

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS TOLEDO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**MONIQUE MALIKOSKY**

**QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DA *ERUCA SATIVA*  
(RÚCULA) CULTIVADA DE FORMA HIDROPÔNICA NA REGIÃO OESTE  
DO PARANÁ**

**DISSERTAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOTECNOLÓGICOS  
PPGQB**

**TOLEDO  
2020**

**MONIQUE MALIKOSKY**

**QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DA *ERUCA SATIVA* (RÚCULA)  
CULTIVADA DE FORMA HIDROPÔNICA NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

**Quantification of total flavonoids of such *Eruca sativa* (rucula) cultivated  
hydroponic in the west region of Paraná**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR –, Câmpus Toledo.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane da Silva Lobo  
Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa

TOLEDO  
2020



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Toledo



MONIQUE MALIKOSKY

**QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DA ERUCA SATIVA (RÚCULA) CULTIVADA DE FORMA  
HIDROPÔNICA NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 24 de Setembro de 2020

Prof.a Viviane Da Silva Lobo, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Elisiane Ines Dalloglio Chaves, Doutorado - Seed - Secretaria Estadual de Educação do Paraná

Prof.a Magali Silva De Amorim, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 12/12/2020.

**TOLEDO  
2020**

## RESUMO

MALIKOSKY, MONIQUE. Quantificação de flavonoides totais da *Eruca sativa* (rúcula) cultivada de forma hidropônica na região oeste do Paraná. Toledo. 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo.

A hortaliça *Eruca sativa*, popularmente conhecida como rúcula, apresenta vários benefícios à saúde, tais como, atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em organismos vivos, por apresentar em sua composição proteínas, vitaminas A e C, sais minerais, como ferro e cálcio, e flavonoides. Os flavonoides têm recebido muita atenção nos últimos anos devido aos vários efeitos benéficos podendo citar os mais importantes, auxilia no processo anti-inflamatório, nos sintomas da menopausa, previne alguns tipos de câncer e ajuda manter a saúde do coração. O trabalho teve como o objetivo quantificar flavonoides totais da rúcula produzida de forma hidropônica na região oeste do Paraná, utilizando diferentes métodos de extração, temperaturas e formas de agitação, além de também considerar o tempo de cultivo da planta. Também foram avaliadas suas atividades: antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. Primeiramente foram feitos testes probatórios, variando-se a concentração de metanol como solvente extrator dos flavonoides, a fim de identificar um método eficiente para a realização de todas as outras etapas. O material vegetal fresco foi cortado manualmente, utilizando 5 g das folhas da hortaliça picada em 100 mL de mistura de solvente com a umidade determinada em 92%. Os testes foram continuados com o processo de agitação em *Shaker* a 170 rpm, em triplicatas a temperatura ambiente de 25°C e 55°C, variando-se o tempo de extração em 12, 24, 36 e 48 h e o tempo de cultivo da planta, em 7, 14 e 21 dias. Após a obtenção dos extratos, realizou-se a leitura dos flavonoides totais no espectrofotômetro UV-Vis em 440 nm de comprimento de onda, em comparação com a curva padrão de quercetina. Para os testes realizados, o resultado que se apresentou mais satisfatório foi com a concentração de solvente de 80% de MeOH, nos tempos de extração de 12 e 24h. Ao final, empregou o teste de ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ) onde se observou que para o procedimento de extração com o *Shaker*, os melhores resultados foram obtidos quando se empregou a temperatura de 55°C em 12 h de extração com a planta cultivada por 7 dias. Para os testes antimicrobianos fez-se a interpretação dos resultados baseando-se de que quanto mais flavonoides presente no extrato maior será o halo de inibição. Na atividade antioxidante utilizando os métodos de DPPH e peróxido de hidrogênio, obteve-se a conclusão de que a atividade é diretamente proporcional à concentração de flavonoides na planta.

**Palavras chave:** Rúcula, Extrato vegetal, Flavonoides.

## ABSTRACT

MALIKOSKY, MONIQUE. Quantification of total flavonoids of *Eruca sativa* (arugula) grown hydroponically in western Paraná. Toledo. 2020. Dissertation (Master's Degree) - Graduate Program in Chemical and Biotechnological Processes, Federal Technological University of Paraná, Toledo..

The vegetable *Eruca sativa*, popularly known as arugula, has several health benefits, such as anti-inflammatory and antioxidant activities in living organisms, as it contains proteins, vitamins A and C, mineral salts such as iron and calcium, and flavonoids. Flavonoids have received a lot of attention in recent years due to the various beneficial effects, which can mention the most important, it helps in the anti-inflammatory process, in the symptoms of menopause, it prevents some types of cancer and it helps to maintain heart health. The work aimed to quantify the total flavonoids of the arugula produced in a hydroponic way in the western region of Paraná, using different extraction methods, temperatures and forms of agitation, in addition to also considering the plant cultivation time. Its activities were also evaluated: antimicrobial, antifungal and antioxidant. First, probative tests were carried out, varying the concentration of methanol as the extraction solvent for flavonoids, in order to identify an efficient method for performing all other steps. The fresh vegetable material was cut manually, using 5 g of the chopped vegetable leaves in 100 mL of solvent mixture with the humidity determined in 92%. The tests were continued with the shaker stirring process at 170 rpm, in triplicates at an ambient temperature of 25 ° C and 55 ° C, the extraction time varying by 12, 24, 36 and 48 h and the plant cultivation time, in 7.14 and 21 days. After obtaining the extracts, the total flavonoids were read on the UV-Vis spectrophotometer at 440 nm wavelength, compared to the standard quercetin curve. For the tests carried out, the most satisfactory result was with the solvent concentration of 80% MeOH, in the extraction times of 12 and 24h. At the end, it used the ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ) where it was observed that for the extraction procedure with the Shaker, the best results were obtained when the temperature of 55 ° C was used in 12 h of extraction with the plant grown for 7 days. For the antimicrobial tests, the results were interpreted based on the fact that the more flavonoids present in the extract, the greater the halo of inhibition. In the antioxidant activity using the methods of DPPH and hydrogen peroxide, the conclusion was reached that the activity is directly proportional to the concentration of flavonoids in the plant.

**Keywords:** Arugula, Plant extract, Flavonoids.

***Pesquisar é acordar para o mundo.***

Marcelo Lamy

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter permitido a concluir mais essa etapa.

Aos meus pais Jelci Malikosky e Ivaldi Malikosky, por estar sempre presente e me ajudando.

Ao meu avô Wendelino Gabriel pelo colo e palavras de conforto, e para a minha anjinha Julita Gabriel, que cuidou e me ajudou muito bem de mim aqui na Terra e agora me cuida lá no céu.

Ao meu namorado Oldemar Hergesell, por me ajudar, apoiar e aguentar as minhas crises de desespero.

Aos técnicos dos laboratórios da UTFPR, em especial a Caroline Mariana de Aguiar por sempre me auxiliar em tudo que eu precisava e me socorrer nas horas de apuros (que não foram poucas kk).

À minha xuxu Ana Caroline Alves, por acordar de madrugada comigo para picar as rúculas e pesar nas longas horas da madrugada.

À minha tia Meri, pela comida e pousada.

Ao Adriel, Alexandre e ao Adson, por me ajudar nos testes e me orientar.

E à minha orientadora Viviane da Silva Lobo, por me ajudar incansavelmente, e aconselhar nunca desistir e sempre lutar pelos meus sonhos.

À Katia e à Deise pela disponibilidade e pela doação das rúculas para a pesquisa.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1</b> Estrutura básica dos flavonoides .....  | 15 |
| <b>FIGURA 2</b> Principais classes dos flavonoides.....   | 16 |
| <b>FIGURA 3</b> Estrutura da quercetina. ....   | 18 |
| <b>FIGURA 4</b> Eruca sativa (rúcula).....  | 20 |
| <b>FIGURA 5</b> Curva padrão para a determinação de flavonoides presente nos extratos da rúcula .....         | 35 |
| <b>FIGURA 6</b> Resultados da ANOVA par amostra C-24.....   | 41 |
| <b>FIGURA 7</b> Efeitos estimados para cada fator na obtenção dos extratos de rúcula. .                       | 41 |
| <b>FIGURA 8</b> Gráficos de superfície de resposta das condições de obtenção dos extratos de rúcula. ....     | 42 |
| <b>FIGURA 9</b> Curvas de contorno .....  | 43 |
| <b>FIGURA 10</b> Representação cúbica da predição das médias, a 95% de confiança...                           | 43 |
| <b>FIGURA 11</b> Cromatograma da curva padrão da quercetina.....  | 44 |
| <b>FIGURA 12</b> HPLC.....  | 44 |
| <b>FIGURA 13</b> Atividade antimicrobiana B.subtilis utilizando extrato de rúcula. ....                       | 45 |
| <b>FIGURA 14</b> Atividade antimicrobiana Trichoderma .....   | 46 |
| <b>FIGURA 15</b> Gráfico de barras do resultado das análises de antioxidante para os extratos de rúcula ..... | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABELA 1</b> Teores de flavonóis e flavonas em alguns alimentos brasileiros: verduras, frutas e legumes (continuação) .....           | 17 |
| <b>TABELA 2</b> Planejamento dos testes utilizando a folha da rúcula para a obtenção dos extratos de rúcula por Shaker .....             | 22 |
| <b>TABELA 3</b> Planejamento dos testes utilizando as folhas e o caule da rúcula para a obtenção dos extratos de rúcula por Shaker ..... | 23 |
| <b>TABELA 4</b> Gradiente para o padrão de quercetina na análise por HPLC .....  | 27 |
| <b>TABELA 5</b> Gradiente para as amostras na análise por HPLC .....   | 28 |
| <b>TABELA 6</b> Absorbância das soluções de quercetina .....   | 34 |
| <b>TABELA 7</b> Valor da absorbância de cada extração das folhas de rúcula, utilizando Shaker. ....                                      | 35 |
| <b>TABELA 8</b> Valor da absorbância de cada extração do caule e das folhas da rúcula, utilizando Shaker .....                           | 36 |
| <b>TABELA 9</b> Valor da absorbância da extração utilizando a extração com agitação ocasional.....                                       | 37 |
| <b>TABELA 10</b> Valor da absorbância da extração utilizando ultrassom .....   | 37 |

## LISTA DE SIGLAS

mg L<sup>-1</sup> – miligrama por litro.

g – gramas

cm – centímetro.

h – horas.

min – minuto

°C – grau Celsius.

mL – mililitro

nm – nanômetro

mg – miligrama

µL – microlitros

v/v – volume/volume.

% - porcentagem.

MeOH – metanol.

rpm – rotação por minuto.

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Abs – absorvância.

HPLC - High performance liquid chromatography

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 11 |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 12 |
| 1.1.1 Objetivo geral .....  | 12 |
| 1.1.2 Objetivos específicos .....   | 12 |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 14 |
| 2.1 PRODUTOS NATURAIS .....   | 14 |
| 2.1.1 FLAVONOIDES .....   | 15 |
| 2.1.1.1 QUERCETINA .....  | 18 |
| 2.2 RÚCULA .....  | 19 |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....  | 21 |
| 3.1 HORTALIÇA .....   | 21 |
| 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE RÚCULA .....   | 21 |
| 3.2.1 Extração com incubadora <i>Shaker</i> utilizando somente as folhas da rúcula <i>in natura</i> .....   | 22 |
| 3.2.2 Extração com incubadora <i>Shaker</i> utilizando o caule e as folhas da rúcula <i>in natura</i> .....   | 22 |
| 3.2.3 Extração em repouso com agitação manual ocasional utilizando somente as folhas da rúcula <i>in natura</i> .....   | 23 |
| 3.2.4 Extração por ultrassom utilizando somente as folhas da rúcula <i>in natura</i> .....  | 23 |
| 3.2.5 Extração com incubadora <i>Shaker</i> utilizando somente as folhas da rúcula <i>in natura</i> cultivadas em períodos diferentes .....                   | 24 |
| 3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIS TOTAIS .....   | 26 |
| 3.4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE FLAVONOIDES POR HPLC .....   | 27 |
| 3.5 ANÁLISE E PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE OBTENÇÃO DA MAIOR QUANTIDADE DE FLAVONÓIDES A PARTIR DA RÚCULA <i>IN NATURA</i> ..... | 28 |
| 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>Bacillus subtilis</i> E ANTIFÚGICA <i>Trichoderma</i> dos extratos metanólicos de rúcula .....                                | 29 |
| 3.7 ANÁLISE ANTIOXIDANTE .....  | 30 |
| 3.7.1 Método por DPPH .....   | 31 |
| 3.7.2 Método por peróxido de hidrogênio .....   | 32 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 34 |
| 4.1 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NO EXTRATO DE RÚCULA <i>IN NATURA</i> PELA METODOLOGIA UV-VIS .....  | 34 |
| 4.1.1 Quantificação de flavonoides variando-se concentração do solvente, tempo e temperatura de obtenção do extrato de rúcula <i>in natura</i> .....          | 35 |
| 4.1.1.1 Obtenção do extrato da folha de rúcula pela metodologia <i>Shaker</i> .....   | 35 |
| 4.1.1.2 Obtenção do extrato do caule e das folhas de rúcula pela metodologia <i>Shaker</i> .....  | 36 |
| 4.1.1.3 Obtenção do extrato de rúcula com agitação manual ocasional .....   | 36 |
| 4.1.1.4 Obtenção do extrato de rúcula com ultrassom .....   | 37 |
| 4.1.2 Quantificação de flavonoides no extrato variando-se o tempo de cultivo da rúcula hidropônica .....  | 38 |
| 4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3 ANÁLISE DE PRESENÇA DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS DE RÚCULA<br>POR HPLC  | 44 |
| 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>Bacillus subtilis</i> E ANTIFÚGICA <i>Trichoderma</i><br>DOS EXTRATOS DA RÚCULA IN NATURA..... | 45 |
| 4.5 ANÁLISE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE RÚCULA .....  | 47 |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....  | 48 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 49 |

## 1 INTRODUÇÃO

*Eruca sativa*, popularmente conhecida como rúcula, é considerada uma planta natural com altos teores benéficos, considerada uma planta de séculos afrodisíaca (AZARENKO; JORDAN; WILSON, 2014). Pertencente à família *Brassicaceae*, possuindo um sabor picante e odor agradável. É apontada como uma hortaliça folhosa herbácea, com crescimento rápido e ciclo curto, proveniente do sul europeu e do Ocidente da Ásia. Suas folhas são usadas geralmente na forma de saladas. Entre as suas espécies apenas três são de consumo humano, *Eruca sativa* Miller, *Diplotaxis tenuifolia* e *Diplotaxis muralis*, sendo a *Eruca sativa* a mais consumida no Brasil (FILGUEIRA, 2008).

