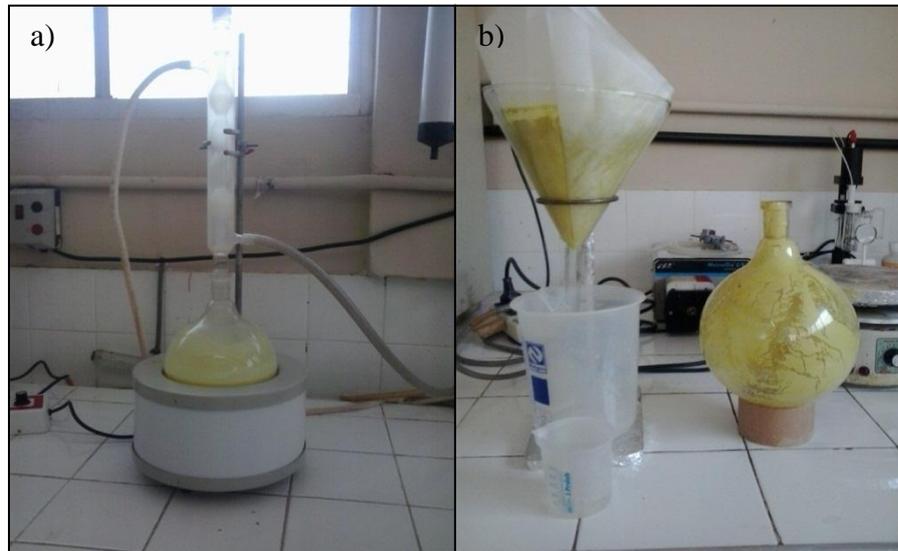
4.4 Obtenção, purificação e quantificação da quercetina

4.4.1 Obtenção da quercetina

A técnica foi adaptada de Rio (1996). A hidrólise ocorreu misturando-se 100g de rutina com 1000 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 5% em sistema de refluxo a 80°C durante 6h, como ilustrado na Figura 13a. Após a ebulição, a mistura reacional foi resfriada e

em seguida filtrada (Figura 13b) com controle de pH 6 por adições sucessivas de água destilada conforme mostrado no Fluxograma 2 da página 45.

Figura 13 – a) Sistema de refluxo a 80 °C; b) filtração comum.



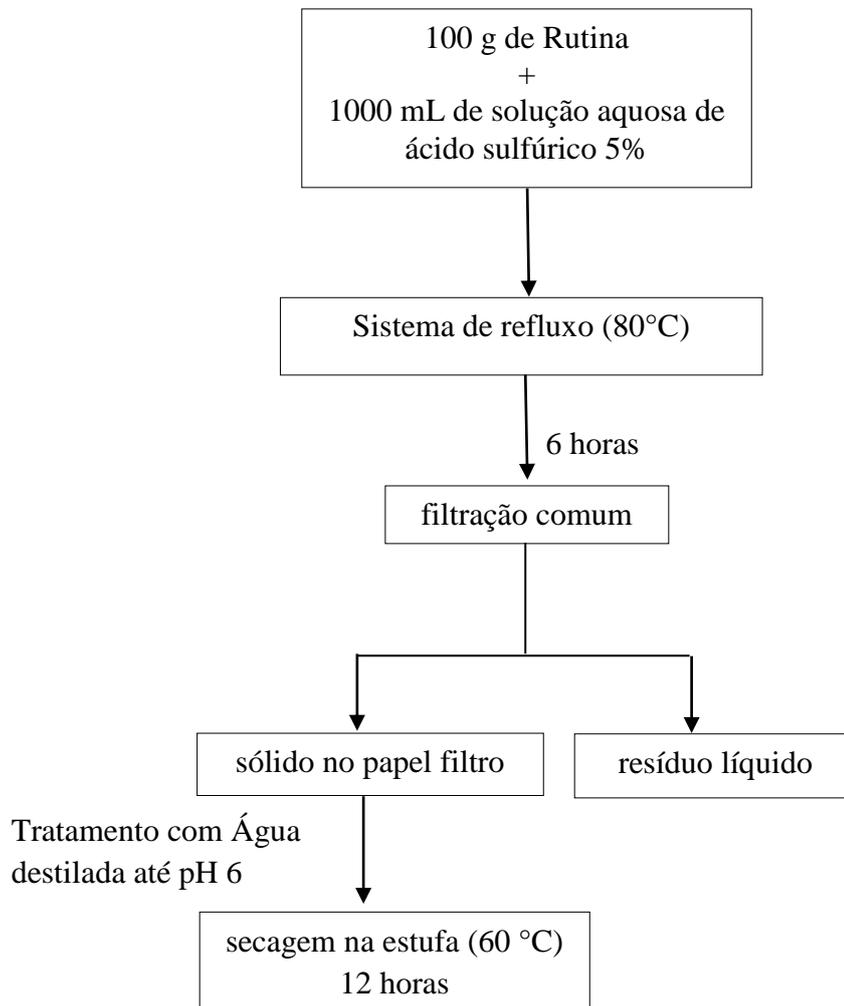
Fonte: Própria autora

O perfil cromatográfico da quercetina obtida foi relacionado com a quercetina e a rutina padronizadas, usando CCD com metanol e clorofórmio (4:1) como fase móvel, desenvolvido conforme descrito anteriormente.

4.4.2 Purificação da Quercetina

A purificação da quercetina foi realizada por cristalização utilizando 1500 mL de etanol aquecidos a temperatura de 80 °C. Em seguida foram adicionados 6g de carvão ativo em pó e a mistura permaneceu sob aquecimento por 15 minutos. Imediatamente após o aquecimento foi realizada a filtração comum. Com o resfriamento da fase líquida formou-se um precipitado, a mistura passou novamente por filtração comum e o material que ficou retido no papel filtro, a quercetina, foi levado à estufa (60°C) para secagem, permanecendo por 12 h. Foi calculado o rendimento e a quercetina foi quantificada por CLAE.

Fluxograma 2 – Representação simplificada da metodologia de obtenção da quercetina através da hidrólise da rutina.



4.4.3 Quantificação da quercetina

Para construção da curva de calibração da quercetina uma solução estoque metanólica de 0,2 mg/mL de quercetina padrão foi preparada em um volume de 25 mL. A partir da solução estoque 5 diluições foram preparadas obtendo soluções com concentrações de 0,10 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL. Uma solução estoque da quercetina obtida com a hidrólise da rutina foi preparada conforme descrito para quercetina padrão e a diluição na concentração de 0,08 mg/mL utilizada para análise. Todas as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido, conforme método descrito anteriormente. O detector UV foi ajustado para comprimento de onda de 274 nm.

4.5. Avaliação da Capacidade Antioxidante

4.5.1 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007) e Mensor et al. (2001). Procedeu-se com o preparo de soluções das amostras num volume de 50 mL. As concentrações de rutina e quercetina foram 25 µg/mL, 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL, diluídas em metanol. Uma solução de DPPH foi preparada com concentração de 24 µg/mL em metanol, procedimento realizado no escuro. As amostras para análise foram preparadas conforme descrito na Tabela 2. O controle negativo não continha a solução das amostras e o branco das amostras não continha o radical DPPH.

Tabela 2 – Preparo de soluções para o teste DPPH.

	Metanol	Amostra	DPPH
Controle Negativo*	2,5 mL	---	1 mL
Concentrações da amostra*	---	2,5 mL	1mL
Branco da amostra*	1 mL	2,5 mL	---

* Triplicata; --- não adicionado.

Após 30 minutos de reação no escuro, à temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absorbância em um Espectrofotômetro UV-Visível em 518 nm. O consumo de DPPH foi calculado em porcentagem, conforme equação 1. De acordo com os dados obtidos, a concentração eficiente capaz de consumir 50% de DPPH (CE₅₀) foi calculada em µg/mL.

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = 100 - \left(\frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100}{A_{\text{controle}}} \right)$$

Onde:

A_{amostra} = Absorbância de cada amostra

A_{branco} = Absorbância do branco das amostras

A_{controle} = Absorbância do controle negativo

Equação 1.

4.5.2. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do ferro (FRAP)

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2006). O preparo das soluções procedeu-se conforme especificado na Tabela 3. Um volume de 3mL da cada amostra diluída em metanol foi preparada nas concentrações de 25 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para rutina e quercetina. Em placa de ELISA as amostras para análise foram preparadas adicionando-se alíquotas de acordo com o apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 - Preparo de reagentes para o teste FRAP.

Solução	Solvente/preparo	Armazenamento
Metanol 50%	Água destilada	*NE
Acetona 70%	Água destilada	NE
HCl 40 mM	Água destilada	NE
TPTZ 10 mM	HCl 40 mM	Vidro âmbar sob refrigeração.
Cloreto Férrico 20 mM	Água destilada	Vidro âmbar sob refrigeração.
Tampão Acetato 0,3M pH 3,6	3,1 g de acetato de sódio; 16 ml de ácido acético glacial completar 1L com água destilada.	Vidro âmbar sob refrigeração.
Reagente FRAP	25 ml de tampão acetato 0,3M; 2,5 ml de TPTZ 10 mM; 2,5 ml de cloreto férrico 20 mM.	Uso imediato.
Padrão de Sulfato Ferroso 2 mM	Água destilada	Vidro âmbar, uso imediato.

* NE = Não especificado.

As amostras foram homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em um Leitor de ELISA a 595 nm. A redução do complexo férrico tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{\text{III}} - \text{TPTZ}$) ao complexo ferroso ($\text{Fe}^{\text{II}} - \text{TPTZ}$) foi analisada de acordo com a absorbância registrada.

Tabela 4 - Preparo de soluções para o teste FRAP.

	Metanol	Amostra	FRAP
Controle Negativo*	10 µL	---	200 µL
Concentrações da amostra*	---	10 µL	200 µL
Branco da amostra*	200 µL	10 µL	---

* Triplicata; --- não adicionado.

4.5.3 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade quelante de íons Fe²⁺

A técnica foi adaptada de Puntel et al. (2005). As soluções de Fenantrolina 0,25% em etanol, FeSO₄ 2mM aquosa e TRIS HCl 0,1M (pH 7,4) aquosa foram preparadas. Um volume de 1,5 mL da cada amostra diluída em metanol foi preparado nas concentrações de 25 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para rutina e para quercetina. As amostras do teste foram preparadas conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Preparo de soluções para o teste quelante de íons Fe²⁺

	H ₂ O	TRIS–HCl 0,1M, pH 7,2	Amostra	FeSO ₄ (2 mM)
Controle 1*	838 µL	336 µL	---	---
Controle 2*	538 µL	336 µL	---	300 µL
Concentrações da amostra*	438 µL	336 µL	100 µL	300 µL
Branco da amostra*	464 µL	336 µL	100 µL	300 µL

* Triplicata; --- não adicionado.

Todas as amostras foram incubadas, ao abrigo da luz, por um período de 5 minutos, em seguida procedeu-se à adição de 26 µL de fenantrolina 0,25%. O branco das amostras foi preparado sem a necessidade de incubação e sem acrescentar fenantrolina. A absorbância foi medida em um Espectrofotômetro UV-Visível em 510 nm. A capacidade quelante das amostras foi expressa em porcentagem (%), conforme Equação 01.

4.5.4 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela degradação da desoxirribose

A técnica foi adaptada de Puntel et al (2005). As soluções de sulfato de ferro 1 mM, desoxirribose 20 mM, tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,5, peróxido de hidrogênio 10 mM, TCA 2,8% e TBA 0,6% foram preparadas. Um volume de 1,5 mL de cada amostra diluída em metanol foi preparado nas concentrações de 25 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para rutina e para quercetina. O teste foi realizado conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Preparo de soluções para o teste de degradação da desoxirribose.

	H ₂ O	Amostra	TFK 0,5 M (pH: 7,4)	Desoxirribose (20 mM)	H ₂ O ₂ (10 mM)	FeSO ₄ (1 mM)
Basal*	600 µL	---	80 µL	120 µL	---	---
Induzido*	440 µL	---	80 µL	120 µL	80 µL	80 µL
Concentração da amostra*	340 µL	100 µL	80 µL	120 µL	80 µL	80 µL
Branco da amostra*	620 µL	100 µL	80 µL	---	---	---

* Triplicata; --- não adicionado.

Todas as amostras foram incubadas por um período de 30 min à 37°C. Transcorrido esse tempo, todas as amostras receberam 800 µL de TCA, 400 µL de TBA e 500 µL de água, seguida de nova incubação por 20 min em banho fervente (100°C). A curva padrão obedeceu ao mesmo procedimento do teste, sem a solução de fosfolípido e sem as soluções da substância, sendo substituído por MDA 320-500 µM. Realizou-se a leitura da absorbância em um Espectrofotômetro UV-Visível em 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.5 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela inibição da peroxidação lipídica

A técnica foi adaptada de Sabir e Rocha (2008). Foram preparadas as soluções, fosfolipídio de ovo, 0,05g do resíduo em 10 mL de água, TBA 0,6% pH ajustado para 5,0 - 6,0 com NaOH. Para a solução tampão ácido acético 56,2 mL de ácido acético 1M foi adicionado a 1 mL de acetato de sódio 1M completando o volume para 100 mL (pH 3,0), e sulfato de ferro 60 µM. Um volume de 1 mL da cada amostra diluída em metanol foi preparado nas concentrações de 25 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL para rutina e para quercetina. As soluções, basal, induzido, teste com amostra e branco das amostras foram preparadas em triplicatas ao abrigo da luz, conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Preparado de soluções para o teste de inibição da peroxidação lipídica.

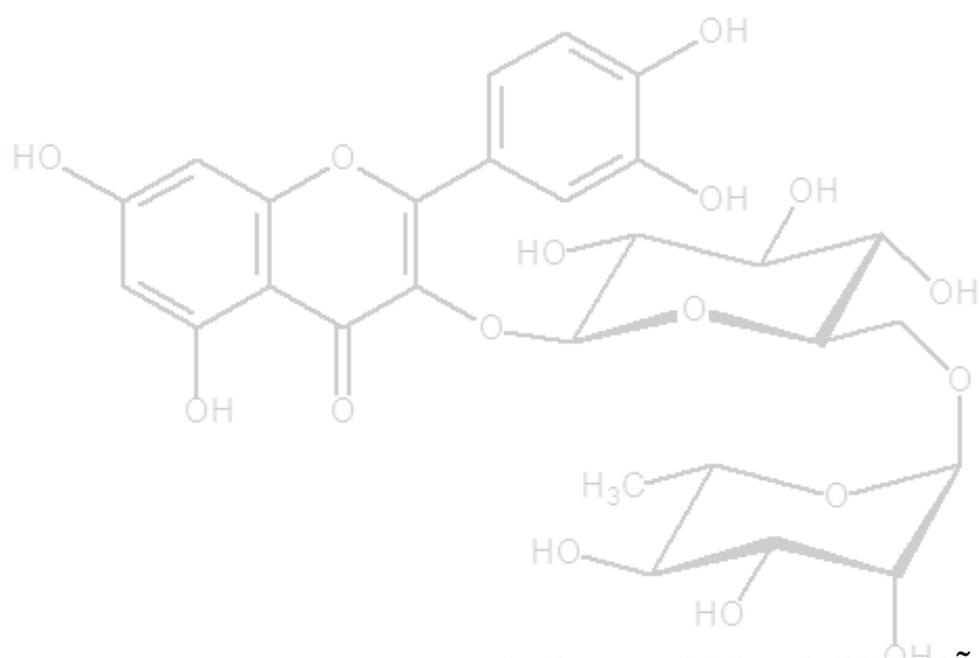
	H ₂ O	Amostra	Metanol	Fosfolipídio	FeSO ₄ (60 µM)
Basal*	350 µL	---	50 µL	100 µL	---
Induzido*	336 µL	---	50 µL	100 µL	14 µL
Concentração da amostra*	336 µL	50 µL	---	100 µL	14 µL
Branco da amostra*	450 µL	50 µL	---	---	---

* Triplicata; --- não adicionado.

As amostras foram posteriormente pré-incubadas por 1h à 37°C, transcorrido o período de pré-incubação as soluções receberam 500 µL de tampão ácido acético e 500 µL de TBA 0,6%, e foram novamente incubadas por 1h à 100°C. Foram adicionados 1,5 mL de butanol em tubos de ensaio e os mesmos foram centrifugados por 2 min a 2000 rpm. 200 µL do sobrenadante de cada solução foram coletados e a leitura foi realizada em um Espectrofotômetro UV-Visível em 532 nm. A curva padrão obedeceu ao mesmo procedimento do teste, sem a solução de fosfolipídio e sem as soluções da substância, sendo substituída por MDA 320-500 µM. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.6. Análises Estatísticas

Os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se o método ANOVA, seguido do teste de Tukey, ou teste t de comparações (Programa GraphPad Prism, Versão 5.00, 2007 e Microsoft Excel, 2010). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (E.P.M.) e considerado significativamente diferente quando foi obtido $p < 0,05$.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da rutina

Diferentes métodos são utilizados para extração de rutina, sendo o solvente uma importante variante que influencia no rendimento final da substância. A rutina é uma substância solúvel em metanol e parcialmente solúvel em etanol e água, sendo que para a água a solubilidade é menor, cerca de 0,125 g/L (PEDRIALI, 2005). O aumento da temperatura promove um aumento da solubilidade e para substâncias estáveis em altas temperaturas, como é o caso da rutina, a extração a quente se torna mais eficiente do que a extração realizada à temperatura ambiente (SANTOS, 2006). O tempo varia em função do solvente empregado, não tendo sido possível um estudo rigoroso para determinação de volume, temperatura e tempo ideal de extração para cada solvente. O metanol é o solvente mais utilizado em se tratando de obtenção da rutina, devido à solubilidade desta substância nesse álcool. Porém oferece uma grande desvantagem a ser considerada, que é a extrema toxicidade, devendo ser evitado sempre que possível, em prol da preservação da saúde daqueles que fazem parte diretamente do processo de extração da rutina.

Na obtenção da rutina, como observado na Tabela 8, o solvente que possibilitou um maior rendimento da substância foi a combinação de etanol/água (1:1), com rendimento médio de 26,27%, sendo que a quantificação de rutina em *D. gardneriana* feita por Landim (2012) apresentou esta substância como composto majoritário com ocorrência de 75,1%. Embora a exploração máxima da rutina esteja abaixo do possível, o percentual apresentado neste estudo está superior ao rendimento da rutina no gênero *Dimorphandra* em estudos anteriores, que é certa de 10,25 % (LANDIM e COSTA, 2012). A polaridade relativa ocasionada pelo etanol e o aumento do inchaço eficaz da planta pela água ajudam a expandir a área de superfície para o contato soluto/solvente (YANG e ZHANG, 2008), com consequente melhoramento do rendimento, o que explicaria a eficiência da combinação etanol/água, além de minimizar os efeitos tóxicos da extração visto que o uso do metanol não foi necessário, diminuindo os custos da extração com mesmo tempo e temperatura utilizados na extração com metanol.

O rendimento superior observado nesse estudo pode estar relacionado com fatores abióticos como: radiação solar, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estação do ano, levando-se em conta também fatores artificiais, como poluentes, que interferem diretamente no mecanismo de produção de metabólitos (MACHADO et al., 2008).

A purificação da rutina extraída com diferentes solventes não demonstrou diferença no rendimento ao nível de 5% de probabilidade, como demonstrado na Tabela 8. É possível inferir a partir dos dados que o tipo de solvente utilizado na extração/isolamento da rutina não interfere no rendimento do processo de purificação.

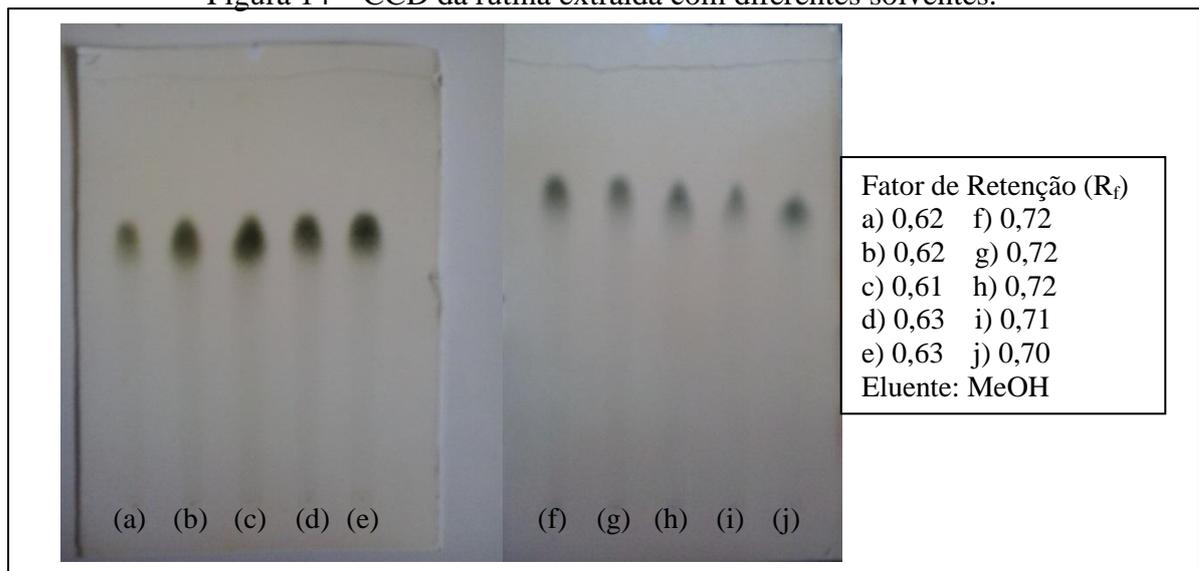
Tabela 8 – Rendimento de rutina extraída de fava d’anta com diferentes solventes antes e após purificação.

Solvente utilizado	Rendimento antes da purificação (%)	Rendimento após purificação (%)
MeOH	19,13 ^a ± 1,82	67,00 ^a ± 14,17
EtOH	18,23 ^a ± 0,74	79,66 ^a ± 11,93
EtOH /H ₂ O	26,27 ^b ± 2,13	65,33 ^a ± 8,50
H ₂ O	13,14 ^c ± 2,51	63,33 ^a ± 6,02

Os resultados são expressos como média ± desvios-padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Por meio da análise qualitativa, com resultado apresentado no cromatograma em CCD sendo a rutina padrão substância de comparação, a obtenção da rutina com a utilização de diferentes solvente foi confirmada conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – CCD da rutina extraída com diferentes solventes.



Legenda: a) e f) rutina padrão; b) rutina (extração com metanol); c) rutina (extração com etanol); d) rutina (extração com etanol/água); e) rutina (extração aquosa); g) rutina purificada (extração com metanol); h) rutina purificada (extração com etanol); i) rutina purificada (extração com etanol/água); j) rutina purificada (extração aquosa). Fonte: Própria autora.

A construção da curva de calibração da rotina de absorção UV em 275 nm e em 320 nm, obteve a equação da reta, $y = ax + b$, com valores de a e b apresentados na tabela 9 para cada comprimento de onda, onde y corresponde a área do pico no espectro obtido por CLAE e x corresponde a concentração da amostra utilizada, em mg/mL, os coeficientes de correlação também encontram-se especificado na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores para equação da reta da rotina nos comprimentos de onda 275nm e 320nm.

λ	a	b	R^2
275 nm	12650835,71	236205,39	0,98
320 nm	10927628,57	201940,96	0,99

Para a rotina obtida com o uso de diferentes solventes os resultados de pureza estão descritos na Tabela 10 e seus cromatogramas apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18.

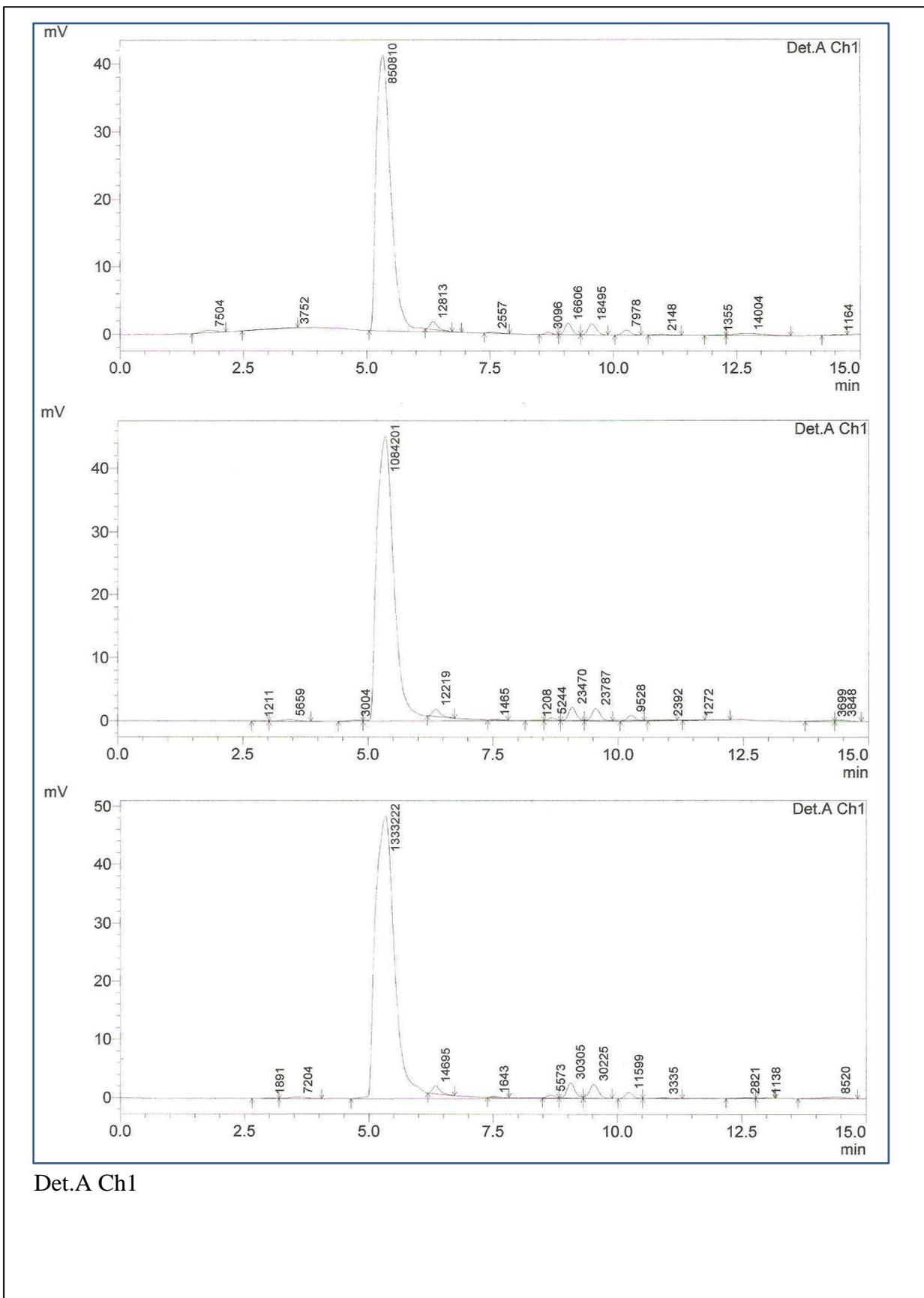
Tabela 10 – Quantificação da rutina extraída com diferentes solventes.

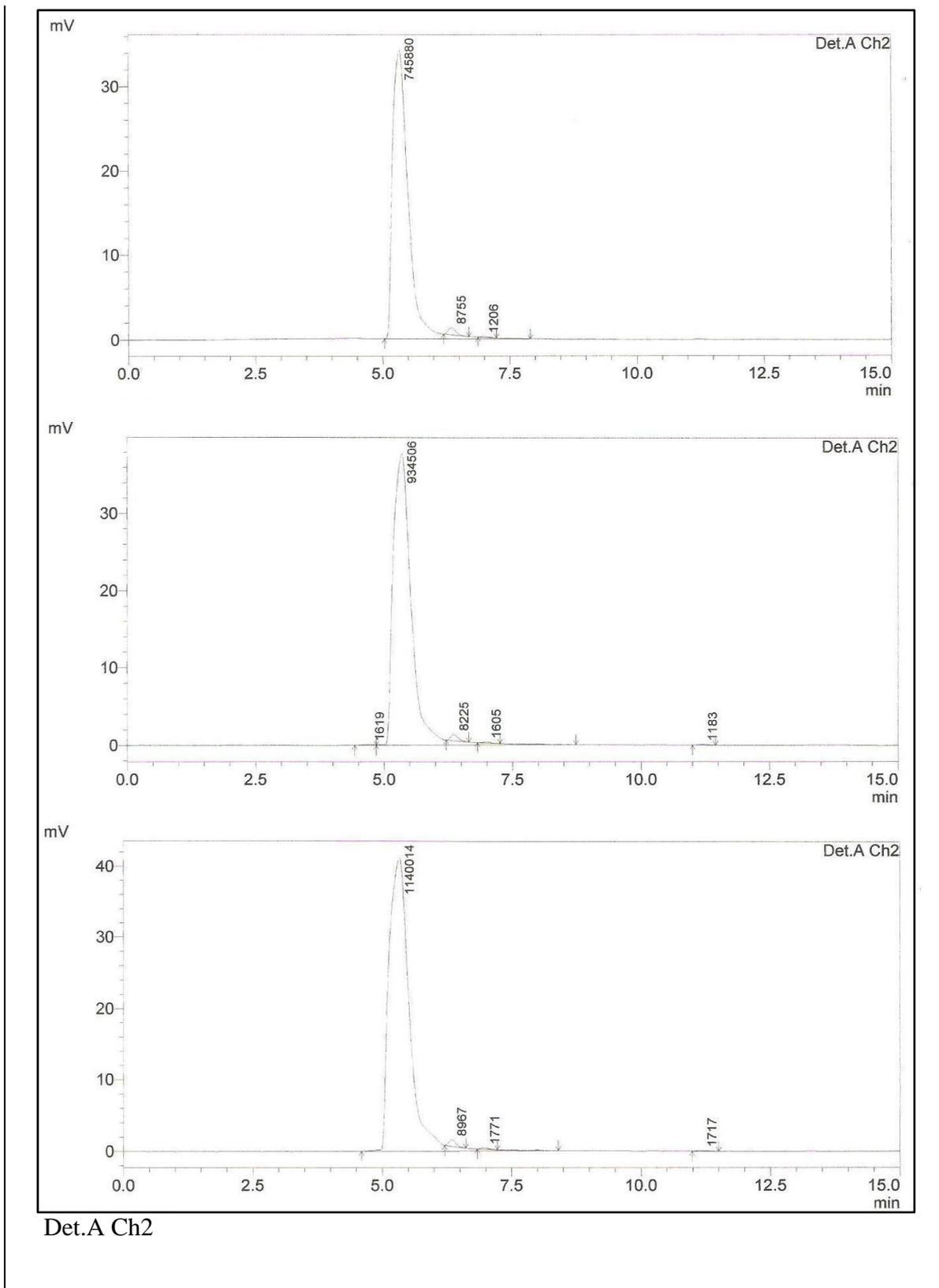
Solvente da extração	Área do pico	Pureza
Metanol	$108911^a \pm 241248,2$	*ND
	$940133^b \pm 190133,3$	83,59 %
Etanol	$1225092^a \pm 116312,4$	95,75 %
	$1060197^b \pm 101541$	97,19 %
Etanol/água	$1257398,6^a \pm 139949,2$	98,88 %
	$1078668^b \pm 124048,1$	99,28 %
Água	$1648229^a \pm 119875,7$	*ND
	$1434850^b \pm 103404,3$	*ND

Os resultados são expressos como média \pm desvios-padrão (DP) de três determinações, onde **a** representa leitura a 275 nm e **b** representa leitura a 320 nm. *ND – Não determinado.