Além disso, o consumo da rúcula apresenta várias vantagens, por ser uma planta rica em antioxidantes, proteínas, vitaminas A e C, que promovem a libido e melhoram a circulação sanguínea, sais minerais, como ferro e cálcio, o que está associado a uma dieta equilibrada, além de ser estimulante de apetite e possuir efeitos antiinflamatórios (SALA *et al.*, 2004). Como relatado por Maia, Medeiros e Filho (2006), isso vem contribuindo e se destacando no cenário mundial devido às suas propriedades nutricionais e fito terapêuticas.

Os compostos naturais são estudados no tratamento de várias doenças, incluindo os processos inflamatórios de várias razões, fornecendo assim um alívio dos sintomas. Entre os abundantes princípios ativos presente na natureza, os flavonoides integram uma das mais importantes classes de substâncias, nomeado como metabólicos secundários (SIMÕES, 2002).

Os metabólitos secundários apresentam importantes atividades biológicas e são considerados de grande valor comercial, desempenhando um papel importante na fitoterapia por possuírem vários efeitos biológicos e fornecendo tratamento para as variadas doenças. Porém sua função principal é de proteger as plantas dos patógenos (SOBRINHO *et al.*, 2011; SIMÕES, 2002; HUBINGER, 2009).

A quercetina é considerado o composto polifenólico mais abundante na subclasse dos flavonóis, encontrado em frutas, vegetais, plantas ou produtos relacionados a estes. Apresenta a propriedade de formar quelatos sendo um potente agente antioxidante, combatendo espécies reativas de oxigênio. Este composto tem sido extensivamente estudado quanto aos seus efeitos farmacológicos, tais como hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante, antiasmático e contra doenças

cardíacas (COMALADA *et al.*, 2005; INAL; KAHRAMAN, 2000; ROGÉRIO *et al.*, 2010).

Segundo Stringheta *et al.* (2006), o consumo de hortaliças como rúcula, couve, agrião, espinafre, acelga e brócolis auxilia consideravelmente na proteção do organismo contra doenças degenerativas devido à existência de antioxidantes. Dessa forma, obtendo o extrato a partir da rúcula pode proporcionar a maior concentração de flavonoides para possíveis aplicações terapêuticas, podendo-se conhecer melhor a qualidade do vegetal e suas atividades (FERNANDEZ *et al.*, 2005).

Atualmente, a agricultura de vegetais tem sofrido algumas alterações, e entre elas é um cultivo mais controlado, hidroponia. A hidroponia é uma técnica alternativa de cultivo em um ambiente acolhido, no qual o solo é trocado por uma solução nutritiva, onde estão incluídos todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (SEDIYAMA; PEDROSA, 2007). Entretanto, a escolha dos nutrientes deve ser preparada de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie (FURLANI *et al.*, 1999)

Diante dos fatos apresentados e ressaltando a importância e benefícios do consumo da rúcula, este trabalho teve como foco principal a quantificação de flavonóide presente na planta.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Propor uma metodologia para obter a maior quantidade de flavonoides do extrato vegetal a partir da rúcula *in natura*, cultivada de forma hidropônica

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extratos hidro-metanólico de rúcula a partir de diferentes métodos de extração;
- Quantificar os flavonoides totais em cada extrato, utilizando o padrão de quercetina para comparação;
- Comparar a composição e a quantificação dos extratos obtidos;

- Avaliar as propriedades microbiológicas e antioxidante dos extratos;
- Analisar estatisticamente os resultados pelos testes de ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ) para identificar a metodologia que forneça a maior quantidade de flavonoides.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais, um dos principais grupos de fontes naturais dentro da classe de produtos naturais, são utilizadas pela população como recurso terapêutico devido aos seus compostos biologicamente ativos (SIMÕES, 2002). Já no início do ano de 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou dados que cerca de 80% da população mundial manipulavam e utilizavam para combater algum problema de saúde, como pressão alta, gripe, tosse, entre outras doenças (CAFITO, 2009; OLIVEIRA, 2005).

Os produtos naturais podem ser utilizados como compostos para o equilíbrio de pragas e doenças (JESPERS; WAARD, 1993; ISMAN, 2000), além de muitos serem utilizados na alimentação humana com a finalidade de destacar o sabor e preservar os alimentos (SCHMIDT, 1994).

Os óleos essenciais ou os extratos de planta medicinais são utilizados como uma alternativa de controle de doenças nas plantas. (PINTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000). Estes extratos podem favorecer a saúde da planta expondo a atividade antimicrobiana direta sobre o agente patogênico (COMBRINCK *et al.*, 2011; FRANZENER *et al.*, 2003) ou também instigando mecanismos de defesa nas plantas tratadas, os mecanismos de defesa comum, podendo ser as enzimas peroxidases e polifenol oxidases, da qual a um aumento na atividade conduzido por agentes bióticos ou abióticos podendo levar ao acúmulo de compostos responsáveis pela defesa da planta (SILVA; AZEVEDO 2002; STANGARLIN *et al.*, 2008).

Os princípios ativos das plantas são substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico, entretanto a sua atividade está relacionada com a quantidade presente (MENDES *et al.*, 2005). Assim, a determinação desses princípios ativos é muito importante, pelo fato de que a quantidade de substâncias ativas presentes em uma determinada planta diferencia segundo às características climáticas, a que se expõe no seu local de cultivo (habitat, regime de chuvas, insolação, tipo de solo, sazonalidade, etc.), à idade da espécie, à época da colheita e às condições de estocagem. Por isso a avaliação e determinação desses princípios são tarefas imprescindíveis para a aquisição de produtos de boa qualidade (HUBINGER, 2009;

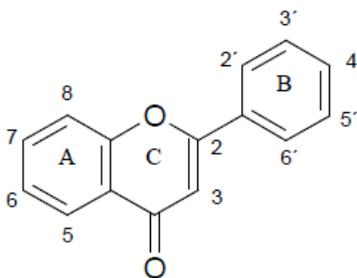
OLIVEIRA, 2005).

As plantas exibem diversas vias metabólicas que originam diferentes compostos, dentre os quais podem ser citadas os alcaloides, flavonoides, quinonas, taninos ou terpenos (COWAN, 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

### 2.1.1 FLAVONOIDES

Os flavonoides são considerados metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos. Podem ser encontrados em frutas, verduras, hortaliças, sementes e flores, tornando-se importantes componentes da dieta humana (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994). Flavonoides são compostos fenólicos que se diferenciam entre si pela sua estrutura química (FIGURA 1), manifestam 15 átomos de carbono na forma C6 – C3 – C6, apoiada no núcleo de dois anéis benzênicos, A e B, ligados a um anel pirano, C-1,2. Encontram-se nos alimentos de forma de O-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada na posição 3 e, em alguns casos, na posição 7 (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010).

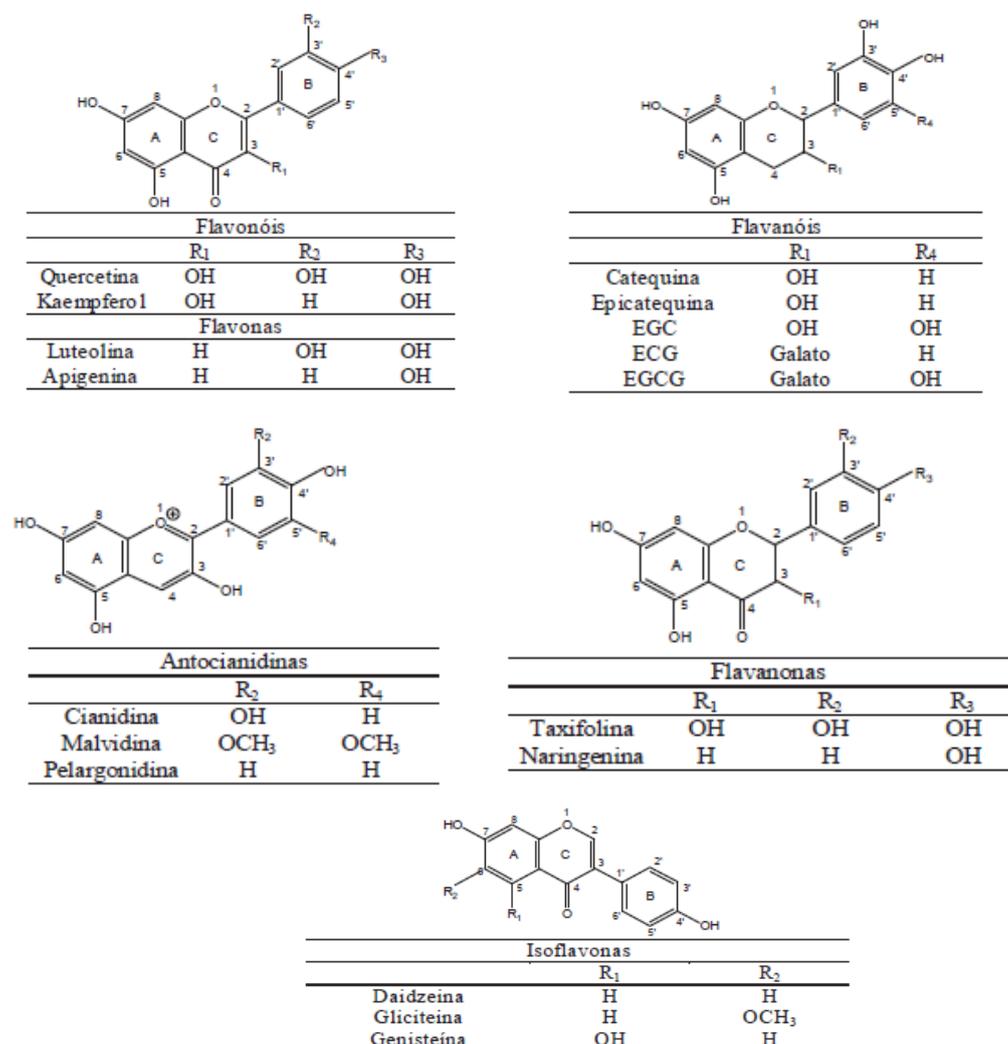
**FIGURA 1** Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: DORNAS *et al.*, 2007.

Mais de 8000 flavonoides diferentes já foram descritos e podem ser classificados de acordo com seus substituintes nos anéis (FIGURA 2) (HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008). As substâncias podem ser classificadas em: flavonois (miricetina, quercetina e kaempferol) e flavonas (apigenina e luteolina) (CROZIER *et al.*, 1997; HERTOOG; HOLLMAN; KATAN, 1992; HERTOOG; HOLLMAN; VENEMA, 1992; HERTOOG *et al.*, 1993; HERTOOG; HOLLMAN; PUTTE, 1993; VRIES *et al.*, 1997), destacando-se esses os mais distribuídos nos alimentos e por isso os mais estudados sobre compostos anticarcinogênico.

**FIGURA 2** Principais classes dos flavonoides



Fonte: HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008.

Segundo Winkell-Shirley (2001), as antocianidinas e os flavonoides operam nas plantas despertando interesses de polinizadores e disseminadores de sementes. Além disso eles atribuem na pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, os flavonoides têm notáveis funções de sinalização entre plantas e micróbios, de fertilidade em algumas espécies, de defesa como agentes antimicrobianos e de proteção à radiação ultravioleta.

As antocianinas são pigmentos fenólicos solúveis em água, que pertencem à classe dos flavonoides responsáveis pelas variações de cor, gradativamente entre laranja, vermelho e azul, visíveis nas frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes (BRAVO, 1998; ROBARDS *et al.*, 1999; MACHEIX; FLEURIT; BILLOT, 1990). Na

alimentação humana, podem substituir os pigmentos artificiais utilizados na produção de comida industrializada.

Já os flavonoides denominados isoflavonas pertencem à classe dos fitos estrógenos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal (SETCHELL, 1998). Em 1997, Brandi publicou um trabalho onde mostrava que há estudos que comprovam que as isoflavonas protegem contra várias doenças crônicas baseados em estudos experimentais e epidemiológicos, podendo também prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose.

Huber, Hoffmann-Ribani, Rodriguez-Amaya (2008) (TABELA 1) avaliaram as diversas fontes de flavonoides entre hortaliças consumidas no Brasil, de primeira analisaram 20 tipos de hortaliças e verificaram que as principais fontes de flavonoides são cebola, couve e rúcula com relevantes teores de quercetina, rúcula e couve, com elevado teores de kaempferol e salsa, com grande quantidade de apigenina. Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) também analisaram algumas hortaliças entre elas a alface, almeirão, cebola, laranja, pimentão, rúcula, maçã e tomate e encontraram os maiores teores de quercetina em cebola roxa, e cebola branca. Já o kaempferol foi encontrado somente em almeirão e rúcula.

**TABELA 1** Teores de flavonois e flavonas em alguns alimentos brasileiros: verduras, frutas e legumes (continuação)

| Hortaliças        | N | Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ parte comestível) |            |           |           | Ref   |
|-------------------|---|---|------------|-----------|-----------|---|
|                   |   | Quercetina  | Kaempferol | Apigenina | Luteolina |   |
| Alface Lisa       | 2 | 27  | Nd         | Nd        | 6         | (Arabbi, Genovese e Lajolo, 2004)               |
| Alface Crespa     | 2 | 195   | Nd         | Nd        | 2         |   |
| Alface Roxa       | 2 | 412   | Nd         | Nd        | 60        |   |
| Almeirão          | 2 | 144   | 74         | 23        | Nd-78     |   |
| Cebola Branca     | 2 | 519   | Nd         | Nd        | nd        |   |
| Cebola Branca     | 5 | 323   | Nd         | Nd        | nd        | (Huber, Hoffmann-Ribani, Rodriguez-Amaya, 2008) |
| Cebola Roxa       | 2 | 660   | Nd         | Nd        | nd        | (Arabbi, Genovese e Lajolo, 2004)               |
| Couve             | 5 | 399   | 399        | Nd        | nd        | Huber, Hoffmann-Ribani, Rodriguez-Amaya, 2008)  |
| Pimentão Amarelo  | 2 | 14  | Nd         | Nd        | 10        | (Arabbi, Genovese e Lajolo, 2004)               |
| Pimentão Verde    | 2 | 30  | Nd         | Nd        | 16        |   |
| Pimentão Vermelho | 2 | 8   | Nd         | Nd        | 6         |   |
| Rúcula (arugula)  | 2 | Nd-139  | 724        | Nd        | nd        |   |
| Tomate de Salada  | 1 | 5   | Nd         | Nd        | nd        |   |

N = número de lotes analisados individualmente; nd = não detectado.

Fonte: adaptado de Huber, Hoffmann-Ribani, Rodriguez-Amaya, 2008.

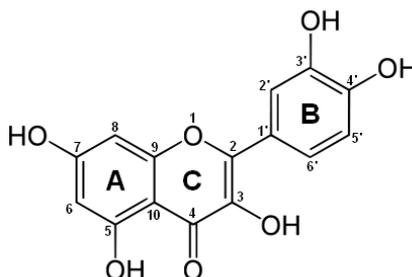
Crozier *et al.* (1997) avaliaram os flavonoides presentes em tomate, cebola, alface da Inglaterra, e os maiores teores de quercetina foram encontrados em cebola branca ( $185 - 634 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e cebola roxa ( $201 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Já o alface “Lollo Rosso” e os tomates apresentaram teores entre 2 e  $203 \mu\text{g g}^{-1}$ . Franke *et al.* (2004) avaliaram hortaliças do Hawaii, e observaram que as concentrações de quercetina nestes alimentos foram bastante variadas, sendo que os maiores teores foram relatados em cebola ( $238 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Já Hertog, Hollman e Katan (1992) avaliaram em hortaliças holandesas, e os maiores teores de quercetina foram encontrados em cebola ( $284 - 486 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e couve ( $110 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Esses estudos demonstram a importância e a contribuição na saúde humana que esses vegetais podem contribuir.

#### 2.1.1.1 QUERCETINA

A quercetina (3',4',3,5,7-pentahidroxi-flavonol) (FIGURA 3) é classificado como um flavonol, e considerado como um dos flavonoides mais abundantes na natureza (WACH; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2007).

**FIGURA 3** Estrutura da quercetina.



Fonte: WACH; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2007.

A organização da quercetina nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com o vegetal, e da variação das espécies. Normalmente os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes dos presentes nas flores, galhos, raízes e frutos. Podem ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontram.

Os poucos estudos feitos em algas, alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo apenas um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variabilidade estrutural é pequena.

Portanto são encontrados em grande quantidade nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

A quercetina ocorre principalmente na forma aglicona, mas também pode ser encontrado como glicosídeo, tendo um ou mais grupos de açúcares na posição C3. Diferentes glicosídeos de quercetina já foram descritos, sendo a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) um dos mais comuns encontrados na natureza (WACH; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2007). Ela é encontrada em alguns frutos e legumes, principalmente nas folhas, nas quais está associada a diversos efeitos farmacológicos. Ela também pode ajudar a combater a asma, o câncer e doenças cardíacas. Como antioxidante, combate as moléculas radicais livres que desempenham um papel importante em muitas doenças (LU *et al.*, 2006).

Segundo YAO *et al.* (2007), a quercetina possui efeitos hepato e gastroprotetor contra danos celulares induzidos pelo etanol, protegendo hepatócitos humanos do dano oxidativo ao servir como um antioxidante natural e aumentando a capacidade antioxidante do plasma. No entanto, os precisos mecanismos farmacológicos protetores da quercetina sobre a lesão oxidativa induzida nos hepatócitos estão longe de serem completamente compreendidos.

A quercetina tem corroborado a um efeito anti-inflamatório por inibição de COX- 2 e de óxido nítrico sintase. A luteolina e a quercetina também podem reduzir a ativação do sistema complemento, o que diminui a adesão de células inflamatórias no endotélio, reduzindo a resposta inflamatória (MACHADO *et al.*, 2008).

A poder da quercetina pode ir além do seu potencial antioxidante, portanto possui múltiplos efeitos biológicos, sendo eles a modulação de enzimas envolvidas na transdução de sinais, o crescimento celular e a biotransformação, motivos pelas quais pode servir como material de partida para os programas de desenvolvimento de drogas farmacêuticas (FORMICA; REGELSON, 1995).

## 2.2 RÚCULA

A rúcula (FIGURA 4) é considerada uma hortaliça anual que pertence à família *Brassicaceae*, considerada de porte baixo, possui normalmente altura de 15 a 20 cm, folhas verdes e recortadas, tendo como centro de origem e de domesticação do gênero *Eruca*, o mediterrâneo e oeste da Ásia (SILVA, 2004).

**FIGURA 4** *Eruca sativa* (rúcula)

Fonte: a autora, 2019.

Segundo Trani, Fornasier e Lisbão (1992), para ter um bom desenvolvimento da planta e para a obtenção de folhas grandes e tenras, são necessárias temperaturas entre 15 a 18 °C, sendo março a julho (outono/inverno) a melhor época de plantio. Os autores ainda relatam que, quando ocorrem temperaturas altas, a produção se prejudica, as folhas acabam ficando menores e lignificadas, tornando-se inadequadas para a comercialização. Porém Filgueira (2008) descreve que, ainda que a rúcula produz melhor sob temperaturas agradáveis, ela tem sido cultivada durante o ano todo em diversas regiões brasileiras.

A colheita da rúcula é feita de 30 a 40 dias após o plantio. Posteriormente a esse período as folhas começam a ficar fibrosas e inadequadas para o consumo, visto que a planta começa e entra no estágio reprodutivo, termina aproximadamente entre os 110 e 130 dias após o plantio, quando tem início a colheita das sementes, com duração de cerca de 25 dias (TRANI; FORNASIER; LISBÃO, 1992; MINAMI; TESSARIOLI NETO, 1998).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 HORTALIÇA

A hortaliça utilizada no trabalho foi a rúcula, *Eruca sativa*, cultivada em sistema hidropônico, com controle de umidade, temperatura e vitaminas para o seu desenvolvimento. Foi doada por um produtor da cidade de Nova Santa Rosa - Pr.

Após a obtenção das hortaliças, as mesmas foram encaminhadas ao laboratório da UTFPR/Câmpus Toledo, no qual foram cortadas manualmente, pesadas em erlenmeyer e encaminhadas para os métodos de extração ou acondicionadas em geladeira.

A umidade da rúcula era medida utilizando-se uma balança de determinação de umidade com infravermelho (Bel I-thermo 163I), sempre que era obtida nova remessa. No qual foi pesado 1 g de folhas da hortaliça em um pratinho específico do equipamento e, então, esperando por volta de 2 minutos até a indicação da porcentagem da umidade da rúcula, realizado em triplicatas.

#### 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE RÚCULA

Para a escolha do solvente foi realizado leituras de diversas pesquisas de extração, podendo então perceber que a utilização de metanol foi mais eficaz de componente fenólicos totais em todas elas e por isso a escolha do solvente para a pesquisa foi utilizado o artigo como base do Machado *et al.* (2010). O trabalho do Vieira *et al.* (2009) também mostrou que obteve os resultados semelhantes, quando testada a relação entre aos solventes metanol e água, em relação à extração dos compostos fenólicos do pó de erva-mate.

No começo da pesquisa foram realizados testes de extração da rúcula, variando-se o tempo em 6, 12 e 24 h nas concentrações de 00%, 50% e 80% v/v de metanol P.A. em água. A agitação foi realizada utilizando-se a incubadora *Shaker* (Lucca 222), com o qual pode-se também variar a temperatura do processo, 25 °C e 40 °C.

Para a concentração de todos os extratos obtidos, inicialmente, filtraram-se as amostras a vácuo, utilizando papel de filtro qualitativo, e, em seguida, armazenados em frasco âmbar de capacidade de 150 mL. Após a filtração os

extratos, foram encaminhados ao evaporador rotativo para a retirada dos solventes, com aquecimento inferior a 40 °C e com rotação de 7 rpm. Após foram devolvidos aos frascos e acondicionados em geladeira até os próximos ensaios.

### 3.2.1 Extração com incubadora *Shaker* utilizando somente as folhas da rúcula *in natura*

Foram utilizados 5 g de folhas de rúcula *in natura* cortadas manualmente, os quais foram colocadas em diferentes soluções em triplicatas hidro-metanólicas (0, 50 e 80 % de MeOH em água) com volume final de 100 mL e agitadas por 6, 12 e 24 h, em incubadora *Shaker* (Lucca 222), mantendo a agitação de 170 rpm e a temperatura controlada de 25 °C (TABELA 2).

**TABELA 2** Planejamento dos testes utilizando a folha da rúcula para a obtenção dos extratos de rúcula por *Shaker*

| % de MeOH em solução | Tempo de Agitação (h) | Código   |
|----------------------|-----------------------|----------|
| 0                    | 6                     | ME.0.6   |
|                      | 12                    | ME.0.12  |
|                      | 24                    | ME.0.24  |
| 50                   | 6                     | ME.50.6  |
|                      | 12                    | ME.50.12 |
|                      | 24                    | ME.50.24 |
| 80                   | 6                     | ME.80.6  |
|                      | 12                    | ME.80.12 |
|                      | 24                    | ME.80.24 |

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo sob temperatura inferior a 40°C, aferindo o volume final para 50 mL (metodologia adaptada ARBOS *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Extração com incubadora *Shaker* utilizando o caule e as folhas da rúcula *in natura*

Para esse teste, foram cortadas as folhas e caules manualmente e então foram pesados 5 g da mistura de caule e folha de rúcula *in natura*. Foram colocadas em diferentes soluções em triplicatas hidro-metanólicas (0, 50 e 80 % de MeOH em água) com volume final de 100 mL e agitadas por 6, 12 e 24 h, em incubadora

Shaker (Lucca 222), mantendo a agitação de 170 rpm e a temperatura controlada de 25 °C (TABELA 3).

**TABELA 3** Planejamento dos testes utilizando as folhas e o caule da rúcula para a obtenção dos extratos de rúcula por *Shaker*

| % de MeOH em solução | Tempo de Agitação (h) | Código   |
|----------------------|-----------------------|----------|
| 0                    | 6                     | CF.0.6   |
|                      | 12                    | CF.0.12  |
|                      | 24                    | CF.0.24  |
| 50                   | 6                     | CF.50.6  |
|                      | 12                    | CF.50.12 |
|                      | 24                    | CF.50.24 |
| 80                   | 6                     | CF.80.6  |
|                      | 12                    | CF.80.12 |
|                      | 24                    | CF.80.24 |

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo sob temperatura inferior a 40°C, aferindo o volume final para 50 mL (metodologia adaptada ARBOS *et al.*, 2010).