Conforme apresentado na Tabela 9, além do maior rendimento da rutina corresponder a extração com EtOH/H₂O, e dentre as purezas identificadas foi a que apresentou melhores resultados, confirmando a eficiência dessa combinação de solventes na extração da rutina de fava d'anta.

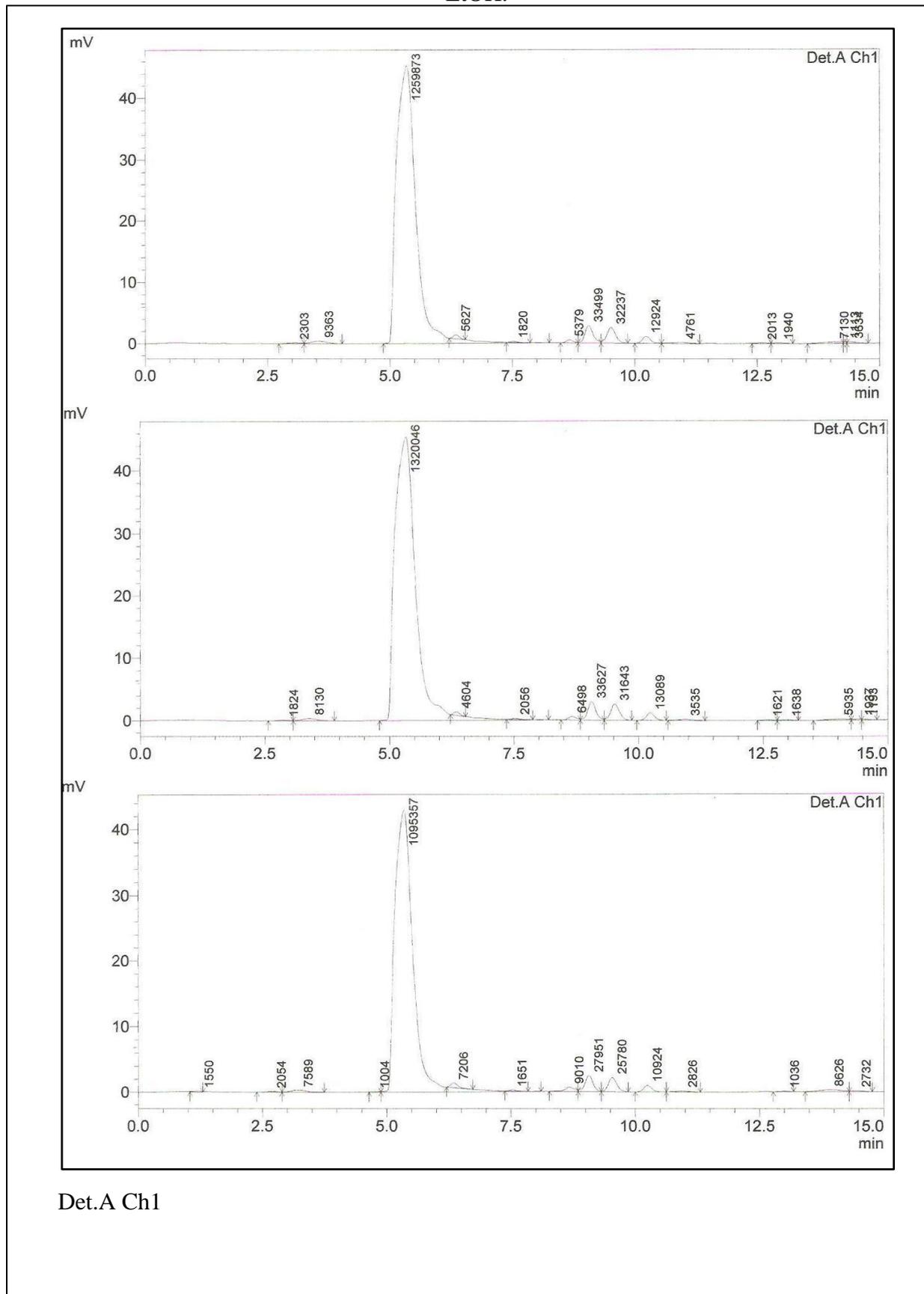
Figura 15 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com MeOH.

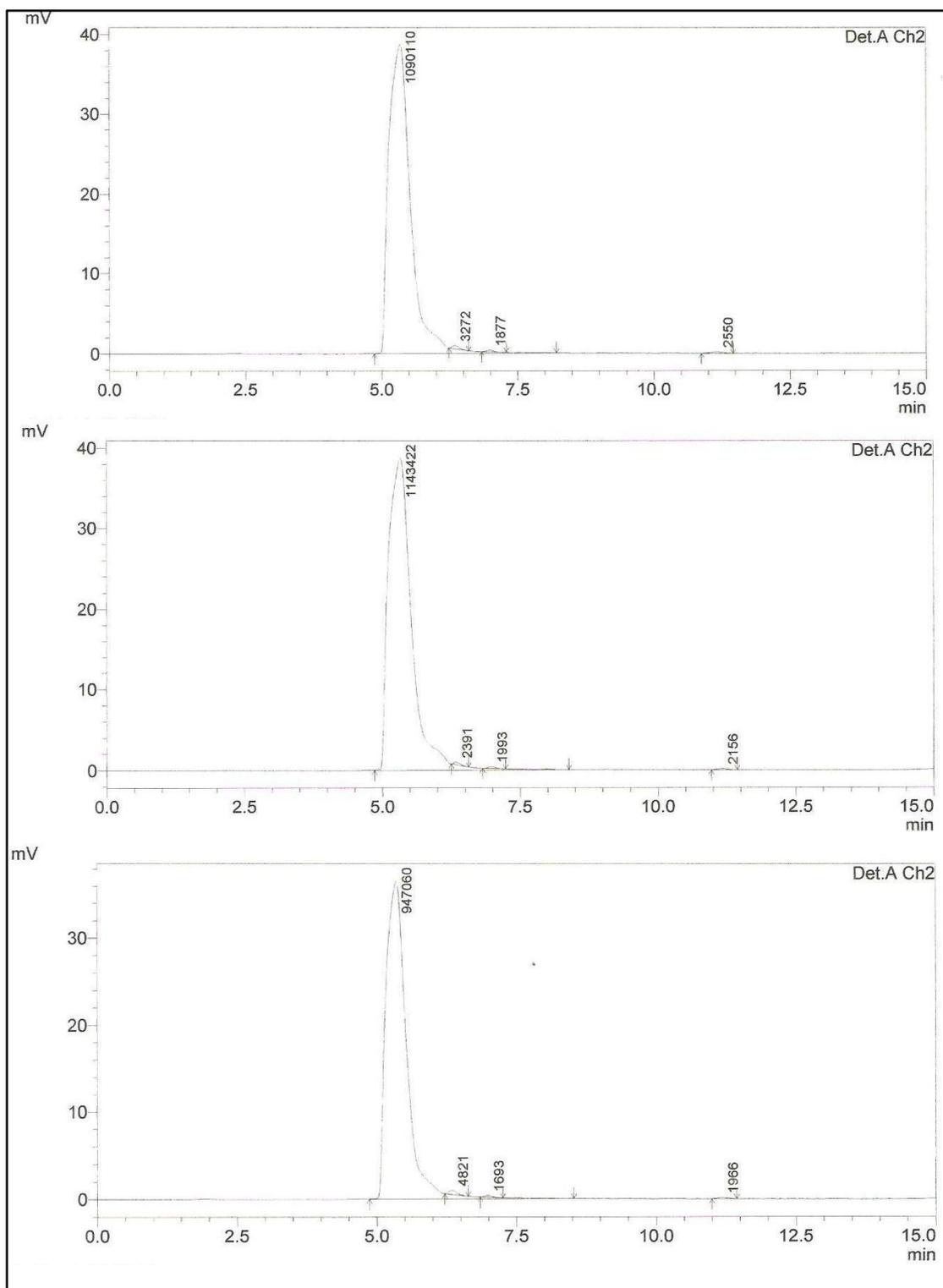




Legenda: Det.A Ch1 – 275 nm; Det.A Ch2 – 320 nm. Cada canal com leitura feita em triplicata.

Figura 16 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com EtOH.

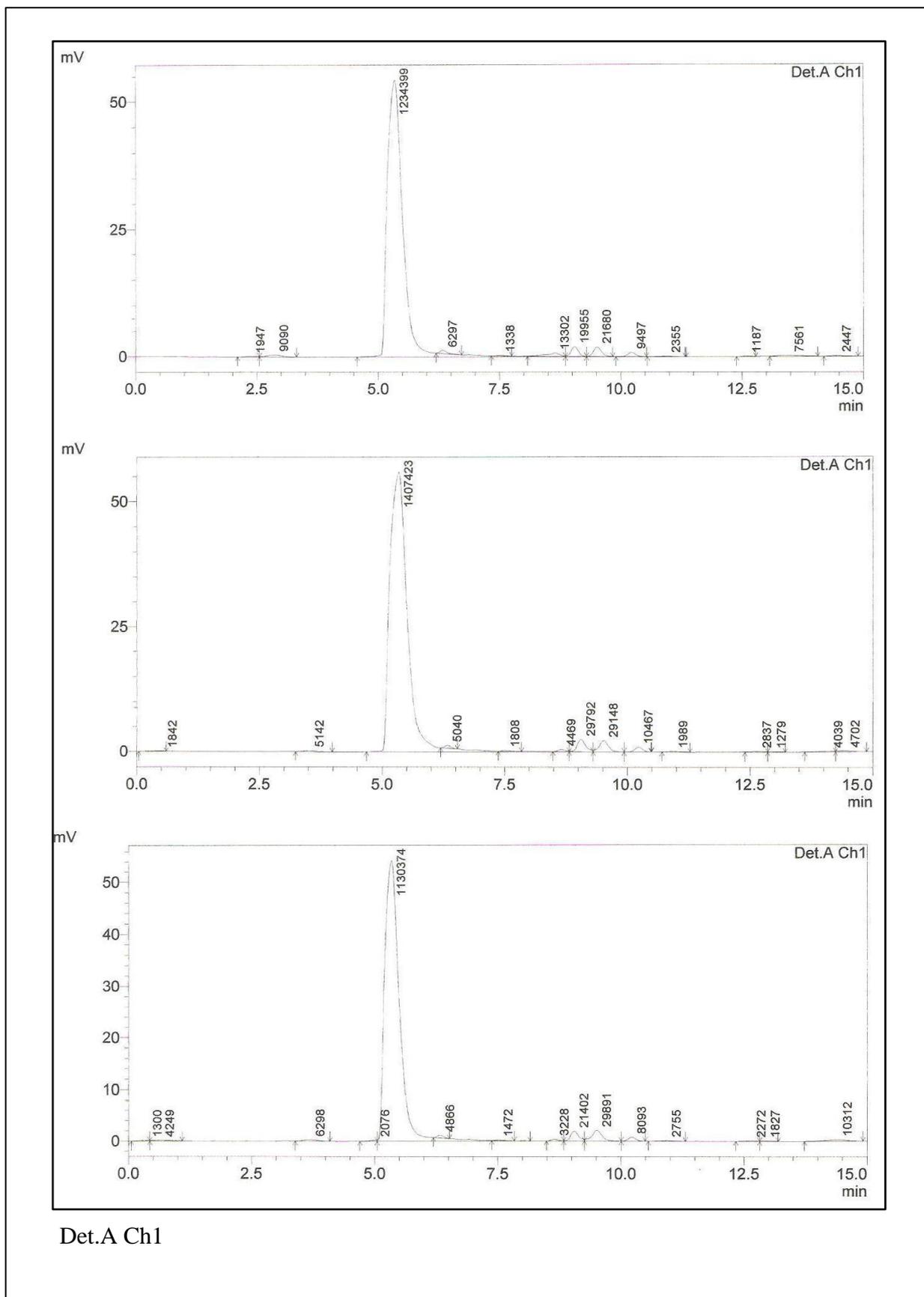


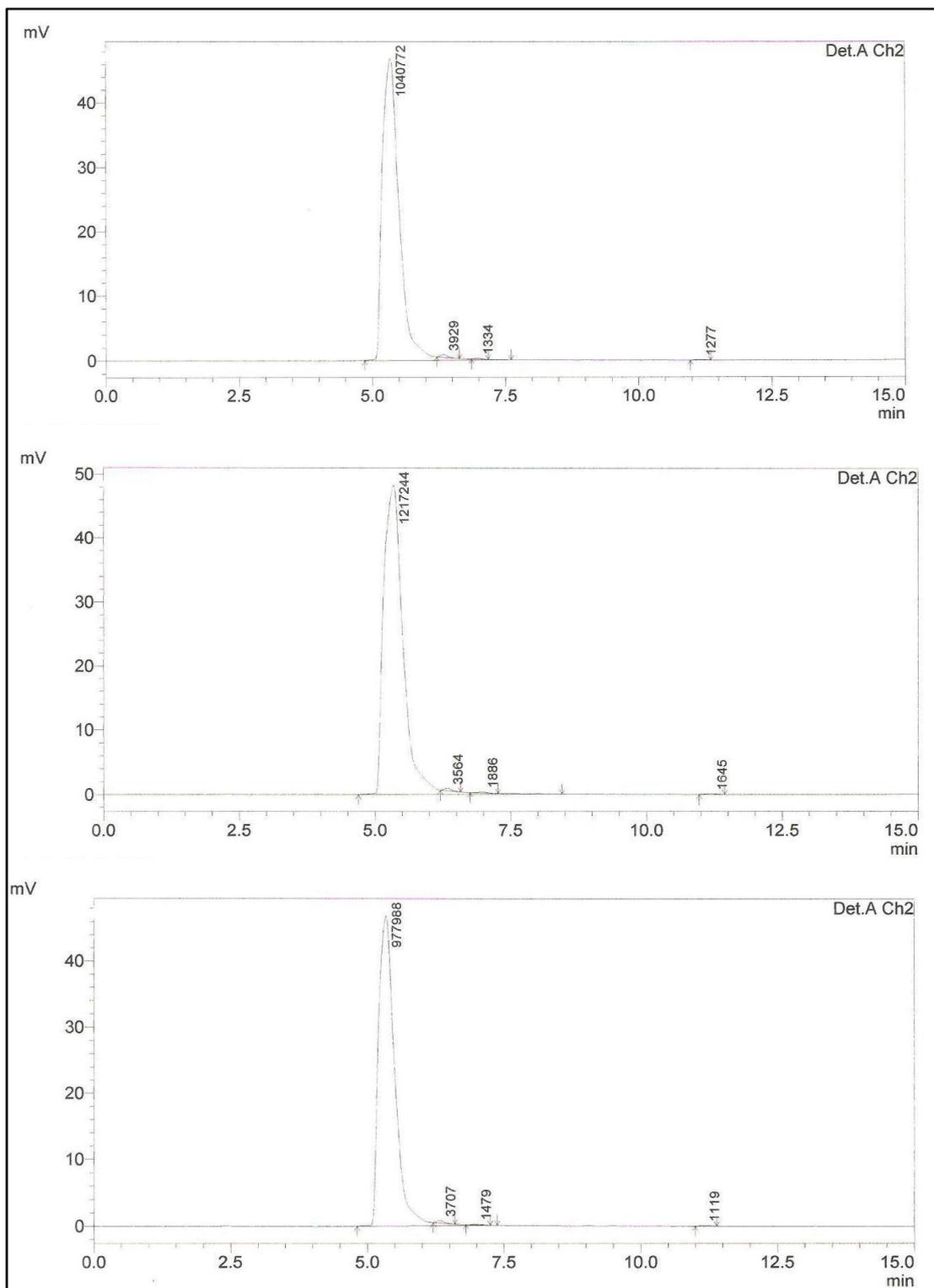


Det.A Ch2

Legenda: Det.A Ch1 – 275 nm; Det.A Ch2 – 320 nm. Cada canal com leitura feita em triplicata.