### 3.2.3 Extração em repouso com agitação manual ocasional utilizando somente as folhas da rúcula *in natura*

Para a realização desse teste, foram pesados 5g da folha da rúcula em um erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados 100 mL de solução do solvente metanol em água e foram mantidos sobre a bancada para ocasional agitação manual. A temperatura foi mantida por cerca de 23°C, que era a temperatura ambiente do laboratório nos dias da extração. Seguiram-se as mesmas condições já citadas na Tabela 2.

### 3.2.4 Extração por ultrassom utilizando somente as folhas da rúcula *in natura*

O ultrassom é um processo no qual utiliza uma energia de ondas sonoras que são transmitidas com frequência de até 40 quilohertz (KHz). Essas ondas produzem uma única vibração no qual causa uma variação na pressão do líquido extrator gerando assim cavitações no material vegetal em questão (LUZ, 1998).

A técnica por ultrassom exibe várias vantagens, tal como a alta reprodutibilidade, a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra, e a rapidez no processamento e também o baixo custo (SIMÕES *et al.*, 2010). Porém o banho utilizado no procedimento libera calor que pode interferir em processos metabólicos e na degradação de substâncias presentes no material vegetal.

Para esse método foram utilizados 5 g de folhas da hortaliça rúcula *in natura* cortadas e colocadas em 100 mL de solução hidro-metanólica, variando-se a concentração do metanol, entre 0; 50 e 80%. Os experimentos foram realizados utilizando o tempo de 6 minutos em temperatura ambiente do laboratório.

### 3.2.5 Extração com incubadora *Shaker* utilizando somente as folhas da rúcula *in natura* cultivadas em períodos diferentes

Para os novos testes foram utilizados 5 g da rúcula *in natura* cortada, em diferentes tempos de cultivo (7, 14, 21 e 24 dias de cultivo e/ou armazenamento) foram colocadas em 80% de MeOH em triplicatas hidro-metanólicas com volume final de 100 mL. As misturas foram agitadas por 12, 24, 36 e 48h, em incubadora *Shaker* (Lucca 222), mantendo a agitação de 170 rpm e a temperatura controlada, variando-se a temperatura de extração (25 °C e 55 °C) (TABELA 4).

**TABELA 4:** Planejamento experimental para obtenção dos extratos de rúcula com diferentes tempos de cultivo. (continua)

| % MeOH em solução | Planta           | Dias de cultivo | Tempo de Agitação (h) | Temperatura (°C) | Código                     |
|-------------------|------------------|-----------------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| 80%               | <i>In natura</i> | 7               | 12                    | 25               | A-1-12<br>A-2-12<br>A-3-12 |
|                   |                  |                 | 24                    |                  | A-1-24<br>A-2-24<br>A-3-24 |
|                   |                  |                 | 36                    |                  | A-1-36<br>A-2-36<br>A-3-36 |
|                   |                  |                 | 48                    |                  | A-1-48<br>A-2-48<br>A-3-48 |
| 80%               | <i>In natura</i> | 7               | 12                    | 55               | B-1-12<br>B-2-12<br>B-3-12 |
|                   |                  |                 | 24                    |                  | B-1-24<br>B-2-24<br>B-3-24 |

|     |                  |    |    |    |                            |
|-----|------------------|----|----|----|----------------------------|
|     |                  |    | 36 |    | B-1-36<br>B-2-36<br>B-3-36 |
|     |                  |    | 48 |    | B-1-48<br>B-2-48<br>B-3-48 |
| 80% | <i>In natura</i> | 14 | 12 | 25 | C-1-12<br>C-2-12<br>C-3-12 |
|     |                  |    | 24 |    | C-1-24<br>C-2-24<br>C-3-24 |
|     |                  |    | 36 |    | C-1-36<br>C-2-36<br>C-3-36 |
|     |                  |    | 48 |    | C-1-48<br>C-2-48<br>C-3-48 |
| 80% | <i>In natura</i> | 14 | 12 | 55 | D-1-12<br>D-2-12<br>D-3-12 |
|     |                  |    | 24 |    | D-1-24<br>D-2-24<br>D-3-24 |
|     |                  |    | 36 |    | D-1-36<br>D-2-36<br>D-3-36 |
|     |                  |    | 48 |    | D-1-48<br>D-2-48<br>D-3-48 |
| 80% | <i>In natura</i> | 21 | 12 | 25 | E-1-12<br>E-2-12<br>E-3-12 |
|     |                  |    | 24 |    | E-1-24<br>E-2-24<br>E-3-24 |
|     |                  |    | 36 |    | E-1-36<br>E-2-36<br>E-3-36 |
|     |                  |    | 48 |    | E-1-48<br>E-2-48<br>E-3-48 |
| 80% | <i>In natura</i> | 21 | 12 | 55 | F-1-12<br>F-2-12<br>F-3-12 |
|     |                  |    | 24 |    | F-1-24<br>F-2-24<br>F-3-24 |
|     |                  |    | 36 |    | F-1-36<br>F-2-36<br>F-3-36 |
|     |                  |    | 48 |    | F-1-48<br>F-2-48<br>F-3-48 |
| 80% | Geladeira        | 24 | 12 | 25 | G-1-12<br>G-2-12           |
| 80% | Geladeira        | 24 | 12 | 55 | H-1-12<br>H-2-12<br>H-3-12 |

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIS TOTAIS

Para identificação e quantificação de flavonois totais foi utilizada a metodologia descrita no trabalho de Granato e Nunes (2016) adaptada, no qual foram inseridos 1,2 mL de extratos em um tubo de ensaio, acrescentado com 1,2 mL de cloreto de alumínio hexaidratado 2% e 1,8 mL de acetato de sódio ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ).

Após 15 min, foi realizada a leitura do máximo de absorção da solução em 440 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro UV-Vis (Kasuki, modelo IL-0082 100). Para o branco foram utilizados todos os solventes, exceto o extrato, no mesmo procedimento.

Para a preparação da solução estoque foi diluído 0,0021 g de padrão de quercetina em 5 mL de etanol absoluto em um balão volumétrico com capacidade de 25 mL, volume completado com água destilada/deionizada, obtendo uma solução com concentração de  $80 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir dessa solução foram realizadas diluições seriadas para então obter 8 concentrações diferentes. Para a obtenção da curva padrão de quercetina foi empregado o protocolo descrito na Tabela 5.

**TABELA 5:** Preparo da curva padrão de quercetina

| H <sub>2</sub> O (mL) | Solução mãe (mL) | Concentração de quercetina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) |
|-----------------------|------------------|---|
| 1                     | 7                | 70  |
| 2                     | 6                | 60  |
| 3                     | 5                | 50  |
| 4                     | 4                | 40  |
| 5                     | 3                | 30  |
| 6                     | 2                | 20  |
| 7                     | 1                | 10  |
| 8                     | 0                | 0   |

A partir da curva analítica fez-se a equação de regressão, que empregou para estimar o teor de flavonois totais nas amostras.

### 3.4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE FLAVONOIDES POR HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica físico-química de separação um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, fundamentado no equilíbrio de componentes de interesse, em meio de duas fases imiscíveis a fase estacionária e a fase móvel. Os dois influenciam nas interações analíticas e no tempo de retenção dos analitos. (ROUSSEAC; ROUSSEAC, 2007).

Foi utilizada a metodologia adaptada de Huber, Hoffmann-Ribani e Rodriguez-Amaya (2008), no qual foram feitas as diluições necessárias utilizando 0,025g do padrão de quercetina para 25 mL de MeOH em grau HPLC. Em seguida, a solução final foi diluída em 500 µL para 20 mL de MeOH em grau HPLC e 5 mL de H<sub>2</sub>O milique completando um volume final de 25 mL.

As fases móveis foram preparadas, utilizando um balão de 500 mL, contendo 1,5 mL ácido fórmico completado o final com MeOH em grau HPLC, e também foram utilizado um balão de 500 mL, contendo também 1,5 mL de ácido fórmico completado o final com H<sub>2</sub>O mílique. Logo após foi utilizado um sistema de filtração com vidros, utilizando um filtro de celulose 0,45mm (GV5-Brasil) para a filtragem da solução contendo H<sub>2</sub>O, e para a solução de MeOH foram utilizado o filtro FHLC (milipore). As soluções foram estocadas em vidros apropriados para a leitura no HPLC, antes disso foram encaminhados para a lavadora ultra-sônica digital (Sanders-medical) com ajuda da bomba de vácuo (Prismatec 122-BCP) para degaseificar as soluções. E então encaminhar para o HPLC.

Já amostra foi utilizada pura e filtrada com filtro de celulose de 0,45 m (GVS-Brasil) e injetado no HPLC, numa coluna de 250 x 4,6 mm (TABELAS 6 e 7).

**TABELA 4** Gradiente para o padrão de quercetina na análise por HPLC

| Tempo | %MeOH | %H <sub>2</sub> O | Fluxo      |
|-------|-------|-------------------|------------|
| 0     | 20    | 80                | 1,2mL/min. |
| 8     | 45    | 65                | 1,2mL/min. |
| 28    | 48    | 52                | 1,2mL/min. |
| 33    | 20    | 80                | 1,2mL/min. |
| 45    | 20    | 80                | 1,2mL/min. |

**TABELA 5** Gradiente para as amostras na análise por HPLC

| Tempo | %MeOH | %H <sub>2</sub> O | Fluxo      |
|-------|-------|-------------------|------------|
| 0     | 20    | 80                | 1,2mL/min. |
| 8     | 45    | 55                | 1,2mL/min. |
| 28    | 48    | 52                | 1,2mL/min. |
| 35    | 95    | 5                 | 1,2mL/min. |
| 45    | 95    | 5                 | 1,2mL/min. |
| 50    | 20    | 80                | 1,2mL/min. |
| 60    | 20    | 80                | 1,2mL/min. |

### 3.5 ANÁLISE E PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO DE OBTENÇÃO DA MAIOR QUANTIDADE DE FLAVONÓIDES A PARTIR DA RÚCULA *IN NATURA*

Para definir quais dados, em que quantidade e em que condições devem ser coletados durante um determinado experimento foi realizado um planejamento experimental no qual optou-se por um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, ou seja, consideraram-se três fatores de impacto (temperatura, tempo de agitação e tempo de cultivo da planta) e dois níveis para cada fator, com três repetições para cada experimento (TABELA 8).

**TABELA 8:** Níveis para cada fator avaliado

| FATOR                  | NÍVEL 1 (-1) | NÍVEL 2 (+1) |
|------------------------|--------------|--------------|
| Temperatura (°C)       | 35           | 55           |
| Tempo de agitação (h)  | 12           | 48           |
| Tempo de planta (dias) | 7            | 21           |

Para avaliar os resultados utilizou o *software* STATISTICA, versão 10, da Statsoft.

O planejamento saturado aplicado permite observar quais são os fatores/variáveis que impactam diretamente na variável resposta de interesse, nesse caso, quantidade de flavonoides no extrato da planta, além de permitir verificar quais são os níveis onde é possível obter a maior quantidade de flavonoides, através de gráficos de superfície de resposta.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *Bacillus subtilis* E ANTIFÚGICA *Trichoderma* dos extratos metanólicos de rúcula

Uma planta julgada como medicinal é quando apresenta na sua composição princípios ativos, de forma de que o preparo e a administração são decisivos para ação terapêutica ou tóxica dessa planta (MUÑOZ, 2002). Plantas medicinais são capazes de apresentar na sua composição um alto número de metabólitos secundários com atividade biológica que têm importante papel de defesa, e também em auxiliar no aumento da capacidade de sobrevivência e da adaptação das plantas ao ambiente (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

O meio de cultura utilizado para os dois testes foi ágar BD (Batata-Dextrose), considerado um meio simples e capaz de promover o crescimento de diversos tipos de micro-organismos. Utilizando uma placa de petri de 100 mm de diâmetro, foram pesados 3,6 g de meio, completando o volume final com 100 mL com água. Realizaram-se todas as inoculações em duplicata, bem como o grupo controle negativo (PINTO; KANERO; OHARA, 2003).

Após a preparação da solução, o meio foi levado ao micro-ondas para aquecer por aproximadamente 1 min, até que o ágar dilua na água. Feito isso, o meio foi esterilizado, em meia rosca a 121,1°C por 15 min.

A inoculação foi feita por espalhamento em placa. Foram utilizadas 1000 µL de *B. subtilis* com o auxílio de uma alça de Drigalski o inoculo é espalhado pela placa, até secar. Já a inoculação do *Trichoderma* foi utilizada uma pinça e foi tirado uma alçada do inóculo e inoculado uma pequena porção no meio da placa. Antes de colocar a alça em contato com o meio a mesma foi imersa em álcool 70% e flambada no bico de Bunsen. Todo o experimento foi realizado próximo ao Bico de Bunsen mantendo a esterilidade do ambiente.

Para esse experimento foi utilizado o extrato “puro”, ou seja, não foi diluído com nada.

Foi utilizado o teste de difusão em disco/placa no qual consiste basicamente em dispor discos de papel-filtro, impregnados com a solução em concentrações fixas, sobre a placa de Agar. Para uma placa de 100 mm recomenda-se a disposição de discos de 6 mm de diâmetro com 10 µL de solução, para obter maior confiabilidade dos resultados. A placa foi dividida em 4 partes, onde foi separado os tempos, de 12, 24 e 36 horas. Após a adição dos discos de papel-filtro nas placas,

foram armazenadas em estuda a 30-37°C de 18-24h.

A avaliação do teste de difusão em placa é uma análise qualitativa, desta forma, apenas indica se há ou não a inibição de microbianos.

- - Sensíveis: quando halo é maior ou igual a 3 mm;
- - Moderadamente sensíveis: halo maior que 2 mm e menor que 3 mm;
- - Resistentes: halo menor ou igual a 2 mm.

E para a Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi utilizada a metodologia de Nguetack, Budde e Jakobsen. (2004), na qual a CMI pode ser expressada em unidades arbitrárias por mL (AU mL<sup>-1</sup>) (EQUAÇÃO 1).

$$\text{CMI (AU mL}^{-1}\text{)} = \text{DM} \times \text{FD} \times 50 \quad (1)$$

Sendo:

DM = diâmetro médio do halo de diluição;

FD= fator de diluição da solução antimicrobiana (EQUAÇÃO 2)

$$\text{FD} = \frac{\text{volume final de solução antimic.}}{\text{volume da solução antimic.utilizado para o prearo da solução}} = \frac{25 \text{ mL}}{1,5 \text{ uL} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \times 10^{-3} \text{ uL}}} = (2)$$

$$\text{FD} = 16666,7$$

### 3.7 ANÁLISE ANTIOXIDANTE

Segundo Chun *et al.* (2005), os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, já que eles têm a capacidade de proteger um organismo dos danos causados. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química.

Essas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias.

### 3.7.1 Método por DPPH

Nesse teste foi utilizada a metodologia modificada de Sousa *et al.* (2007), no qual teve como objetivo avaliar o consumo de DPPH pelo decréscimo de absorvâncias de diferentes concentrações. A leitura então foi realizada em um espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 515nm.

Foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 ug mL<sup>-1</sup>. A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições seriadas (TABELA 9), e todos completados com o volume final de 5 mL de metanol em um balão volumétrico.

**TABELA 9:** Construção da curva padrão de DPPH

| Concentração ug/mL | Solução estoque mL |
|--------------------|--------------------|
| 35                 | 4,375              |
| 30                 | 3,75               |
| 25                 | 3,125              |
| 20                 | 2,5                |
| 15                 | 1,87               |
| 10                 | 1,25               |
| 5                  | 0,625              |
| 1                  | 0,125              |

A curva analítica foi construída a partir da solução estoque e das diluições. Para a determinação da concentração, foi utilizada uma cubeta de vidro com o percurso óptico de 1 cm, utilizando o metanol como o branco. Foram medidas em triplicatas com o intervalo de 1 min.

Para a medida de absorvâncias das amostras utilizaram-se 0,3 mL do extrato da amostra com 2,7 mL de DPPH na concentração de 40 ug mL<sup>-1</sup>. A leitura foi realizada a 515 nm, e lida no 1°, 5° e 10° min e depois a cada 10 min, até completar 1 hora.

Como branco, utilizou-se 2,7 mL de metanol e 0,3 mL de metanol também sendo o constituinte majoritário da minha amostra. E como controle utilizou 2,7 mL de DPPH (40 ug mL<sup>-1</sup>) e 0,3 mL de metanol. As análises foram realizadas em triplicatas.

A partir da equação da curva analítica e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH<sub>REM</sub>) (EQUAÇÃO 3).

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{t=t} / [DPPH]_{t=0} \times 100 \quad (3)$$

em que

$[DPPH]_{t=t}$  corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com as misturas reacionais  
 $[DPPH]_{t=0}$  é a concentração inicial de DPPH (40 ug/mL).

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 minutos, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) (EQUAÇÃO 4).

$$\%AA = \{ [Abs_{controle} (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle} \quad (4)$$

em que

$Abs_{controle}$  é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH

$Abs_{amostra}$  é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra).

Para determinação da  $CI_{50}$  (concentração de 50% de inibição), isto é, a abscissa as concentrações das amostras ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou do controle positivo e, na quantidade de antioxidante necessária para inibir concentração inicial de DPPH em 50%, construiu-se uma curva exponencial de primeira ordem, plotando-se na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente.

### 3.7.2 Método por peróxido de hidrogênio

Foi utilizada a metodologia adaptada Miranda (2010), na qual foi realizada a preparação da solução tampão de 1000 mL no qual dilui 20,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em água deionizada e depois, diluir 3,08 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , nesta primeira solução. Ao medir esta solução em um pHmetro, deve estar com o pH na faixa de 7,3. Feito isso, adicionou-se esta solução, depois de bem solubilizada, em um balão volumétrico de 1000 mL e completou com água deionizada.

Para a preparação da solução tampão com o peróxido de hidrogênio foi realizado cálculos para obtenção do volume necessário de peróxido de hidrogênio que será adicionado em 500 mL da solução tampão preparada. Para isso, deve-se saber quanto de peróxido deve ser utilizado para uma concentração de 0,01 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 500 mL. No entanto foi preparada uma solução de apenas 50 mL,

convertendo-se massa (g) para volume (mL) utilizando densidade  $1,11 \text{ g mL}^{-1}$  quando peróxido 35 volumes.

Para a leitura no espectrofotômetro foi preparado três tubos de ensaio (os três tubos correspondem a realização do experimento em triplicata):

- - Um tubo com 500  $\mu\text{L}$  da amostra, mais 4,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão;
- - Um tubo de ensaio para avaliação do branco com 500  $\mu\text{L}$  da amostra mais solução tampão sem o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- - Um tubo de ensaio para avaliação controle com 500  $\mu\text{L}$  de água mais 4,5 mL de solução tampão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Após a preparação dos tubos de ensaio, foram incubados a  $35^\circ\text{C}$  por 30 minutos e então medido a absorbância no espectrofotômetro a 230 nm de cada mistura e feito o cálculo de porcentagem do sequestro de peróxido de hidrogênio a partir da equação abaixo, caso a absorbância ultrapassasse 0,8 a solução deveria ser diluída e o fator de diluição deve multiplicar a nova absorbância medida (EQUAÇÃO 5).

$$\% \textit{sequestro} = \frac{(\textit{Abscontrole} - (\textit{Absamostra} - \textit{Absbranco}))}{\textit{Abscontrole}} \quad (5)$$

O resultado expresso indica a porcentagem de sequestro de peróxido de hidrogênio, isso é, caso dê 50% de sequestro indica que a solução apresenta capacidade de sequestrar 50% de peróxido de hidrogênio, que atua como radical livre, logo, quanto maior a % de sequestro maior a atividade antioxidante da solução em estudo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rúcula da espécie *Eruca sativa* utilizada nesse trabalho foi produzida de forma hidropônica, o que tem a vantagem de se poder controlar os nutrientes e as condições de cultivo para a planta na região oeste do Paraná.

A umidade do vegetal, em todas as vezes que foi recebido, era determinada pela balança de infravermelho e apresentava valor em torno de 92%.

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES NO EXTRATO DE RÚCULA *IN NATURA* PELA METODOLOGIA UV-VIS

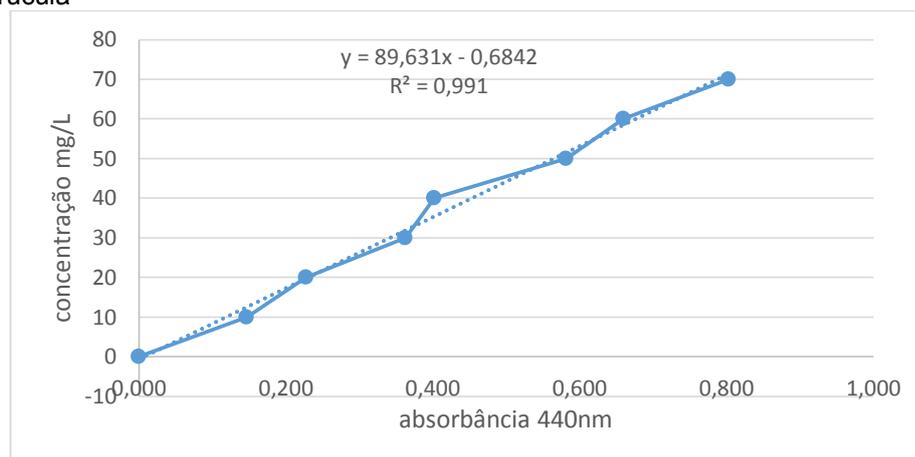
Para a quantificação de flavonóide nos extratos da rúcula foi utilizada a metodologia de determinação da absorção da banda em 440 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis.

A curva padrão de determinação de flavonoides foi determinada utilizando os valores de absorbância obtidos na análise espectrofotométrica das soluções com o padrão quercetina (TABELA 10 e FIGURA 5).

**TABELA 6** Absorbância das soluções de quercetina

| Concentração de quercetina<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Absorbância<br>a 440 nm |
|---|-------------------------|
| 70  | 0,803                   |
| 60  | 0,660                   |
| 50  | 0,582                   |
| 40  | 0,402                   |
| 30  | 0,363                   |
| 20  | 0,228                   |
| 10  | 0,147                   |
| 0   | 0,000                   |

**FIGURA 5** Curva padrão para a determinação de flavonoides presente nos extratos da rúcula



#### 4.1.1 Quantificação de flavonoides variando-se concentração do solvente, tempo e temperatura de obtenção do extrato de rúcula *in natura*

Os resultados para os testes preliminares foram responsáveis para determinar as condições de obtenção do extrato da rúcula que fornecesse maior quantidade de flavonoides.

##### 4.1.1.1 Obtenção do extrato da folha de rúcula pela metodologia *Shaker*

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos dos valores de absorvância em 440 nm do espectro de UV-Vis observados (utilizando padrão de quercetina) para cada condição de obtenção do extrato (concentração de solvente e tempo de agitação) pelo método de extração por *Shaker*. Foram utilizados somente 5 g da folha da planta em 100 mL de solução de solvente a 25 °C. O solvente escolhido foi o metanol, tendo sua concentração de 0, 50 e 80% em solução aquosa, e os tempos de agitação testados foram 6, 12 e 24 h.

**TABELA 7** Valor da absorbância de cada extração das folhas de rúcula, utilizando *Shaker*.

| Tempo | MeOH 0% | MeOH 50% | MeOH 80% | Média | Desvio Padrão |
|-------|---------|----------|----------|-------|---------------|
| 6h    | 0,188   | 0,298    | 0,713    | 0,298 | 0,226         |
| 12h   | 0,082   | 0,338    | 0,518    | 0,338 | 0,179         |
| 24h   | 0,511   | 0,299    | 0,430    | 0,430 | 0,087         |

De acordo com a Lei de Beer-Lambert, a absorvância de um composto é diretamente proporcional à sua concentração (PAIVA et al, 2010), o que indica nesses resultados, que a condição de extração com 80% de MeOH em 6 h utilizando *Shaker* foi a que apresentou a maior concentração de flavonóides.

#### 4.1.1.2 Obtenção do extrato do caule e das folhas de rúcula pela metodologia *Shaker*

O procedimento de obtenção do extrato utilizando caule e folha da rúcula iniciou variando-se a concentração do solvente (metanol 0, 50 e 80% em água) e o tempo de agitação (6, 12 e 24 h) utilizando o *Shaker* com temperatura controlada a 25 °C. A concentração de flavonóide foi medida pela absorvância em 400 nm no UV-Vis para cada extrato, utilizando a quercetina como padrão (TABELA 12).

**TABELA 8** Valor da absorvância de cada extração do caule e das folhas da rúcula, utilizando *Shaker*

| Tempo | MeOH 0% | MeOH 50% | MeOH 80% | Média | Desvio Padrão |
|-------|---------|----------|----------|-------|---------------|
| 6h    | 0,352   | 0,389    | 0,801    | 0,389 | 0,249         |
| 12h   | 0,425   | 0,452    | 0,787    | 0,452 | 0,202         |
| 24h   | 0,429   | 0,477    | 0,462    | 0,462 | 0,025         |

Analisando os valores obtidos (Tabela 12) e sabendo que a absorvância de um composto é diretamente proporcional à sua concentração, pode-se observar que a melhor condição de extração para obter maior quantidade de flavonoides no extrato foi com 80% de MeOH por 6 h de agitação.

Ao comparar os valores obtidos nas Tabelas 11 e 12, pode-se observar que ao obter o extrato da rúcula utilizando caule e folha obteve-se uma concentração maior de flavonóide. Esse caso pode ser considerado que o uso do caule na extração contribuiu com o aumento da concentração.

#### 4.1.1.3 Obtenção do extrato de rúcula com agitação manual ocasional

O mesmo processo foi realizado para obtenção do extrato utilizando a rúcula, variando-se a concentração do solvente (metanol 0, 50 e 80% em água) e o tempo de agitação (6, 12 e 24 h), só que o fraco tampado foi deixando em repouso

sobre a bancada com agitação manual ocasionalmente. A concentração de flavonóide também foi medida pela absorvância em 400 nm no UV-Vis para cada extrato, utilizando a quercetina como padrão (TABELA 13).