Figura 17 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com EtOH+H₂O.

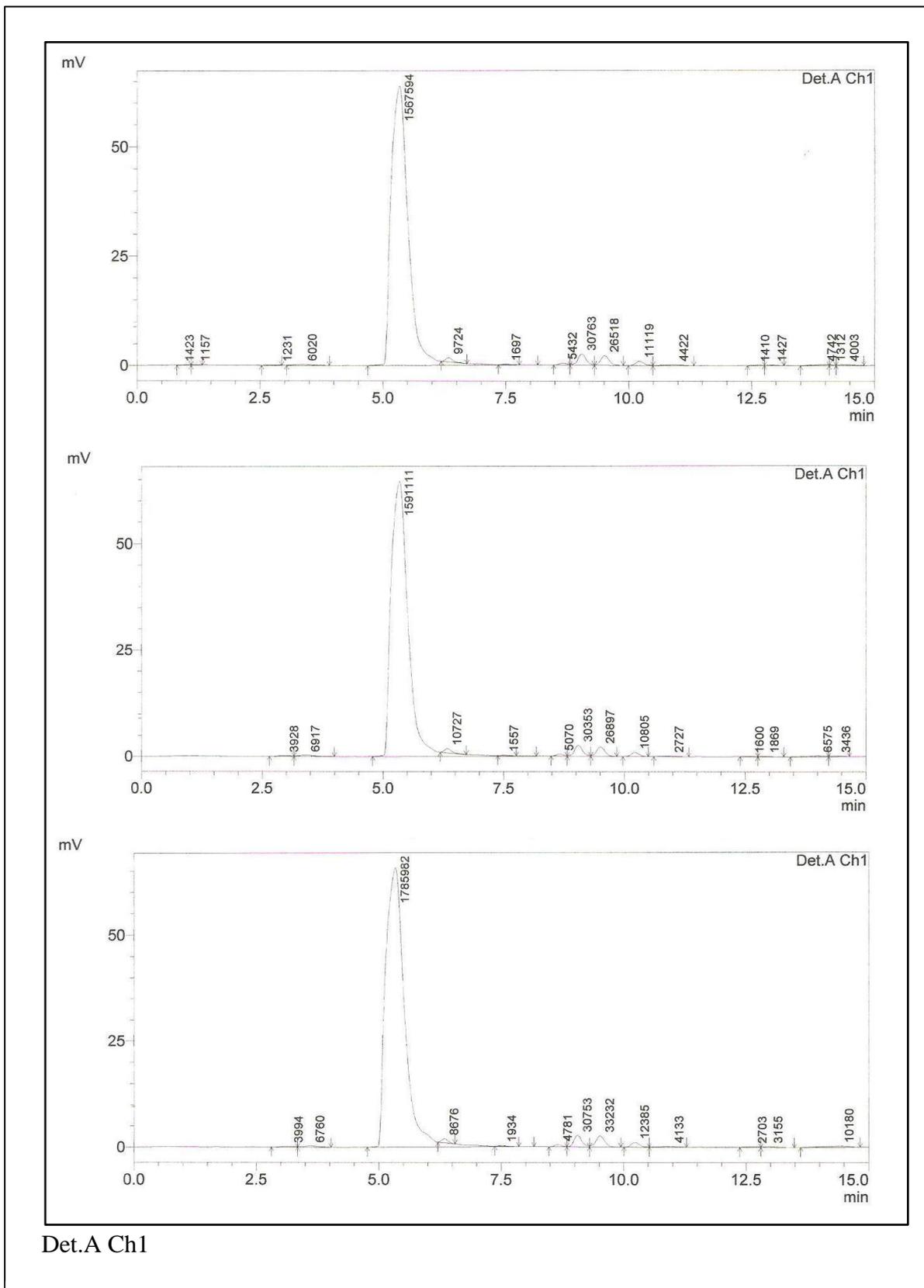


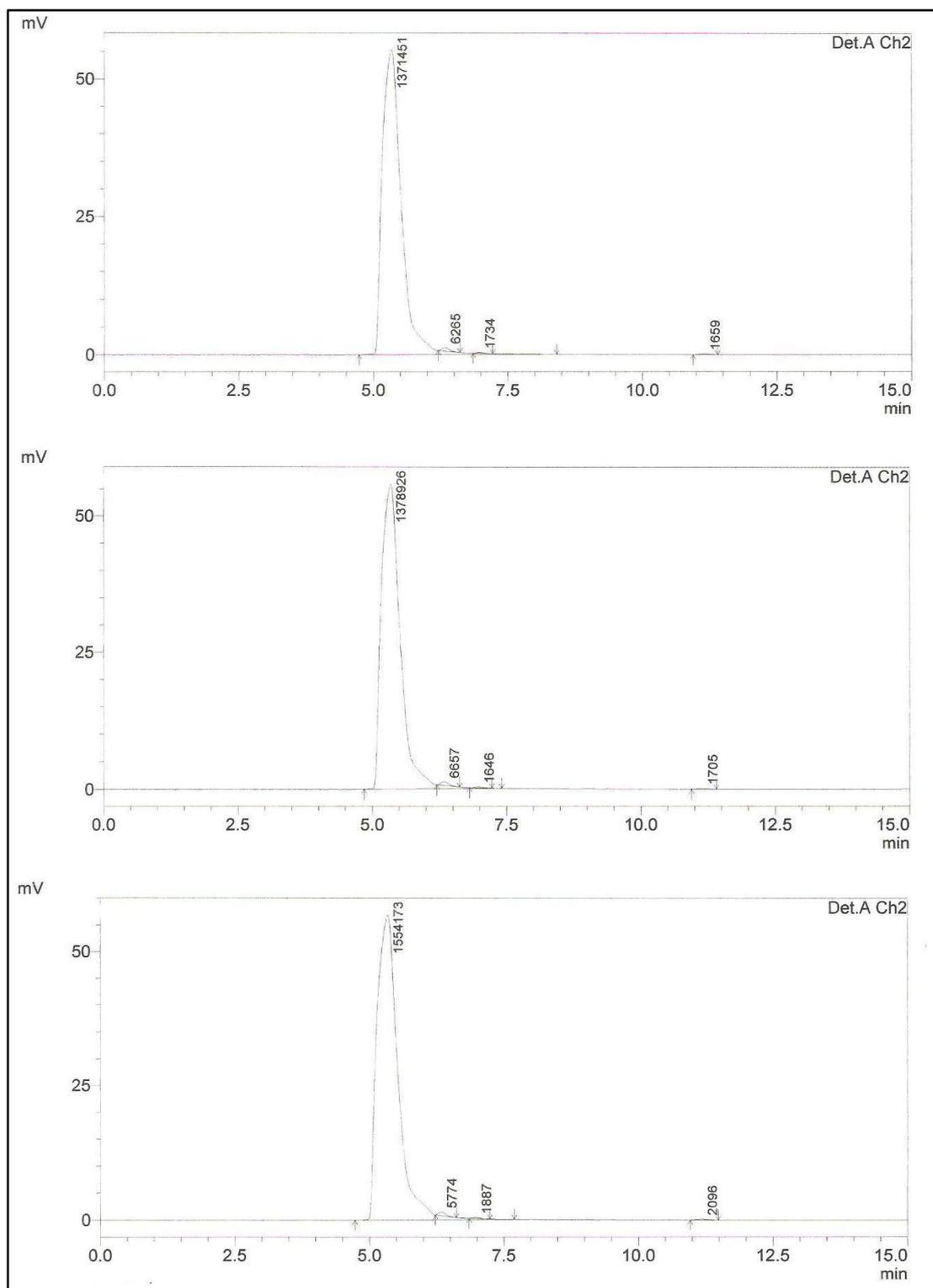


Det.A Ch2

Legenda: Det.A Ch1 – 275 nm; Det.A Ch2 – 320 nm. Cada canal com leitura feita em triplicata.

Figura 18 – Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da rutina extraída com H₂O.





Det.A Ch2

Legenda: Det.A Ch1 – 275 nm; Det.A Ch2 – 320 nm. Cada canal com leitura feita em triplicata.

Embora existam métodos mais sofisticados que diminuem o tempo e o volume de solvente utilizado, eles requerem o uso de equipamentos de custo elevado e que exigem certo preparo para manuseá-los. O método descrito neste trabalho é de fácil compreensão e promove um favorecimento daqueles que fazem o extrativismo dos frutos da fava d'anta, possibilitando a extração da rutina que é o principal produto da fava d'anta em termos econômicos, gerando um maior lucro do produto comercializado.

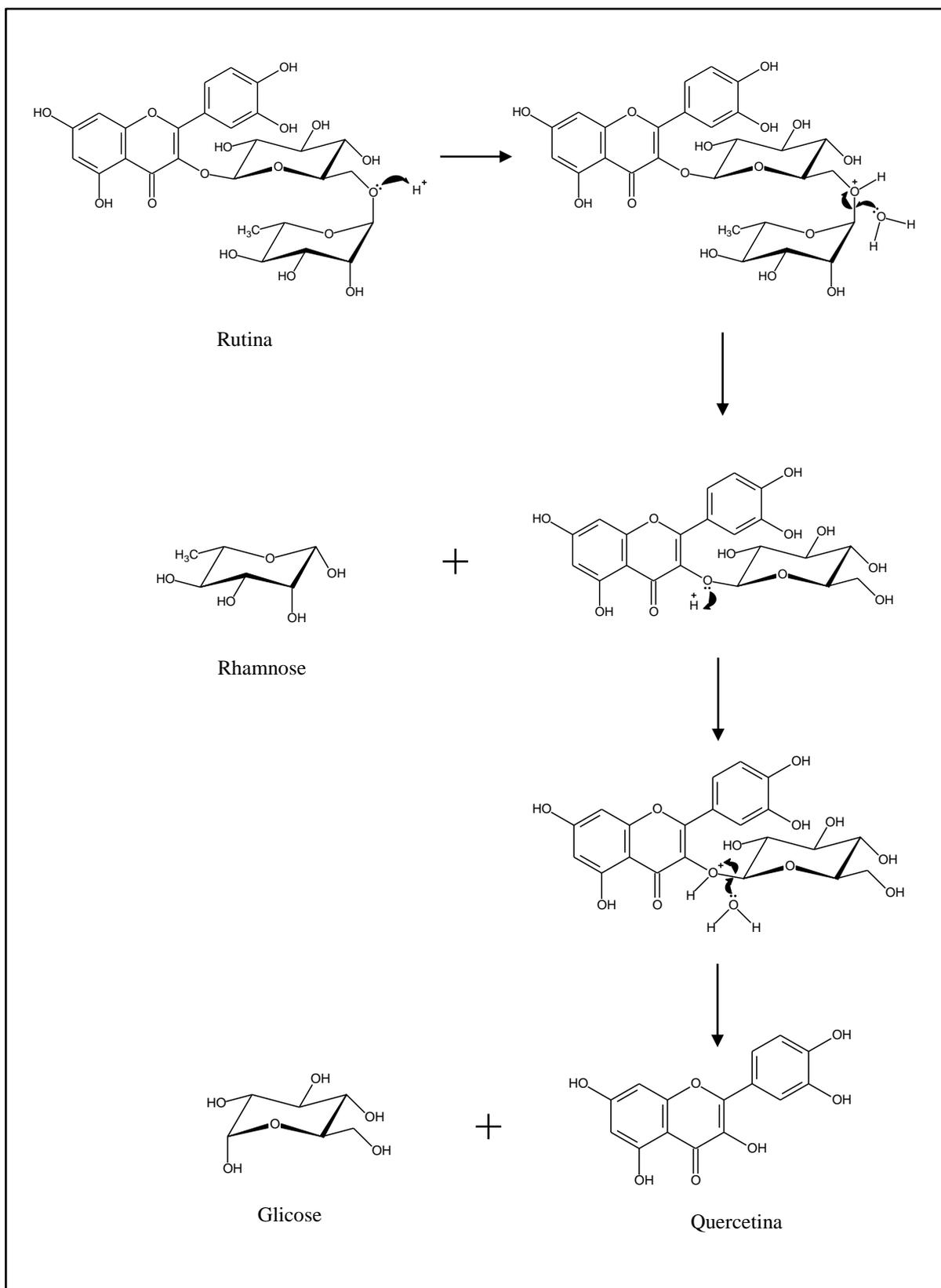
Os frutos da fava d'anta são vendidos em média a R\$ 0,15 (quinze centavos) o quilo, a rutina comercializada nacionalmente alcançou valores em média de 14 dólares/ kg (LADIM e COSTA, 2012; SANTOS, 2006). Na extração mais econômica, cujo solvente utilizado foi a água, o rendimento médio da rutina foi de 13%, ou seja, seria necessário cerca de 8 kg de fava d'anta para obter 1 kg de rutina. Tendo em vista os valores comerciais apresentados, 8 kg de fava traria um lucro de R\$ 1,20, enquanto com 1 kg de rutina o lucro seria de R\$ 35,00 (considerando o valor do dólar igual a R\$ 2,50).

A nível industrial, é extremamente viável a exploração da fava d'anta para extração da rutina em regiões onde a espécie é nativa, gerando emprego com maior fonte de renda na região. Os demais solventes utilizados trariam um maior custo de extração porém o rendimento da rutina seria maior, sendo necessário um estudo mais detalhado sobre custo e benefício o que não constitui objetivo deste trabalho.

5.2 Hidrólise da rutina: quercetina

A hidrólise da rutina ocorre mecanisticamente por sucessivas protonações dos oxigênios das ligações glicosídicas, sucedidas por ataques de moléculas de água ocasionando a hidrólise e formando, quercetina, glicose e rhamnose, conforme proposta mecanística representada pelo esquema na Figura 19. O resfriamento da mistura reacional permite a precipitação da quercetina, que encontra-se em um meio extremamente ácido, sendo necessárias lavagens sucessivas com água até pH em torno de 5,0.