**TABELA 9** Valor da absorvância da extração utilizando a extração com agitação ocasional

| Tempo | MeOH 0% | MeOH 50% | MeOH 80% | Média | Desvio Padrão |
|-------|---------|----------|----------|-------|---------------|
| 6h    | 0,074   | 0,298    | 0,672    | 0,298 | 0,302         |
| 12h   | 0,086   | 0,26     | 0,669    | 0,26  | 0,299         |
| 24h   | 0,432   | 0,316    | 0,94     | 0,432 | 0,332         |

A Tabela 13 apresenta os resultados das absorvâncias obtidas dos extratos em repouso, indicando que o tempo para obter maior quantidade de flavonoides foi de 24 h de contato da rúcula com o solvente. E, novamente, observa-se que a melhor solução de MeOH é de 80% em água.

#### 4.1.1.4 Obtenção do extrato de rúcula com ultrassom

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos pelo método de extração por ultrassom da rúcula, variando apenas a concentração de MeOH (0, 50 e 80% em água), mantendo-se o tempo total de 6 min para cada processo. Os resultados foram expressos em valor de absorvância de luz ultra-violeta a 440 nm, utilizando a quercetina como padrão.

**TABELA 10** Valor da absorvância da extração utilizando ultrassom

| Tempo | MeOH 0% | MeOH 50% | MeOH 80% | Média | Desvio Padrão |
|-------|---------|----------|----------|-------|---------------|
| 6 min | 0,025   | 0,03     | 0,028    | 0,028 | 0,003         |
| 6 min | 0,039   | 0,042    | 0,04     | 0,04  | 0,002         |
| 6 min | 0,035   | 0,038    | 0,312    | 0,038 | 0,159         |

Comparando os resultados com os valores obtidos nos procedimentos anteriores, é possível verificar que essa metodologia não foi satisfatória, pois apresentou uma concentração muito pequena, proporcionalmente ao valor da absorvância.

Após as análises, os resultados obtidos indicavam a presença de flavonoides, no qual constou que havia mais presença em 80% de MeOH a 25 °C,

tendo o processo de 6 h de extração, com a utilização de *Shaker*, o mais indicado. Com isso, o estudo verificou se o tempo de cultivo da rúcula influencia na concentração dos flavonoides.

Na literatura consultada existem poucos relatos da extração de flavonoides da rúcula com a utilização de agitação ocasional. Entretanto há vários trabalhos de extração empregando outras matrizes vegetais que utilizam *Shaker* (PALOMINO; DEL BIANCHI, 2015) e ultrassom (LLOYD; VAN WYK, 2012). O ultrassom é utilizado no propósito de utilização de frequência e intensidade de ondas ultrassônicas, e o *shaker* pela rotação. Cada método tem o seu princípio e cada um é importante para melhorar a transferência de massa e energia, para poder então ocorrer a transferência dos compostos ativos para o solvente (LLOYD; VAN WYK, 2012).

#### 4.1.2 Quantificação de flavonoides no extrato variando-se o tempo de cultivo da rúcula hidropônica

A partir extratos obtidos anteriormente, realizou-se um novo estudo de quantificação dos flavonoides dos extratos obtidos com 80% MeOH, variando-se o tempo de cultivo da rúcula e o tempo e a temperatura de extração (TABELA 15).

**TABELA 15:** Concentração de flavonoides totais (continua)

| Teste  | Temperatura °C | Absorbância | MÉDIA | Desvio Padrão | Teor de flavonoides (mg/L) |
|--------|----------------|-------------|-------|---------------|----------------------------|
| A-1-12 |                | 1,980       |       |               |                            |
| A-2-12 | 25             | 1,020       | 1,616 | 0,520         | 144,159                    |
| A-3-12 |                | 1,848       |       |               |                            |
| A-1-24 |                | 1,170       |       |               |                            |
| A-2-24 | 25             | 3,584       | 2,278 | 1,219         | 203,495                    |
| A-3-24 |                | 2,080       |       |               |                            |
| A-1-36 |                | 1,389       |       |               |                            |
| A-2-36 | 25             | 1,389       | 0,952 | 0             | 84,645                     |
| A-3-36 |                | 1,389       |       |               |                            |
| A-1-48 |                | 1,528       |       |               |                            |
| A-2-48 | 25             | 2,071       | 1,801 | 0,222         | 160,741                    |
| A-3-48 |                | 1,806       |       |               |                            |
| B-1-12 |                | 1,407       |       |               |                            |
| B-2-12 | 55             | 2,340       | 1,852 | 0,468         | 165,312                    |
| B-3-12 |                | 1,811       |       |               |                            |
| B-1-24 | 55             | 1,479       | 1,53  | 0,068         | 136,451                    |

|        |    |       |       |       |         |
|--------|----|-------|-------|-------|---------|
| B-2-24 |    | 1,505 |       |       |         |
| B-3-24 |    | 1,607 |       |       |         |
| B-1-36 |    | 1,573 |       |       |         |
| B-2-36 | 55 | 1,889 | 1,627 | 0,239 | 145,145 |
| B-3-36 |    | 1,420 |       |       |         |
| B-1-48 |    | 0,958 |       |       |         |
| B-2-48 | 55 | 0,980 | 0,992 | 0,042 | 88,230  |
| B-3-48 |    | 1,040 |       |       |         |
| C-1-12 |    | 2,216 |       |       |         |
| C-2-12 | 25 | 2,232 | 2,192 | 0,056 | 195,787 |
| C-3-12 |    | 2,128 |       |       |         |
| C-1-24 |    | 2,252 |       |       |         |
| C-2-24 | 25 | 2,344 | 2,407 | 0,049 | 215,058 |
| C-3-24 |    | 2,325 |       |       |         |
| C-1-36 |    | 2,276 |       |       |         |
| C-2-36 | 25 | 2,244 | 2,237 | 0,042 | 199,820 |
| C-3-36 |    | 2,192 |       |       |         |
| C-1-48 |    | 1,407 |       |       |         |
| C-2-48 | 25 | 1,431 | 1,459 | 0,071 | 130,087 |
| C-3-48 |    | 1,541 |       |       |         |
| D-1-12 |    | 1,489 |       |       |         |
| D-2-12 | 55 | 1,817 | 1,928 | 0,504 | 172,124 |
| D-3-12 |    | 2,479 |       |       |         |
| D-1-24 |    | 2,489 |       |       |         |
| D-2-24 | 55 | 2,180 | 2,394 | 0,186 | 213,892 |
| D-3-24 |    | 2,514 |       |       |         |
| D-1-36 |    | 1,768 |       |       |         |
| D-2-36 | 55 | 2,150 | 1,779 | 0,365 | 158,769 |
| D-3-36 |    | 1,420 |       |       |         |
| D-1-48 |    | 1,479 |       |       |         |
| D-2-48 | 55 | 1,512 | 1,51  | 0,031 | 134,659 |
| D-3-48 |    | 1,540 |       |       |         |
| E-1-12 |    | 0,542 |       |       |         |
| E-2-12 | 25 | 1,412 | 1,134 | 0,514 | 100,957 |
| E-3-12 |    | 1,450 |       |       |         |
| E-1-24 |    | 1,700 |       |       |         |
| E-2-24 | 25 | 1,525 | 1,553 | 0,134 | 138,513 |
| E-3-24 |    | 1,436 |       |       |         |
| E-1-36 |    | 1,370 |       |       |         |
| E-2-36 | 25 | 1,764 | 1,518 | 0,215 | 135,376 |
| E-3-36 |    | 1,420 |       |       |         |
| E-1-48 |    | 1,069 |       |       |         |
| E-2-48 | 25 | 0,907 | 0,998 | 0,083 | 88,768  |
| E-3-48 |    | 1,019 |       |       |         |
| F-1-12 | 55 | 1,616 | 1,660 | 0,073 | 148,103 |

|        |    |       |       |       |         |
|--------|----|-------|-------|-------|---------|
| F-2-12 |    | 1,620 |       |       |         |
| F-3-12 |    | 1,745 |       |       |         |
| F-1-24 |    | 1,395 |       |       |         |
| F-2-24 | 55 | 1,613 | 1,376 | 0,247 | 122,648 |
| F-3-24 |    | 1,120 |       |       |         |
| F-1-36 |    | 1,720 |       |       |         |
| F-2-36 | 55 | 1,717 | 1,672 | 0,080 | 149,179 |
| F-3-36 |    | 1,580 |       |       |         |
| F-1-48 |    | 1,073 |       |       |         |
| F-2-48 | 55 | 1,091 | 1,094 | 0,023 | 97,372  |
| F-3-48 |    | 1,119 |       |       |         |
| G-1-12 | 25 | 1,126 | 1,123 | 0,004 | 99,971  |
| G-2-12 |    | 1,120 |       |       |         |
| H-1-12 |    | 1,125 |       |       |         |
| H-2-12 | 55 | 1,127 | 1,127 | 0,003 | 100,330 |
| H-3-12 |    | 1,130 |       |       |         |

A partir dos valores da absorvância pode-se calcular o teor de flavonóis de cada extrato obtido, utilizando-se o cálculo da curva padrão  $y = 89,631x - 0,6842$ , trocando o x pela média da amostra. A partir desses resultados (TABELA 15), pode-se verificar que o teste C-24 obteve a maior concentração podendo levar em conta que, é uma planta de 14 dias, na temperatura de 35°C em 24 horas de agitação.

O valor da quantidade de flavonóis para o extrato D-24 foi bem próximo ao encontrado para o extrato C-24, o que indica que a variação da temperatura não influencia na extração, mas o tempo de extração é um fator importante na obtenção de grandes quantidades de flavonoides a partir da rúcula *in natura*.

Um outro fator, que deve ser considerado para a obtenção dos extratos vegetais a partir da rúcula, é o seu tempo de cultivo, pois tanto C-24 quanto D-24, a rúcula tinha 14 dias de cultivo quando foi utilizada no teste.

#### 4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De forma inicial, fez-se interessante avaliar os resultados obtidos para a ANOVA (análise de variância), que indicou se houve diferença estatística entre as médias apresentadas da quantidade determinada de flavonoides obtida para cada extrato. O teste foi aplicado para as amostras indicadas na Tabela 15, entretanto por ter uma amostra, que se destacou entre todas, foi necessário verificar se essa informação pode ser comprovada estatisticamente, por isso realiza-se a análise de

variância (FIGURA 6).

**FIGURA 6** Resultados da ANOVA par amostra C-24

| ANOVA; Var.:Flavonóis; R-sqr=.60289; Adj.:46273<br>2**(3-0) design; MS Residual=862,8882<br>DV: Flavonóis |          |    |          |          |          |
|---|----------|----|----------|----------|----------|
| Factor  | SS       | df | MS       | F        | p        |
| (1)Temperatura  | 7,33     | 1  | 7,332    | 0,008497 | 0,927635 |
| (2)Tempo  | 5709,63  | 1  | 5709,625 | 6,616878 | 0,019779 |
| (3)T. Planta  | 5698,53  | 1  | 5698,526 | 6,604014 | 0,019881 |
| 1 by 2  | 6557,35  | 1  | 6557,352 | 7,599307 | 0,013478 |
| 1 by 3  | 4294,90  | 1  | 4294,900 | 4,977354 | 0,039439 |
| 2 by 3  | 2,36     | 1  | 2,362    | 0,002737 | 0,958885 |
| Error   | 14669,10 | 17 | 862,888  |          |          |
| Total SS  | 36939,20 | 23 |          |          |          |

O critério utilizado para a análise dos resultados da ANOVA baseia-se no  $p$  (chamado de p-valor), caso este seja menor que 0,05, houve diferença estatística entre as médias comparadas para aquela variável. Dessa forma, rejeita-se a hipótese de que as médias são todas iguais e se aceita a hipótese de que há pelo menos um grupo que difere estatisticamente. O *software* coloca as variáveis/fatores que foram significativas em vermelho.

Tendo isso, é possível observar que as o tempo de agitação, o tempo da planta e as combinações temperatura + tempo de agitação e temperatura + tempo da planta são variáveis que interferiram na média das amostras.

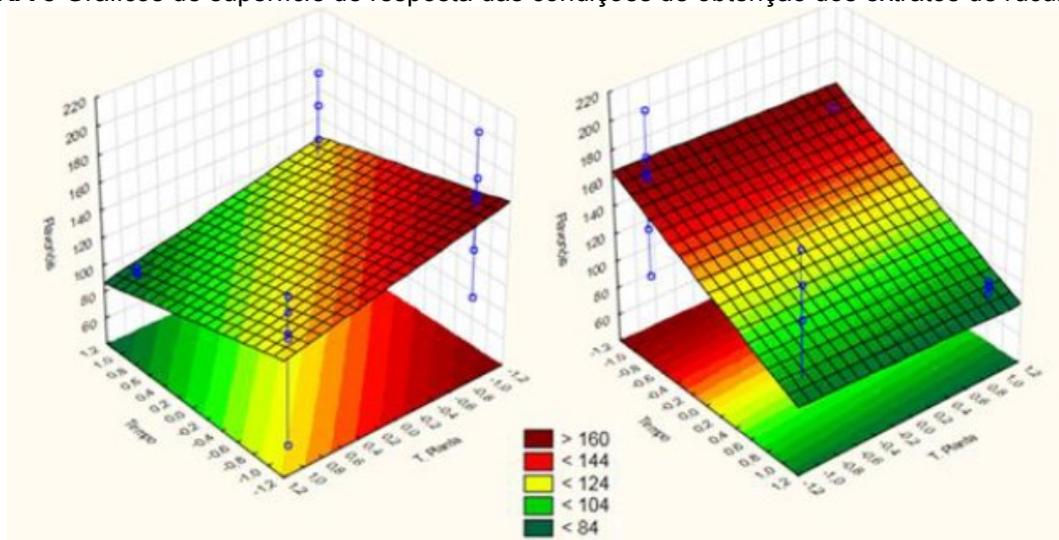
A partir disso, pode-se imaginar que as variáveis que indicaram diferença estatística, ou que estão em vermelho, serão os fatores de impacto para a obtenção de flavonoides, sendo possível verificar suas condições ótimas, para isso avalia-se os efeitos estimados para cada fator. Os efeitos estimados para cada fator podem ser observados na (FIGURA 7).