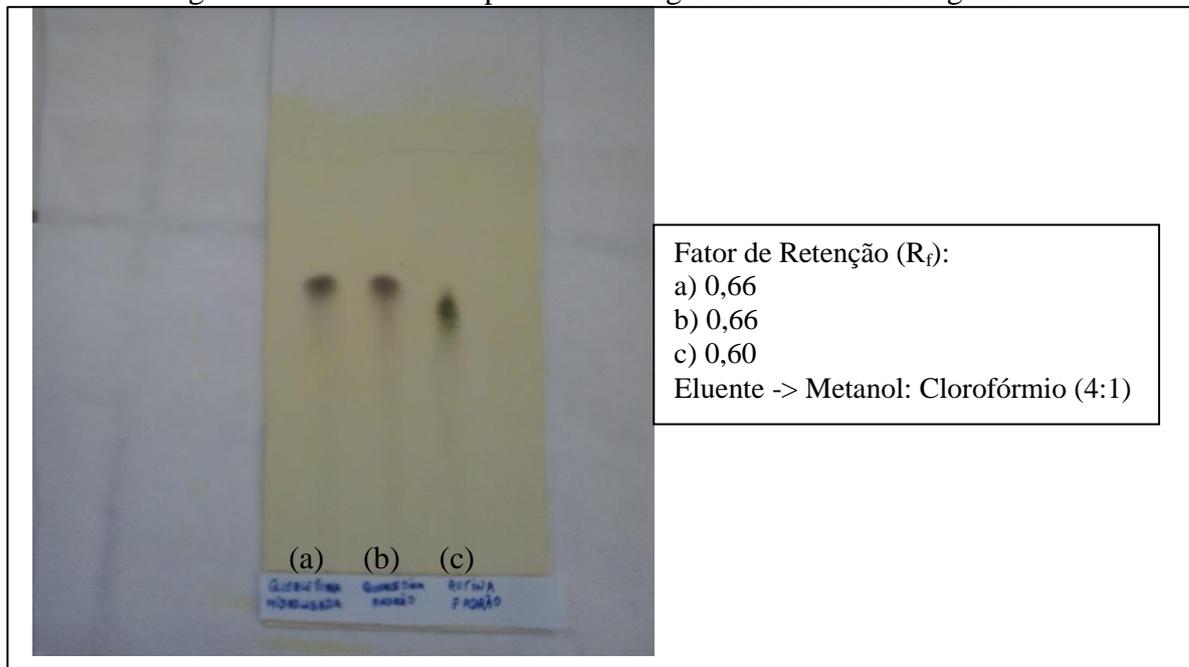
Figura 19 – Esquema de hidrólise da rutina.



Fonte: Própria autora.

A obtenção da quercetina teve rendimento de 44,70 %. O perfil cromatográfico em CCD esta mostrado na Figura 20, usando como fase móvel metanol:clorofórmio (4:1).

Figura 20 – Amostra em placa cromatográfica de camada delgada.



Legenda: a) quercetina hidrolisada; b) quercetina padrão; c) rutina padrão. Fonte: Própria autora.

A curva de calibração foi construída com base em dados de análise em sistema CLAE com detector ajustado em 274 nm, cuja equação da curva de calibração, representada no Gráfico 1, que demonstra uma correlação positiva entre as variáveis foi $y = 32781175x - 151587,30$, em que y representa a área do pico no espectro e x à concentração da substância em mg/mL, com coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$. Com base na equação da reta, o grau de pureza apresentado pela quercetina hidrolisada foi de 99,9% (Figura 21).

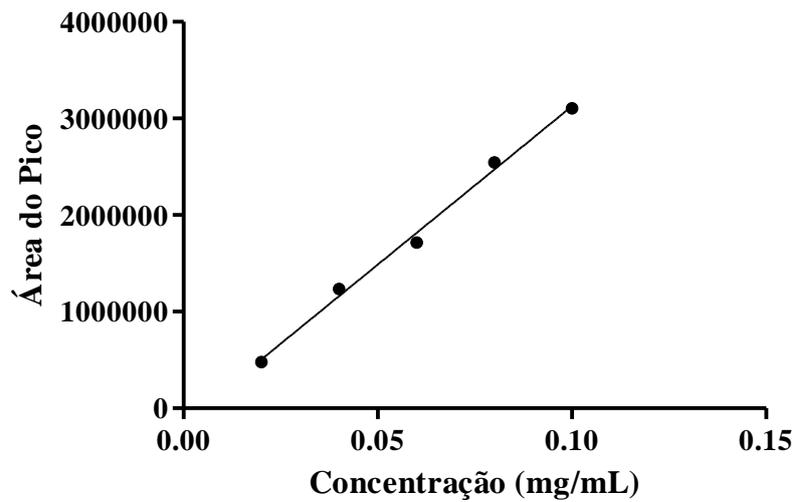
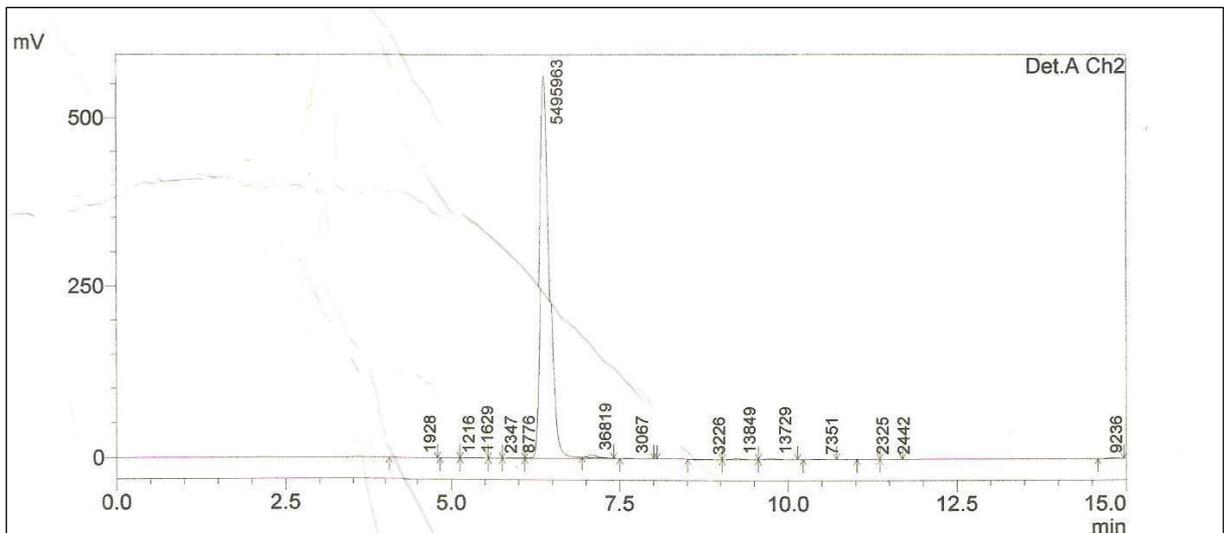


Gráfico 1 – Curva de calibração da quercetina.

Figura 21 - Representação da cromatografia líquida de alta eficiência da quercetina hidrolisada.

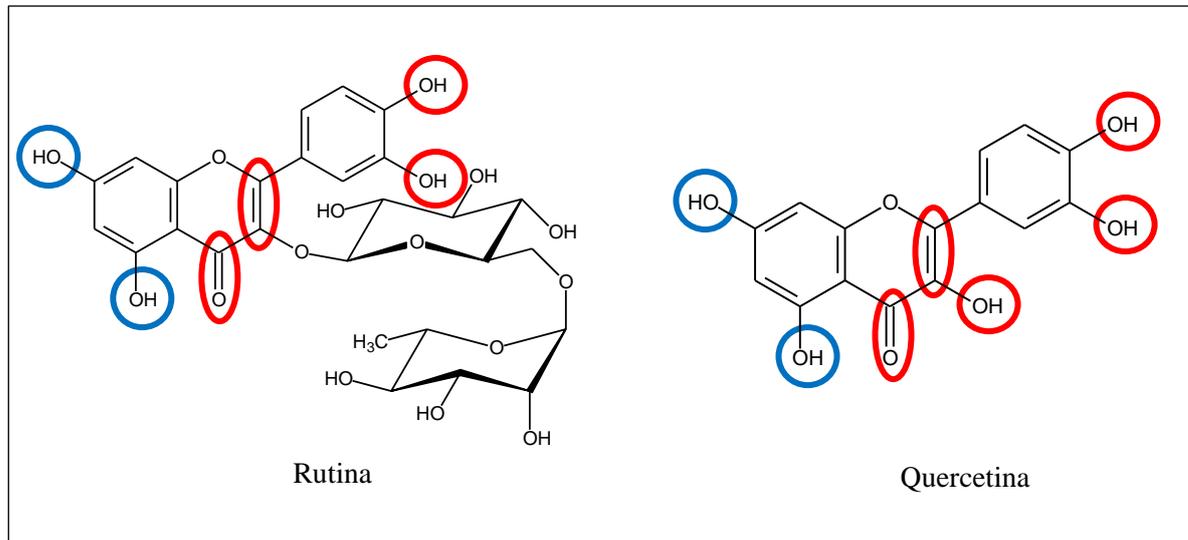


Legenda: Det.A Ch2: 274 nm

5.3 Atividade antioxidante da rutina e da quercetina

Com base nas informações apresentadas sobre a relação estrutura-atividade de flavonoides, é possível atribuir à quercetina um maior potencial antioxidante quando comparada à rutina, devido a primeira apresentar um substituinte hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C, o que não é observado na estrutura química da rutina, conforme Figura 22.

Figura 22- Relação estrutura- atividade da Rutina e Quercetina. Em azul substituintes menos importantes à atividade antioxidante. Em vermelho substituintes importantes à atividade antioxidante.



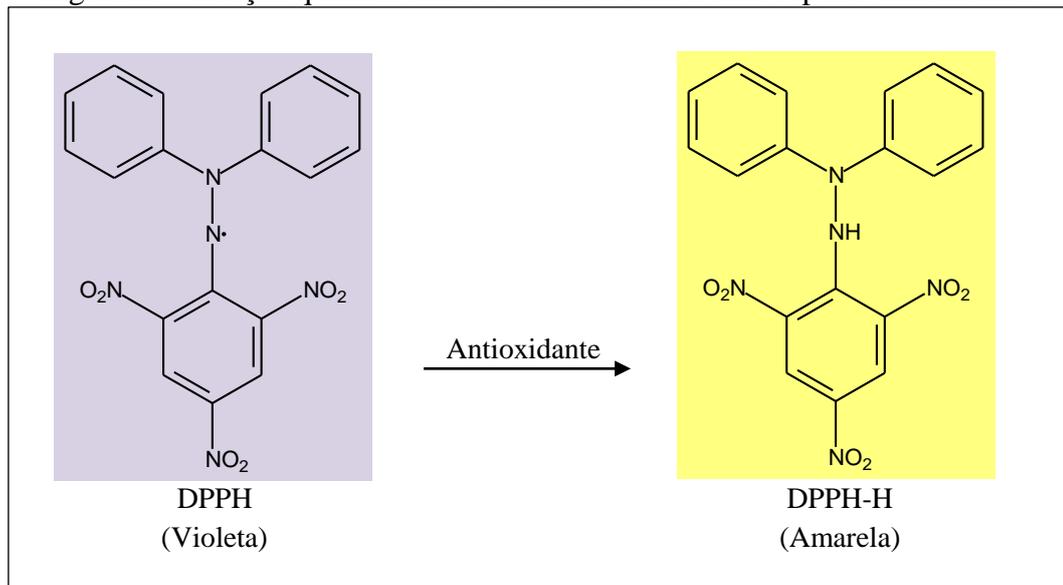
Fonte: Adaptada de SCOTTI et al.,2007.

Tendo como base as concentrações eficientes da rutina e da quercetina para reduzir 50% do radical DPPH apresentadas na literatura (PASQUINI-NETTO et al., 2012; BIANCO E SANTOS, 2010), foram definidas as concentrações utilizadas nos testes do presente estudo.

5.3.1 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH

O DPPH é um radical livre com coloração púrpura e absorvância no comprimento de onda entre 515 e 528 nm. A presença de um antioxidante reduz o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila a difenil-picril-hidrazina, que apresenta coloração amarela, conforme Figura 23. Caracterizado como um radical livre estável, devido à presença de ligações duplas alternadas no anel benzênico, conferindo à molécula um efeito de ressonância que permite a deslocalização do elétron desemparelhado por toda sua extensão, auxiliando na sua estabilidade, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com este radical (BORGES et al.,2011; ALVES et al 2010).

Figura 23 - Reação química entre o radical DPPH e uma espécie antioxidante



Fonte: Adaptada de GÓMES, LÓPEZ E TAÍPE, 2011.

A quercetina, segundo os resultados demonstrados no Gráfico 2, apresenta maior atividade antioxidante para reduzir o radical DPPH em relação à rutina, mesmo em concentrações baixas, como 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ a quercetina mantém os níveis de radicais livres extremamente baixos.