**FIGURA 7** Efeitos estimados para cada fator na obtenção dos extratos de rúcula.

| Effect Estimates; Var.:Flavonóis; R-sqr=.60289; Adj.:46273 (Spreadsheet1)<br>2**(3-0) design; MS Residual=862,8882<br>DV: Flavonóis |          |          |          |          |                    |                    |          |                    |                    |                    |
|---|----------|----------|----------|----------|--------------------|--------------------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Factor  | Effect   | Std.Err. | t(17)    | p        | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt | Coeff.   | Std.Err.<br>Coeff. | -95, %<br>Cnf.Limt | +95, %<br>Cnf.Limt |
| Mean/interc.  | 124,2465 | 5,99614  | 20,72108 | 0,000000 | 111,5957           | 136,8972           | 124,2465 | 5,996138           | 111,5957           | 136,8972           |
| (1)Temperatura  | 1,1054   | 11,99228 | 0,09218  | 0,927635 | -24,1961           | 26,4069            | 0,5527   | 5,996138           | -12,0980           | 13,2035            |
| (2)Tempo  | -30,8481 | 11,99228 | -2,57233 | 0,019779 | -56,1496           | -5,5466            | -15,4240 | 5,996138           | -28,0748           | -2,7733            |
| (3)T. Planta  | -30,8181 | 11,99228 | -2,56983 | 0,019881 | -56,1196           | -5,5166            | -15,4090 | 5,996138           | -28,0598           | -2,7583            |
| 1 by 2  | -33,0589 | 11,99228 | -2,75668 | 0,013478 | -58,3604           | -7,7574            | -16,5295 | 5,996138           | -29,1802           | -3,8767            |
| 1 by 3  | 26,7547  | 11,99228 | 2,23100  | 0,039439 | 1,4533             | 52,0562            | 13,3774  | 5,996138           | 0,7266             | 26,0281            |
| 2 by 3  | -0,6274  | 11,99228 | -0,05232 | 0,958885 | -25,9289           | 24,6741            | -0,3137  | 5,996138           | -12,9645           | 12,3370            |

A partir dos resultados, o próximo passo é saber quais são as condições ótimas para cada variável. Tal informação é obtida através da análise dos gráficos de superfície de resposta (FIGURAS 8).

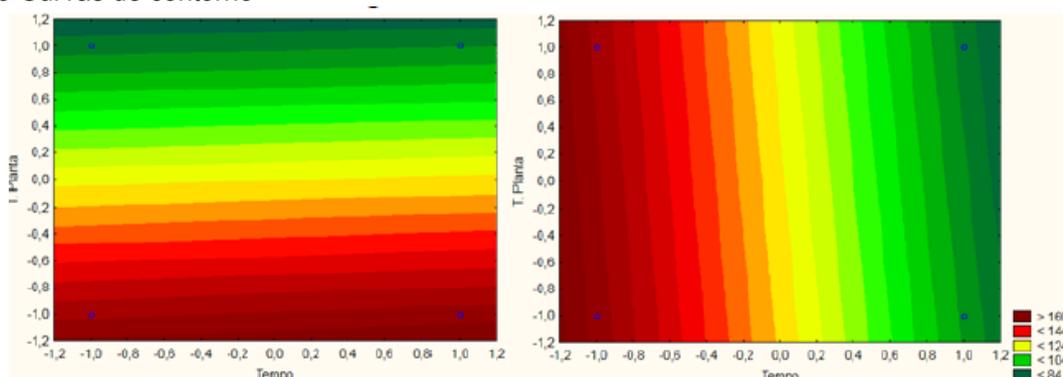
**FIGURA 8** Gráficos de superfície de resposta das condições de obtenção dos extratos de rúcula.



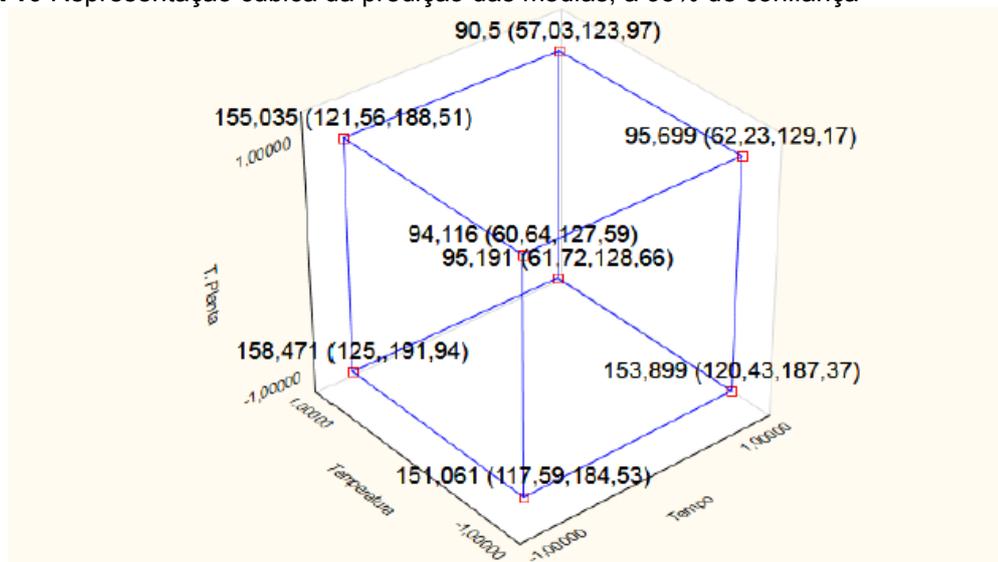
Observando a Figura 8, podem-se ver dois gráficos de superfície de resposta que, ao se comparar as variáveis significativas tem-se um plano gradiente que, através da cor, apresenta qual o ponto de maior obtenção da variável resposta, no caso, a quantidade de flavonoides.

Como é possível visualizar, a variável Tempo quando no nível menor (-1), isto é, 12 horas, apresenta maior quantidade de flavonoides e para a variável Tempo da planta, no menor nível (-1), isto é, 7 dias de cultivo, apresentou maior quantidade de flavonoides. Dessa forma, indica-se que o processo de cultivo ideal se dá por 7 dias e para a obtenção do extrato, 12 horas de agitação em *Shaker*.

Além da superfície de resposta, outra ferramenta pertinente são as curvas de contorno (FIGURA 9), muito utilizadas para visualizar os pontos ótimos com maior precisão, pois muitas vezes a verificação de tais condições é dificultada pela superfície de resposta.

**FIGURA 9** Curvas de contorno

Assim, a partir da Figura 9, as condições de cultivo supracitadas são confirmadas, no entanto, é possível encontrar um *gap*. São apresentados dois gráficos (tanto para a FIGURA 8, quanto para a FIGURA 9) e se forem analisados os dois de forma cautelosa, verifica-se que apresentam informações com uma leve diferença, pois se sabe que a variável temperatura não impacta na variável resposta. No entanto, a combinação temperatura com as outras variáveis pode interferir no rendimento, dessa forma, a comparação otimizada, levando em consideração essas combinações, pode ser visualizada na Figura 10.

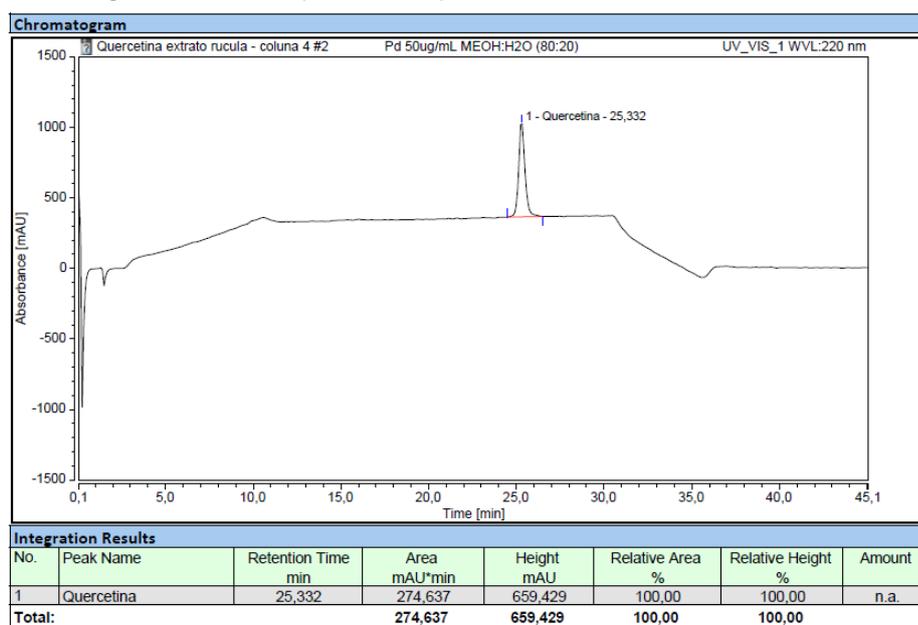
**FIGURA 10** Representação cúbica da predição das médias, a 95% de confiança

Observando-se a Figura 10 é possível concluir que para os níveis baixos as variáveis tempo, 12 horas, e tempo de cultivo da planta, 7 dias, apresentam melhores resultados, combinado com o nível alto da temperatura, ou seja, 55°C.

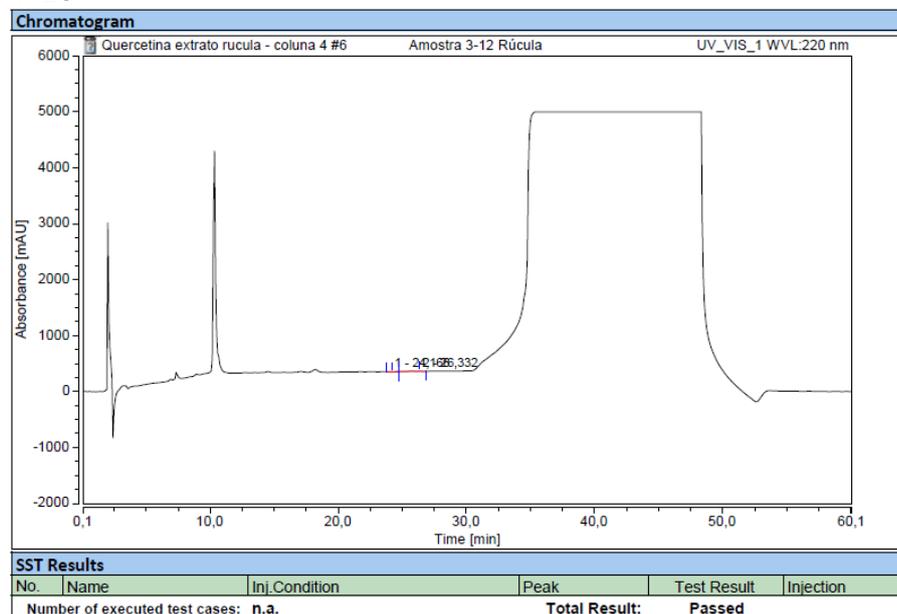
### 4.3 ANÁLISE DE PRESENÇA DE FLAVONÓIDES NOS EXTRATOS DE RÚCULA POR HPLC

As Figuras 11 e 12 apresentam cromatogramas resultantes das análises por HPLC realizadas no laboratório do padrão de quercetina e de um extrato, respectivamente.