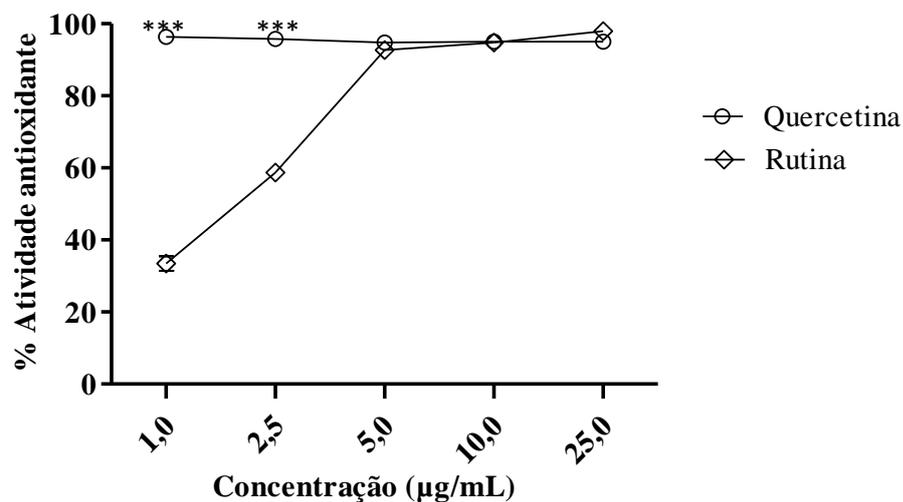
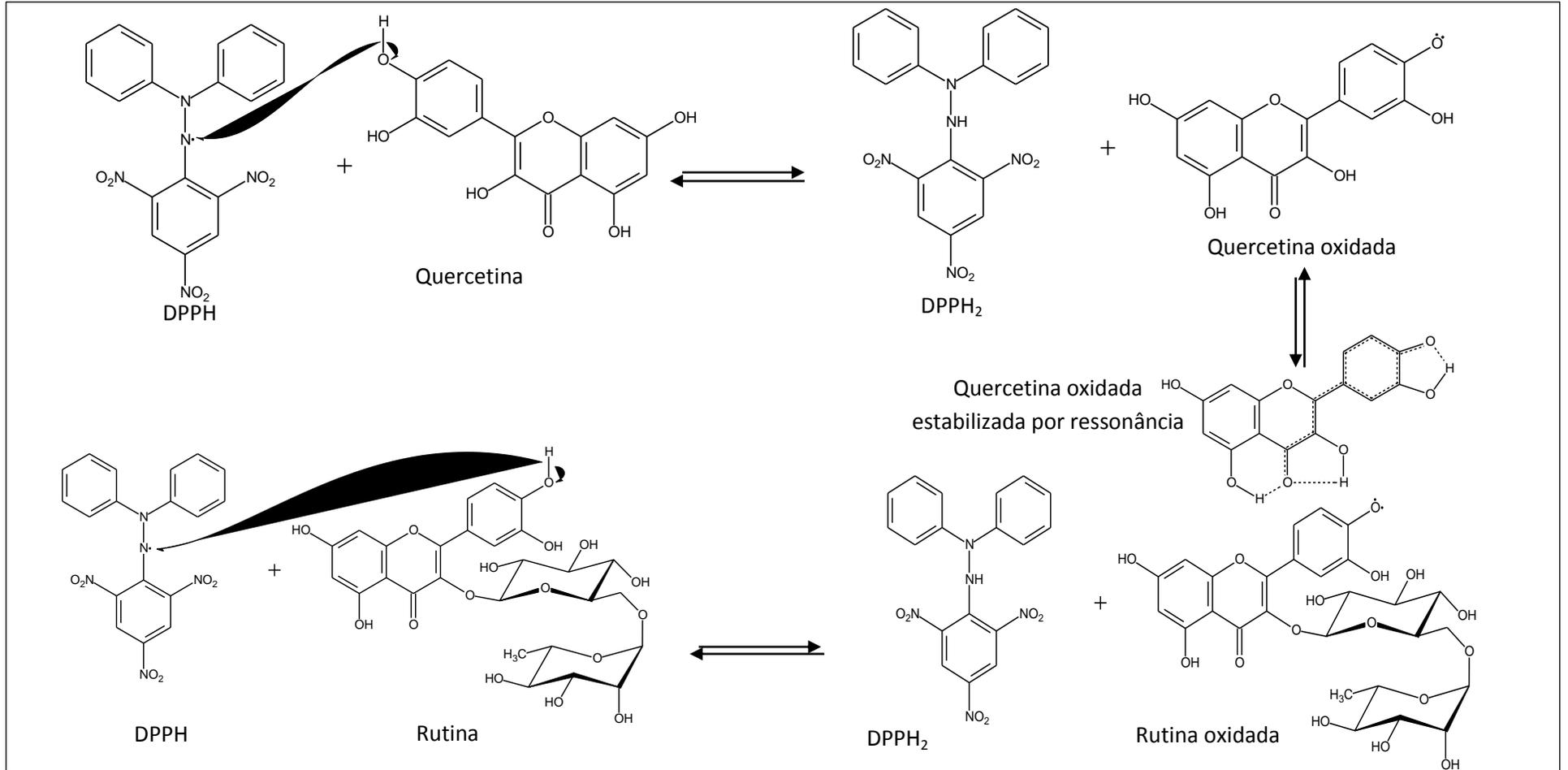


Gráfico 2 - Efeito de diferentes concentração de rutina e quercetina frente ao radical DPPH. Os resultados são expressos como porcentagem de atividade antioxidante. Dados mostram média \pm E.P.M. valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$.

A concentração eficiente capaz de reduzir 50% do DPPH foi de $2,01 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ para a rutina e $0,61 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$ para a quercetina.

Ao doar um elétron para o radical livre DPPH a quercetina e a rutina se tornam oxidadas, porém estabilizadas por ressonância, cuja reação está demonstrada na Figura 24. O grupo glicose presente na rutina ocasiona uma interação repulsiva entre a rutina e o radical livre, este impedimento estérico que não ocorre na quercetina também pode justificar a maior capacidade antioxidante da quercetina em relação à rutina.

Figura 24 - Reação do DPPH com a quercetina e a rutina.



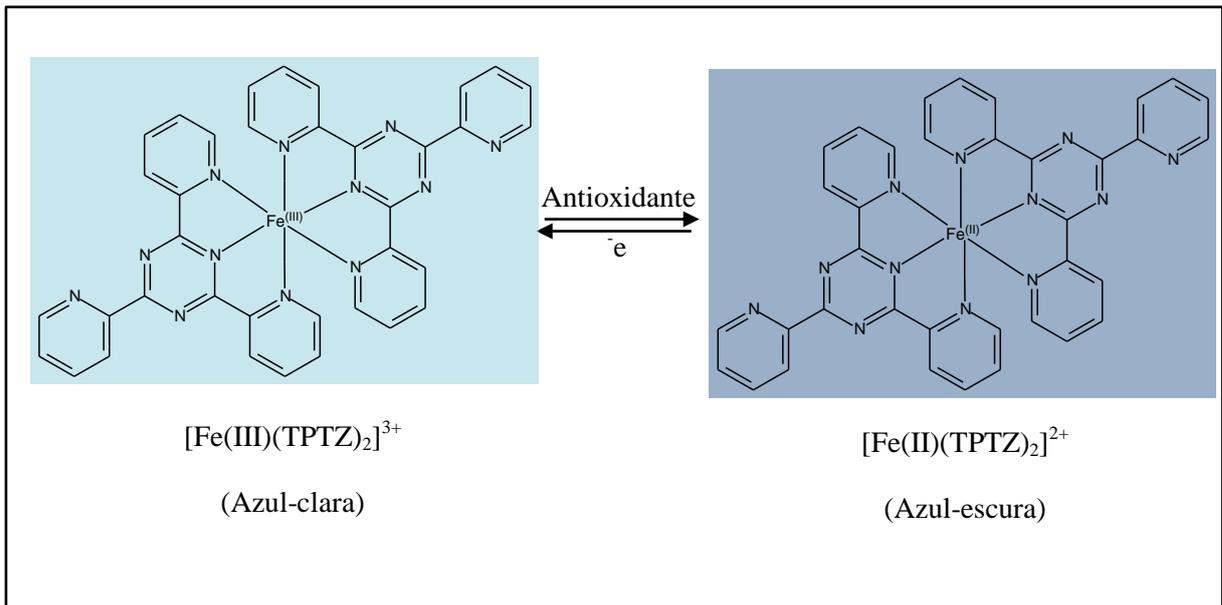
Fonte: Adaptado de <

http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=UFnlqMiUTFCLSVoSdU9qTQ4Ucmq1ngPI6HYOVVGRjmWVQSezXek-5CMtO2QrxstKaRdjzpBtG2tMMoYJJ3FwA== > Acesso em: 07 de jan. de 2015.

5.3.2 Atividade antioxidante *in vitro* pelo método de redução do ferro (FRAP)

O complexo férrico-tripiridiltiazina possui coloração azul clara, na presença de um antioxidante em condições ácidas ele sofre redução formando o complexo ferroso-tripiridiltiazina que possui coloração azul intensa e absorção máxima em 595 nm, Figura 25, sendo o poder antioxidante avaliado por meio do aumento da absorbância.

Figura 25 – Poder antioxidante de redução do ferro .



Fonte: Adaptada de RUFINO et al., 2006.

O ferro é sequestrado *in vivo* por proteínas, dificultando sua participação nas reações de oxidação mediada por radicais livres. Portanto a capacidade da substância testada em reduzir os íons ferro, reflete a sua capacidade em reduzir a formação de espécie reativas de oxigênio, que lhes confere a característica de antioxidante (SOUSA, 2013).

Por meio do aumento da absorbância de acordo com o Gráfico 3, a quercetina tem maior potencial para redução do ferro do que a rutina, sendo que na concentração de 25 µg/mL a diferença entre as duas substâncias é muito significativa com $p < 0,01$. O grau de hidroxilação e a extensão das conjugações se relacionam com a capacidade de redução do ferro. Os valores baixos de absorbância podem ser positivos para antioxidantes já que o Fe^{2+} é mais reativo que o Fe^{3+} para formar peróxido de hidrogênio, podendo exercer um efeito pro-oxidante (SOUSA, 2013).

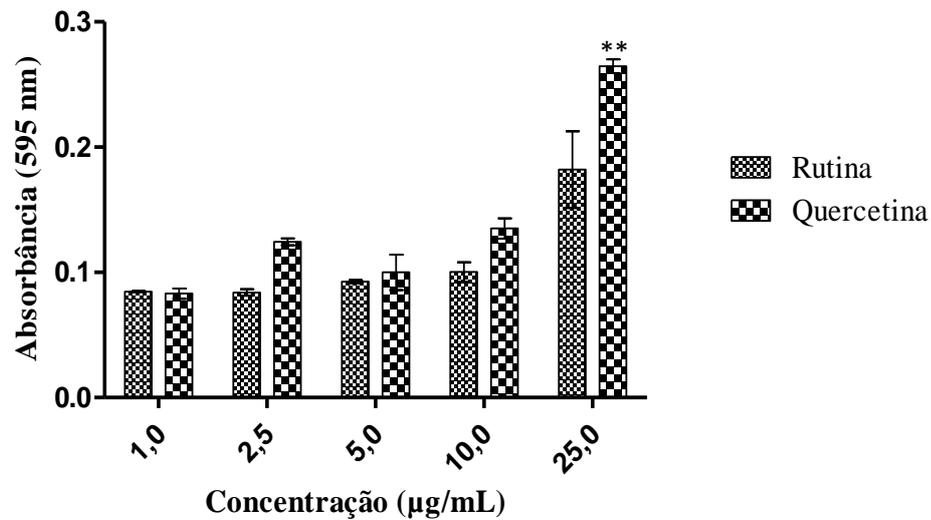


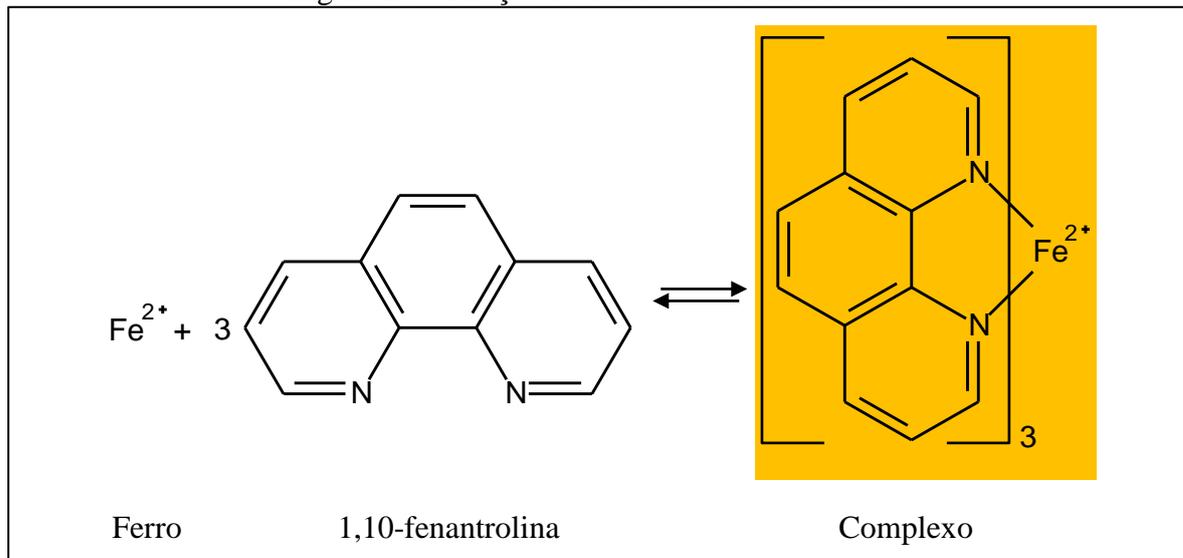
Gráfico 3 – Absorbância do complexo ferroso frente a quercetina e a rutina. Dados mostram média \pm E.P.M. valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$.

5.3.3 Atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade quelante de íons Fe^{2+}

O ferro é sequestrado *in vivo* por proteínas, dificultando sua participação nas reações de oxidação mediada por radicais livres. Portanto a capacidade da substância testada em reduzir os íons ferro, reflete a sua capacidade em reduzir a formação de espécie reativas de oxigênio, que lhes confere a característica de antioxidante (SOUSA, 2013).

Quelante é um agente utilizado para capturar, transportar e/ou eliminar substâncias (principalmente metais) do organismo, sendo chamado de quelato o agente quelante junto ao íon metálico. O teste quelante de ferro baseia-se na medida do complexo formado pelo ferro disponível e a fenantrolina (Figura 26), quanto maior a quantidade de ferro quelado pela substância testada, menor o número de íons disponível para a fenantrolina e menor a absorbância (BRANCO, 2010).

Figura 26 – Reação do ferro com a fenantrolina



Fonte: Adaptado de BRANCO, 2010.

Os resultados não demonstram atividade eficiente de quercetina e rutina como agentes quelantes em concentrações baixas, sendo a melhor porcentagem de quelação obtida com 25 $\mu\text{g/mL}$ de rutina e quercetina. Porém, quando comparadas concentrações iguais de quercetina e rutina, a primeira apresenta uma ligeira vantagem conforme Gráfico 4.

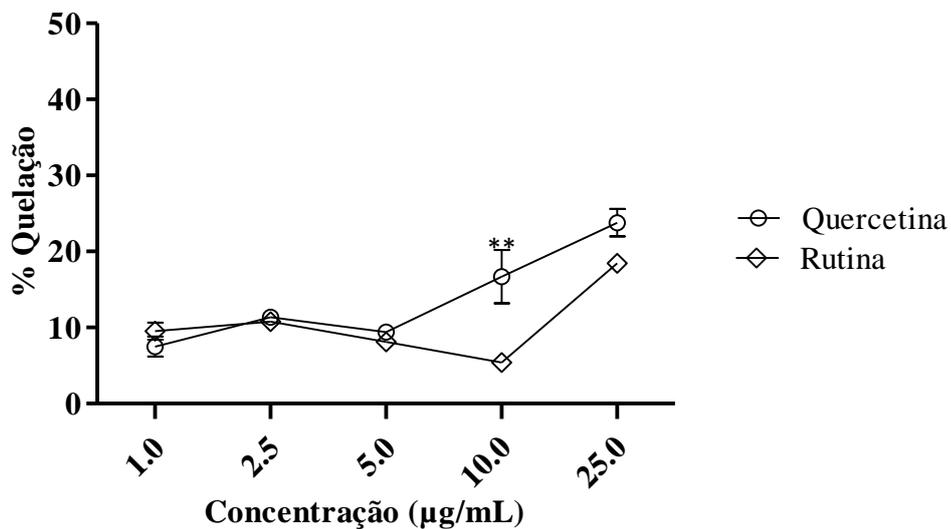


Gráfico 4 - Atividade quelante de ferro (Fe^{2+}) de Quercetina e rutina. Dados mostram média \pm E.P.M. valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $P < 0,01$.

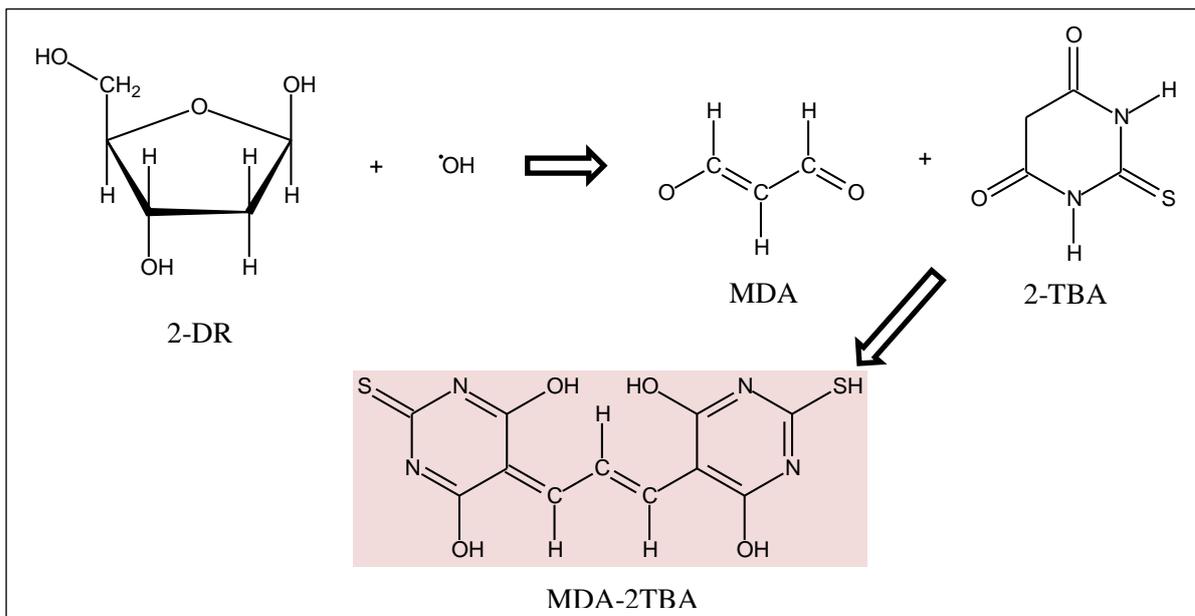
Alguns flavonóides exibem forte atividade antioxidante sobre radicais livres porém demonstram atividade pró-oxidante em presença de metais de transição (ALVES et al., 2010).

Como a atividade pró-oxidante das substâncias em análise não foi avaliada, não é possível afirmar a influência dessa atividade nos resultados apresentados. Devido aos baixos índices de poder de quelação do ferro das substâncias, não foi possível obter uma equação da reta de regressão que possibilitasse calcular a concentração eficiente capaz de quelar 50% do ferro.

5.3.4 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela degradação da desoxirribose

O radical hidroxil (HO^\bullet) pode ser facilmente sequestrado *in vitro*, sendo muito eficiente nos testes com antioxidantes. O mesmo porém não ocorre *in vivo*, sendo necessárias quantidades elevadas de substâncias antioxidantes. Isso ocorre devido à meia-vida curta deste radical. Gerado por meio de uma reação entre o H_2O_2 com metais de transição como o ferro, o radical hidroxil, em contato com a desoxirribose, dará início ao processo de peroxidação lipídica que terá como produto secundário o MDA (malondialdeído), que é detectado pela complexação deste com o TBA, após aquecimento em condições ácidas, como mostrado na Figura 27, sendo a absorbância máxima em 532 nm (ALVES et al, 2010; VIGNOLI, BASSOLI e BENASSI, 2011; LIMA e ABDALLA, 2001). Substâncias com propriedades antioxidante podem competir com a desoxirribose pelo radical hidroxil, evitando a peroxidação lipídica e a formação de MDA, com consequente diminuição da absorbância.

Figura 27 - Degradação da desoxirribose.



Fonte: Adaptado de LIMA et al., 2001.

Tanto a quercetina como a rutina demonstraram eficiência em sequestrar o radical hidroxil, e todas as concentrações testadas para as duas substâncias apresentaram resultados satisfatórios como demonstra o Gráfico 5. Como as concentrações são baixas, testes *in vivo* seriam necessários para confirmar a efetividade do potencial antioxidante destas substâncias frente ao radical hidroxil, que apresenta comportamento diferenciado em organismos biológicos.

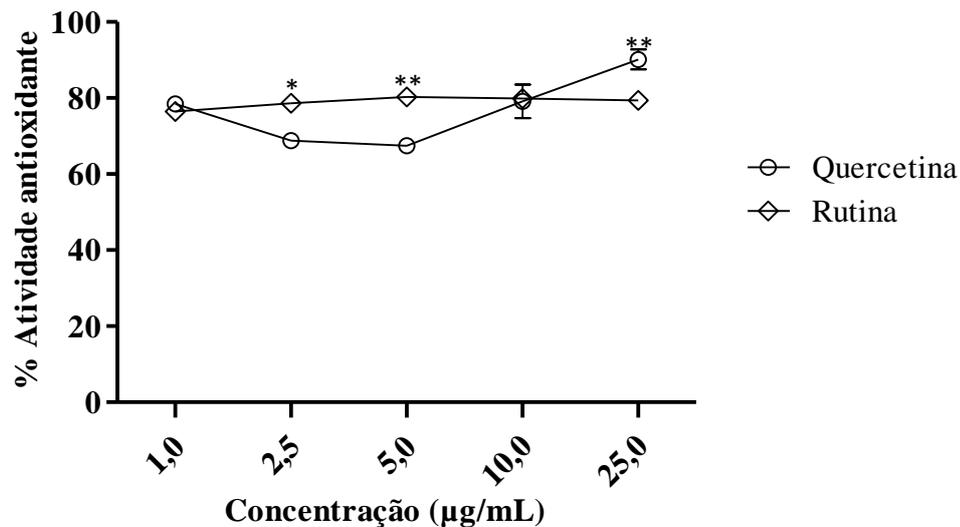


Gráfico 5 - Efeitos de diferentes concentrações de quercetina e rutina sobre o radical hidroxil produzido pela reação Fe^{2+} (0,1 mM) e H_2O_2 (1 mM). Dados mostram média \pm E.P.M. valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.3.5 Atividade antioxidante *in vitro* pela inibição da peroxidação lipídica

TBARS é um ensaio utilizado para estimar a peroxidação dos lipídios nas membranas e sistemas biológicos (COSTA et al., 2012). A peroxidação lipídica foi avaliada pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (NASSER et al., 2010). A gema de ovo homogeneizada foi usada como substrato rico em lipídios. No processo oxidativo ocorre a doação de um átomo de hidrogênio a partir de uma cadeia de ácidos graxos insaturados de fosfolipídios gerando peróxidos lipídicos, se propagando em uma reação em cadeia, tendo como produto o MDA que reage com o TBARS denunciando a ocorrência do processo de peroxidação lipídica (SREELATHA e PADMA, 2009; COSTA et al., 2012).

Conforme demonstrado no Gráfico 6, tanto a rutina como a quercetina apresentam um potencial antioxidante, sendo que para a rutina existe a necessidade de um aumento das concentrações para obter resultados mais satisfatórios.

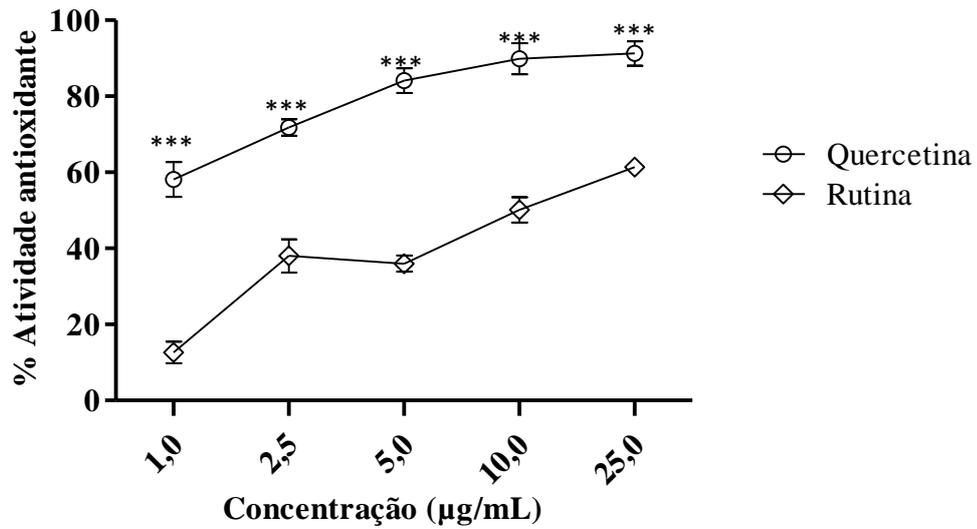
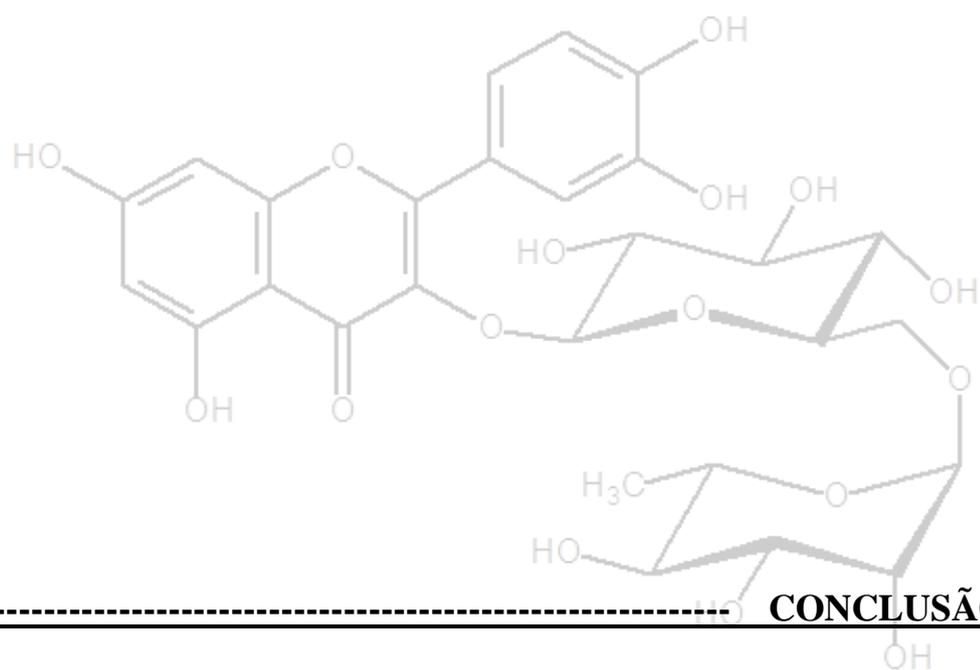


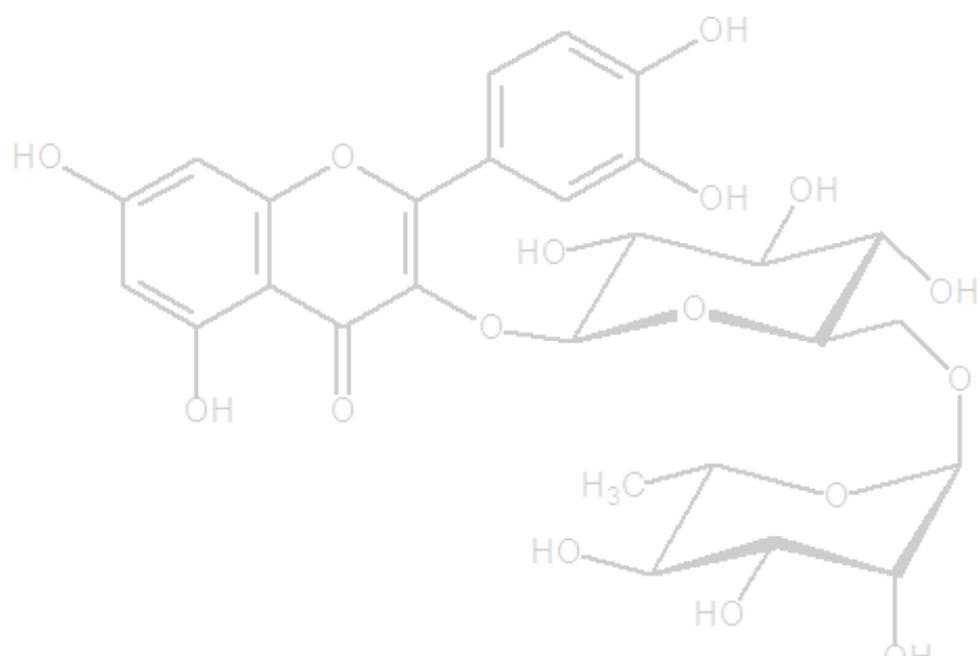
Gráfico 6 - Efeitos de diferentes concentrações de quercetina e rutina sobre a peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolípidos de gema de ovo na presença de Fe^{2+} (20 μM). Dados mostram média \pm E.P.M. valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata.*** $P < 0,001$.

A concentração para inibir 50% da formação de MDA para a quercetina foi de $2,01 \pm 4,27 \mu\text{g/mL}$ e para a rutina, $21,50 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$. Segundo os resultados a quercetina apresenta grande vantagem no potencial antioxidante para evitar a peroxidação lipídica em relação a rutina, com diferença de resultados extremamente significantes.



6. CONCLUSÃO

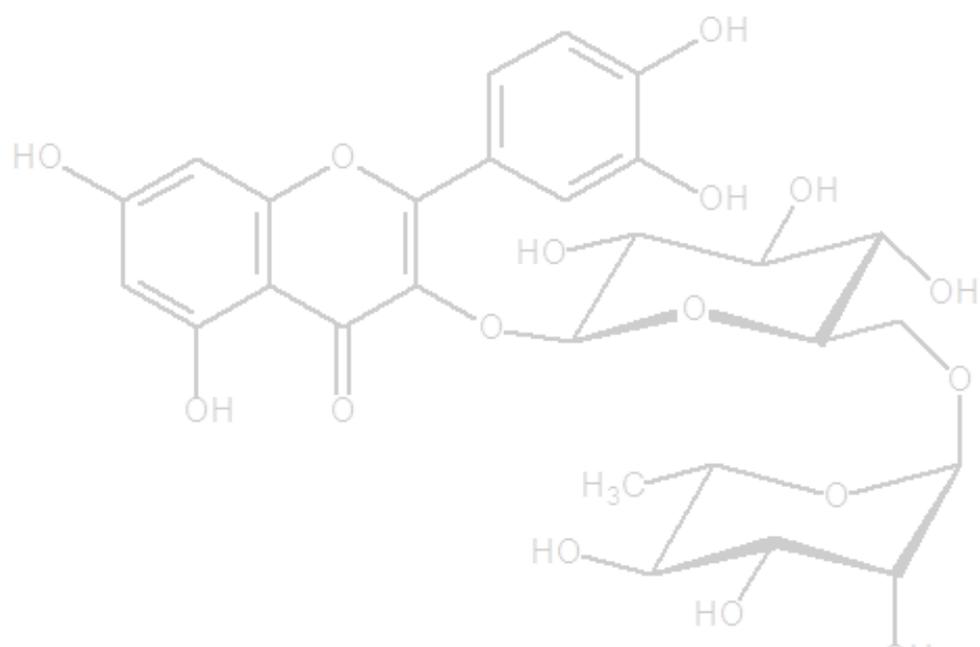
- O rendimento da rutina obtida nesse estudo foi maior do que os rendimentos dessa substância descritos na literatura, que estavam sempre em torno de 10%.
- O rendimento da rutina pode ser aumentado na extração das vagens de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne com a combinação de EtOH/H₂O, apresentando grau de pureza de 99,28%, evitando o uso do solvente metanol, consideravelmente mais tóxico.
- A hidrólise de rutina originou quercetina com alto grau de pureza, 99,9%
- O sequestro do radical livre DPPH é um método eficiente na utilização de quercetina e rutina em baixas concentrações no teste *in vitro* de atividade antioxidante.
- A rutina e a quercetina foram eficientes na redução do ferro pelo método FRAP, indicando mais uma característica de antioxidantes.
- Em baixas concentrações não é possível usar quercetina e rutina para testes comparativos de atividade quelante.
- Na competição com a desoxirribose pelo radical hidroxil, tanto a quercetina como a rutina foram significativamente eficientes em baixas concentrações, sendo uma alternativa de controle positivo nesse tipo de teste.
- Embora a quercetina seja mais eficiente para evitar o processo de peroxidação lipídica verificado no teste TBARS, a rutina também apresenta resultados satisfatórios, sendo estes flavonoides ferramentas de proteção a biomoléculas como fosfolipídios.
- Os resultados positivos para os testes antioxidantes *in vitro*, podem justificar a utilização da rutina e da quercetina em futuros testes *in vivo*.



PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- Otimizar as variáveis: volume, tempo e temperatura para cada solvente, visando melhorar o rendimento antes e após purificação;
- Na combinação de solventes variar as proporções de cada solvente utilizado, na perspectiva de melhorar o rendimento da substância;
- Possibilitar por meio da divulgação desse trabalho o desejo de investir na indústria farmacêutica do nosso país, especialmente na região do cariri cearense, tendo em vista um método relativamente fácil e de baixo custo para extração de rutina, podendo agregar valores com a síntese de quercetina.
- Realizar testes *in vivo* para confirmar os efeitos antioxidantes da rutina e da quercetina, bem como a produção de produtos à base de rutina e quercetina, visando favorecer um melhor aproveitamento das suas propriedades terapêuticas.



REFERÊNCIA

8. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. **As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 16 (supl.), p. 678-689, dez. 2006.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante em vitro em substratos orgânicos.** Química Nova, vol. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, L.F. **Plantas medicinais e fitoquímica no Brasil- Uma visão histórica.** 1 ed., editora pharmabooks, 2010. 412p.
- ARAÚJO, M.E.M.B.; FRANCO, Y.E.M.; ALBERTO, T.G.; SOBREIRO, M.A.; CONRADO, M.A.; PRIOLLI, D.G.; SAWAYA, A.C.H.F.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; CARVALHO, P.O. **Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidante and antiproliferative activities.** Food Chemistry 141, 266–273, 2013.
- AZEVEDO, C.A; MEDEIROS, M.E.; GARRIDO, F.M.S. **Efeito da ativação mecanoquímica na formação de cordierita.** 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.
- BARBOSA, M.M; **Obtenção de carotenoides e flavonoides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010. 110p.
- BARONI, E.G.; AGOSTINI, F.; TOSS, D.; SILVA, S.M. **Extração de óleo essencial de *Lippia alba* utilizando hidrodestilação e extração assistida por micro-ondas: Um estudo comparativo.** XIX Encontro de Jovens Pesquisadores, Caxias do Sul, 2011.
- BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água.** Química Nova, vol.24, No. 2, p. 172-175, 2001.
- BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. **Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico.** Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v.1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- BIANCO, M.B.; SANTOS, C.A.M. **Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr.** Revista Brasileira de Biociência, Porto Alegre, v.8, n. 3, p. 238-241, jul./set., 2010.
- BICALHO, K.U. **Estudo fitoquímico de *Virola sebifera* associado ao controle de formigas cortadeiras.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011. 166p.
- BORGES, L.L.; LÚCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer-Goiânia, vol.7, n.12, 2011.
- BRANCO, E.M. **Estudo da migração do ferro das latas para a cerveja.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Aveiro, 2010.
- BUENO, F.H. **Avaliação de parâmetros para análise do teor de pesticidas em água utilizando a técnica SPME em headspace para extração das amostras analisadas em GC-**

- MS. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012. 45p.
- BUSZEWSKI, B.; KAWKA, S.; SUPRYNO, ;WICK,Z.; WOLSKI,T. **Simultaneous isolation of rutin and esculin from plant material and drugs using solid-phase extraction.** Journal of Pharmaceutical e Biomedical Analysis, vol.11, n.3, p. 211-215, 1993.
- CAMARGO, A.M. **Inventário do ciclo de vida do metanol para as condições brasileiras.** (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. 132p.
- CAVALHEIRO, C.V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.
- CHO, Y.J.; BAE, I.Y.; INGLET, G.E.; LEE, S. **Utilization of tartary buckwheat bran as a source of rutin and its effect on the rheological and antioxidant properties of wheat-based products.** Industrial Crops and Products 61, 211–216, 2014.
- CHUA, L.S. **A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities.** Journal of Ethnopharmacology, 150, p. 805-817, 2013.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP. Editora da Unicamp, 2006.
- COSTA, D.A.; OLIVEIRA, G.A.P.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. **Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 33 (4), 567-575, 2012.
- CRAVEIRO, A.A. **Ciência e tecnologia vão agregar valor a planta do Cariri usada pela indústria farmacêutica e de cosmético.** 12 de dez. 2012. Disponível em: <<http://desimbloglio.blogspot.com.br/2012/12/conhecimento-cientifico-agrega-valor-ao.html>> Acesso em 10 de out. 2014.
- DAI, X.; HUANG, Q.; ZHOU, B.; GONG, Z.; LIU, Z.; SHI, S. **Preparative isolation and purification of seven main antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-Zhong) leaves using HSCCC guided by DPPH-HPLC experiment.** Food Chemistry 139, p. 563-570, 2013.
- DÔRES, R.G.R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.).** (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.
- DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. **Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo.** Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada, v.28, n.3, p. 241-249, 2007.
- DRINKWATER, J.M.; TSAO, R.; LIU, R.; DEFELICE, C.; WOLYN, D.J. **Effects of cooking on rutin and glutathione concentrations and antioxidant activity of green asparagus (*Asparagus officinalis*) spears.** Journal of Functional Foods 12, 342–353, 2015.
- ERLUND, I. **Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology.** Nutrition Research 24, p. 851-874, 2004.

- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.S.; OLIVEIRA, C.M. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis UFSC, 2000. 821p.
- FERREIRA, M.M.M.; OLIVEIRA, A.H.C.; SANTOS, N.S. **Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica**. Revista Agroambiental Online, v. 2, n. 2, p. 57-60, jul-dez, 2008.
- FILGUEIRAS, C.T.; SOARES, A.L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. **Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho**. Química Nova, vol. 32, No. 7, p. 1787-1791, 2009.
- FILHO, R.B. **Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacaubano**. Química Nova, vol. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.
- FILIZOLA, B.C. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da fava d'anta**. Instituto Sociedade, População e Natureza. Brasília, 2013. 76p.
- GÓMES, A.L.R.T.; LÓPEZ, F.V.; TAIPE, G.M. **Evaluación de la actividad antioxidante del pico peruano mediante voltametria cíclica**. Revista Sociedade Química do Perú, 77 (2), 2011.
- GUARATINE, T.; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICOLO, P. **Antioxidante na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficiência**. Química Nova, Vol. 30, No. 1, 206-213, 2007.
- HERNÁNDEZ-HERRERO, J.A.; FRUTOS, M.J. **Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices**. Food Chemistry 173, 495–500, 2015.
- JIMÉNEZ-ALIAGA, K.; BERMEJO-BESCÓS, P.; BENEDÍ, J.; MARTÍN-ARAGÓN, S. **Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects *in vitro* and potent antioxidant activity in APP_{swe} cells**. Life Sciences 89, 939 – 945, 2011.
- KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistido por ultra-som**. Revista analítica, n.3, p. 34-39, 2003.
- LANDIM, L.P.; COSTA, J.G.M. ***Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d'anta) – Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção**. Revista da Biologia, 9(6), p.6-11, 2012.
- LANDIM, L.P. **Quantificação de flavonoides em extratos de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne e avaliação de propriedades antioxidantes e fotoestabilidade**. (Dissertação de mestrado). Universidade Regional do Cariri. Crato, 2012. 159p.
- LEITE, A.C.; CABRAL, E.C.; SANTOS, D.A.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. **Isolamento do alcaloide ricina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente**. Química Nova, vol. 28, n.6, p.983-985, 2005.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol.37, n. 3, st./dez., 2001.

- LÖLIGER, J. **The use of antioxidants in food.** In: **Aruoma, O. I.; Halliwell, B.;** (Ed.). Free radicals and food additives. London: Taylor and Francis, p. 129-150, 1991.
- LUCCI, P.; PACETTI, D.; NÚÑEZ, O.; FREGA, N.G. **Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis.** Chromatography – The most versatile method of chemical analysis. Chapter 5, 2012.
- LUZ, P.L. **Estudo do ultra-som com técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1998.
- MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. **Flavonoides e seu potencial terapêutico.** Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MATERSKA, M. **Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity – A review.** Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, vol. 58, n.4, p. 407-413, 2008.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 3 ed. Fortaleza: edições UFC, 2009. 150p.
- MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; MUNIZ, L.B.; SILVA, E.Y.Y. **Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema beta-caroteno/ácido linoleico.** Embrapa. ISSN 1414-9850, Brasília, Junho, 2009.
- MENG, L.; LIU, R.; SUN, A.; WU, S.; LIU, N. **Separation and purification of rutin and acaciin from the chinese medicinal herb *Herba cinssi* by combination of macroporous absorption resin and high-speed counter-current chromatography.** Journal of Chromatography Science, vol.47, may/june 2009.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.S.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. **Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.** Phytotherapy Research. Pytother. Res. 15, p. 127-130, 2001.
- NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; CAMARGOS, C.R.D.; AMARAL, J.C.; COSTA, L.M.; SOUSA, A.N.; OLIVEIRA, F.Q. **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.** Revista Brasileira de Farmácia, 92(4): 327-332, 2011.
- NASSER, A.L.M.; DOURADO, G.K.; CARLOS, I.Z.; CESAR, T.B. **Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada, 33(2): 275-279, 2011.
- NGUYEN, T.A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D.S.; HOOK, J.M. **An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex.** Food Chemistry 136, 186–192, 2013.
- NÓBREGA, J.A.; TREVISAN, L.C.; ARAÚJO, G.C.L.; NOGUEIRA, A.R.A. **Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation.** Spectrochimica Acta Part B 57, P. 1855–1876, 2012.
- OLIVEIRA, L.H.M.; CARVALHO, R.S. **Um olhar sobre a história da química no Brasil.** Revista Ponto de Vista, v. 3, p. 27-37, 2007.

PANALA, A.S.; CHAN, T.S.; BRIEN, P.J.O.; EVANS, C.A.R. **Flavonoid B-Ring chemistry and antioxidante activity fast reaction kinetics**. Biochemical and Biophysical Research Communications 282, p. 1161-1168, 2001.

PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. **The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica***. Ultrasonics Sonochemistry, 8, p. 299–301, 2001.

PASQUINI-NETTO, H.; MANUENTE, F.A.; MOURA, E.L.; REGASINI, L.O.; PINTO, M.E.F.; BOLZANI, V.S.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; VELLOSA, J.C.R. **Avaliação antioxidante, anti- e pro-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae – Caesalriniioideae)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.14, n.4, p. 666-672, 2012.

PAVEGLIO, G.C. **Estudo de parâmetros reacionais em moinho de bolas na síntese de ARIL (Heteroaril)-1H-Pirazóis**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013. 124p.

PEDRIALI, C.A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: Determinação de suas propriedades físico-químicos e avaliação de suas atividades antioxidantes**. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005. 127p.

PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. **Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera**. Química Nova, 21 (6), 1998.

PIETTA, P. G. **Flavonoids as antioxidants**. Journal of Natural Products, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PUNTEL, R.L.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; **Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro**. Neurochemical Research, 30(2), p.225-255, 2005.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostra de própolis**. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996. 81p.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMÉNEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa ISSN 1679-6535. Fortaleza, Julho-2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMÉNEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Embrapa ISSN 1679-6535. Fortaleza, dezembro-2006.

SABIR S. M.; ROCHA J. B. T.; **Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice**. Food Chemistry, 111, 845–851, 2008.

SANSEVERINO, A.M. **Microondas em síntese orgânica**. Química Nova, vol.25, No. 4, p. 660-667, 2002.

- SANTOS, E.A.M. **Obtenção de rutina de *Dimorphandra* sp.: do processamento dos frutos à obtenção de extrato enriquecido.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Belo Horizonte, 2006.
- SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I.C.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol.43, n.2, abr./jun., 2007.
- SILVA, F.A.N.G.; NASCIMENTO, M.; MEDEIROS, M.E.; GARRIDO, F.M.S. **Estudo termodinâmico da ativação mecanoquímica da bauxita com CaO.** XXIV ENTMME, Salvador, Bahia, 2011.
- SILVA, M.A.; SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.; VILEGAS, W. **Flavonóides isolados de *Syngonanthus suberosus* Giul. (Eriocaulaceae) por HSCCC (High Speed Countercurrent Chromatography).** 25ª Reunial Anual da Sociedade Brasileira de Química –SBQ, 2002.
- SILVA, S.R. **Ecologia de população e aspectos etnobotânicos de *Dimorphandra gardneriana* Tullasne (Leguminosae) na Chapada do Araripe, Ceará.** (Tese de Doutorado). Universidade de Brasília. Brasília, 2007. 103p.
- SILVA, S.R.; SCARIOT, A.; MEDEIROS, M.B. **Uso e prática de manejo de faveira (*Dimorphandra gardneriana* Tul.) na região da Chapada do Araripe, Ceará: Implicações ecológicas e sócio-econômicas.** Biodiversidade Brasileira, 2(2), p. 65-73, 2012.
- SIMÕES, O.C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVIC, P.R. **Farmacognosia – Da planta ao medicamento.** Porto Alegre/ Florianópolis. Editora da UFSC/ Editora da Universidade UFRGS. 2002, 833p.
- SKOOG, S.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de química analítica.** 8 ed. [s.l.]: Thompson Learning, 2006.
- SOUSA, M.S.B. **Mecanismo de ação antioxidante de extratos de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth).** (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- SREELATHA, S.; PADMA P.R. **Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity.** Plant Foods Hum Nutr. 2009,64(4), 303-11, 2009
- SUÁREZ, C.A. **Estabilidade de espécies de arsênio em amostras biológicas acoplando cromatografia líquida ou eletroforese capilar com detectores atômicos.** (Tese de doutorado). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.
- SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. **Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos.** UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, 14(4):263-9, 2012.
- SUDRÉ, C.P. **Recursos genéticos de fava d'anta: Caracterização morfológica e molecular, e conservação in vitro de acessos coletados em diferentes regiões brasileiras.** (Tese de Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, 2009.
- TENREIRO, M.L. **Avaliação antioxidante e quantificação de fenólicos totais das frações de clorofórmio e acetato de etila resultantes da partição do extrato etanólico bruto do**

caroço de abacate (*persea americana mil.*). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2010.

VIGNOLI, J.A.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. **Atividades antioxidantes de cafés torrado e solúvel: Padronização e validação de métodos**. *Coffee Science*, Lavras, v.7, n.1, p.68-75, jan./abr., 2012.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. **Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde**. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

XIE, J.; SHI, L.; ZHU, X.; WANG, P.; ZHAO, Y.; SU, W. **Mechanochemical-assisted efficient extraction of rutin from *Hibiscus mutabilis* L.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, p. 146–152, 2011.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. **In vitro antioxidant properties of rutin**. *LWT* 41, 1060-1066, 2008.

YANG, Y.; ZHANG, F. **Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus*(Thunb.) Sieb.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, p. 308–313, 2008.

ZENG, H.; WANG, Y.; KONG, J.; NIE, C.; YUAN, Y. **Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants**. *Talanta*, 83, p. 582–590, 2010.