**FIGURA 11** Cromatograma da curva padrão da quercetina



**FIGURA 12** HPLC



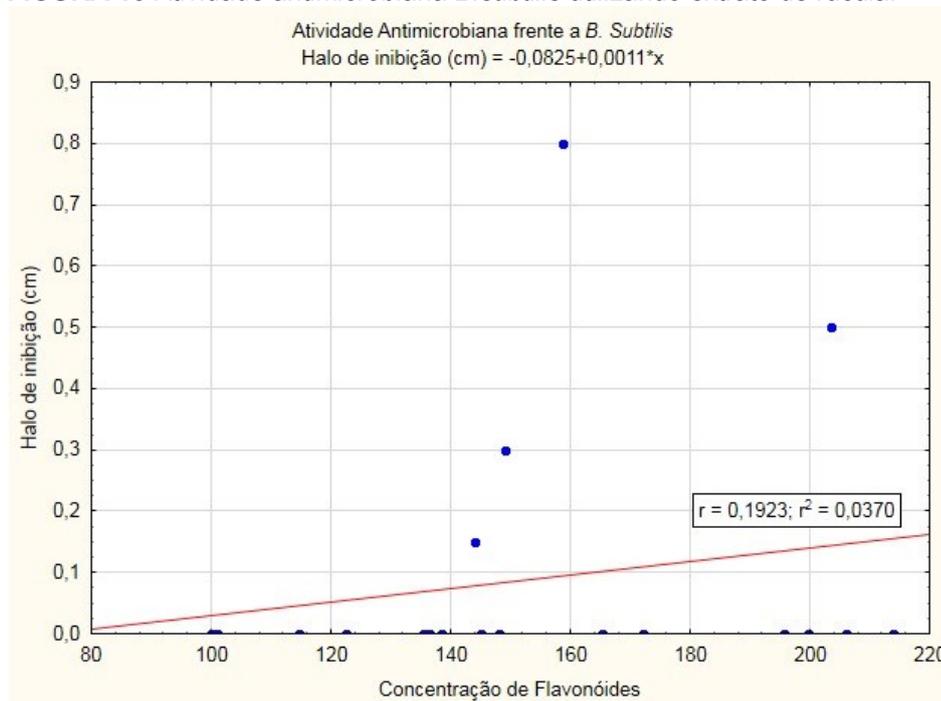
Na Figura 12 pode-se observar que tem um mínimo de percepção de quercetina em nossa amostra. As condições utilizadas na análise foram as mesmas indicadas no trabalho de Huber, Hoffmann-Ribani e Rodriguez-Amaya (2008), onde se teve como melhor condição cromatográfica utilizando a coluna de fase reversa C18 Nova-Pak (4 $\mu$ m, 3,9 x 150mm), e como fase móvel metanol e água.

Para a técnica do HPLC, o pico de quercetina não foi tão preciso, conforme a imagem (FIGURA 11), por tanto nas amostras não foi detectada quercetina, por motivos desconhecidos, podendo ser, que tivesse pouca concentração nos extratos, ou as metodologias utilizadas não foram suficientes, ou também pelo tamanho da coluna.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *Bacillus subtilis* E ANTIFÚGICA *Trichoderma* DOS EXTRATOS DA RÚCULA IN NATURA

O teste antimicrobiano foi realizado utilizando a técnica de inibição de halo para a bactéria *B.subtlis*, que é classificada como gram positiva (FIGURA 13) com os extratos obtidos a partir da rúcula *in natura* conforme Tabela 15.

**FIGURA 13** Atividade antimicrobiana *B.subtilis* utilizando extrato de rúcula.

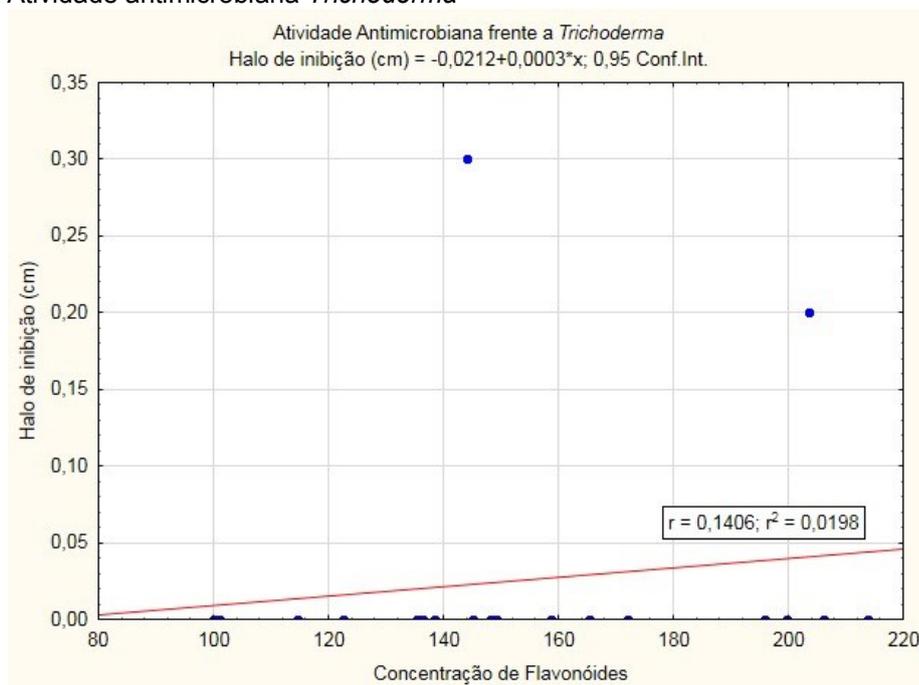


Como se pode observar, para a bactéria *B.subtlis* houve halo de inibição no extrato A-12 com 0,3 cm de inibição, A-24 com 0,5 cm de inibição, D-36 com 16 cm de inibição e no F-36 com 0,6 cm de inibição. Como a bactéria *B.subtlis* é uma gram positiva e é mais propensas a serem inibidas por agente antimicrobianos devido a sua parede celular, que apresenta uma camada a menos de lipopolissacarídeos (BURT, 2004).

Segundo Burt (2004), os compostos com potencial antimicrobiano são levemente mais ativos para as bactérias gram-positivas do que as gram-negativas, pertinente à existência de uma membrana externa que envolve a parede celular, na qual determina a difusão de compostos hidrofóbicos.

Para o fungo *Trichoderma*, os halos de inibição da ação dos extratos foram medidos revelando efeitos inibitórios para os extratos A-12 com 0,6 cm de inibição e C-24 com 0,4 cm de inibição (FIGURA 14).

**FIGURA 14** Atividade antimicrobiana *Trichoderma*

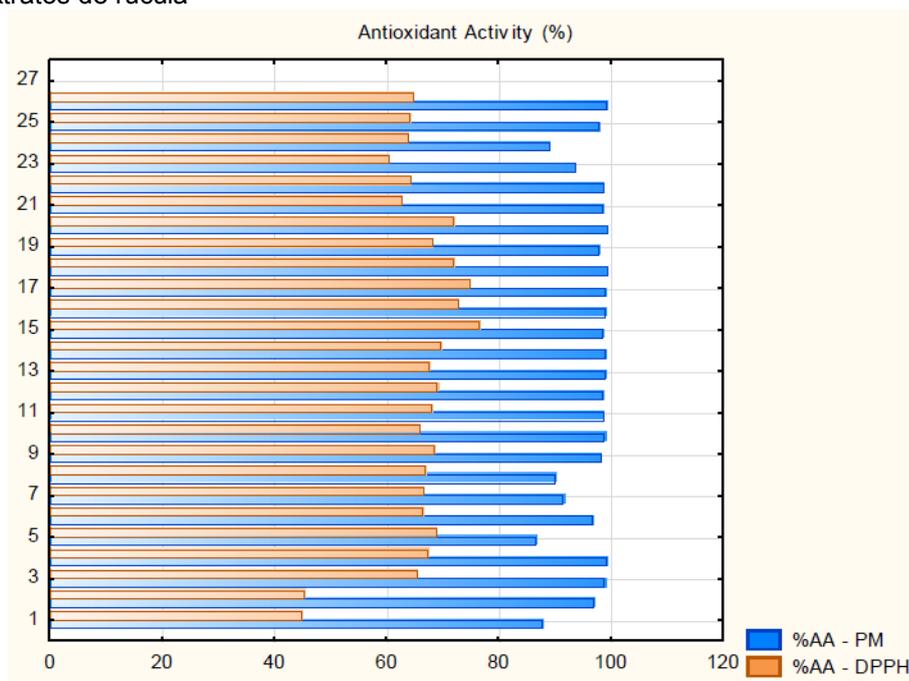


Nos dois testes houve uma correlação entre a concentração de flavonoides e o halo de inibição, dita como fraca, mas ela existe, podendo então dizer que quanto mais flavonoides, maior o halo de inibição.

#### 4.5 ANÁLISE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE RÚCULA

O potencial antioxidante do extrato de rúcula foi avaliado por dois diferentes métodos, utilizando DPPH e peróxido de hidrogênio, considerando a hipótese de que a atividade antioxidante é diretamente proporcional à concentração de flavonoides na planta (FIGURA 15).

**FIGURA 15** Gráfico de barras do resultado das análises de antioxidante para os extratos de rúcula



Analisando a Figura 15, é possível evidenciar uma diferença entre as respostas obtidas para cada um dos dois testes, o que pode evidenciar um déficit de precisão. No entanto, de acordo com MELO (2008), ambos os testes convergem para a afirmação de que o extrato de rúcula pode atuar como um bom agente antioxidante. Ainda, considerando os resultados obtidos com o planejamento verificado anteriormente, tem-se que a amostra 2 (B-12) atuaria com o melhor potencial antioxidante, considerando a variação dos subgrupos, pois apresentaria a maior quantidade de flavonoides.

## 5 CONCLUSÕES

Nesse estudo foram realizados vários testes de obtenção de extrato, que no qual foi obtido um resultado satisfatório, podendo chegar a um único método e eficaz. O método mais eficiente prevaleceu 80% de metanol, em todos os testes, sendo que a temperatura que melhor sobressaiu foi de 55°C, com a planta de 7 dias da rúcula *in natura* no tempo de agitação de 12 horas.

Para o método de HPLC, precisam ser realizados mais estudos e testes para poder comprovar a eficiência dos testes, variando-se as condições de análise.

Os métodos antimicrobianos provaram que, quanto mais flavonoides no extrato, maior é o halo de inibição, e a análise antioxidante teve correlação também com a quantidade de flavonoides no extrato.

## REFERÊNCIAS

- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.1124-1131, 2004.
- ARBOS, K. A., FREITAS, R. J. S., STERTZ, S. C., DORNAS, M. F. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 30(2): 501-506, abr.-jun, 2010.
- AZARENKO, O., JORDAN, M. A., WILSON, L. Erucin, the Major Isothiocyanate in Arugula (*Eruca sativa*), Inhibits Proliferation of MCF7 Tumor Cells by Suppressing Microtubule Dynamics. **PLoS ONE** 9(6): e100599., 2014.
- BERNARDES, N. R., PESSANHA, F. F., OLIVEIRA, D. B. Alimentos funcionais: Uma breve revisão. *Ciência e Cultura* – **Rev. Cient. Multid.** Cent. Univ. da FEB; 6(2):11-19, 2010.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-53, 2004.
- CAFITO. **Fitoterapia**. São Paulo: Crf-sp, 2009.
- CHUN, S. S.; VATEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.**, 40, 809, 2005.
- COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTER, I.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. In vivo quercetin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. **European Journal of Immunology**, v., 35, n. 2, p. 584-592, fev., 2005.
- COMBRINCK, S. et al. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common post harvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.344-349, 2011.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4), pp. 562 – 584, 1999.
- CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 590-595. 1997.
- DORNAS, W. C. et al., Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

FERNANDEZ, J.; REYES, R.; PONCE, H.; OROPEZA, M.; VAN CALSTEREN, M-R; JANKOWSKI, C.; CAMPOS, M. G. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. **European Journal of Pharmacology**, 522, p. 108-115, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, p. 284-295, 2008.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemical Toxicology**. v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

FRANKE, A. A. et al. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. **J. Food Comp. Anal.**, v.17, n.1, p.1-35, 2004.

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.503-507, 2003.

FURLANI, P. R. et al. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. 52p. (Boletim Técnico IAC, 180).

GRANATO D., NUNES S. D., **Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas: uma abordagem teórico-prática**. São Paulo: Elsevier, 2016.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS A. C. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55, pp. 401 – 504, 2000.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, 342, 1007-1011, 1993.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 2379-2383, 1992.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 1242-1246, 1993.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 1591-1598, 1992.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chem.** 113(4):1278-1282, 2008.

HUBER, L. S.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Flavonois e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 97-108, jan./mar, 2008.

HUBINGER, S. Z. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosméticos de ação antioxidante dos frutos de (*Dimorphandra mollis* Benth. (*Leguminosae Caesalpinioideae*)).** 2009. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The Protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 154, n. 1-3, p. 21-29, nov., 2000.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection** 19:603-608, 2000.

JESPERS, A. B. K.; WAARD, M. A. de. Natural products in plant protection. **Netherlands Journal Plant Pathology**, 99:109-117, 1993.

LLOYD, P. J.; VAN WYK, J. **Introduction to Extraction in Food Processing In: LEBOVKA, N.; VOROBIEV, E., et al (Ed.).** Enhancing Extraction Processes in the Food Industry Estados Unidos: CRC Press, 2012. cap. 1, p.1 - 24.(ContemporaryFoodEngineering).

LU, J., ZHENG, Y. L., LUO, L., WU, D. M., SUN, D. X., FENG, Y. J., Quercetin reverses d-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. **Behavioural Brain Research** 171:251–60, 2006.

LUZ, L. P. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos.** 1998, 108f. Dissertação (Pós-Graduação em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

MACHADO, A. R; ASSIS, L. M.; SILVA, P. P.; BADIALE, F., ELIANA.; S.; SOARES, L. A. Influência do solvente na extração de fenóis totais em microalga *Spirulina platensis*. Escola de Química e Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande – **9º MPU, FURG**. 2010.

MACHADO, H; OLIVEIRA, T. T; NAGEM, T. J; PETERS, V. M; FONSECA, C. S. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1 - 2 p.33-39, 2008.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIT, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

MAIA, A. F. C. A.; MEDEIROS, D. C.; FILHO, J. L. Adubação Orgânica em diferentes substratos na produção de mudas de rúcula. **Revista Verde**, v. 2, n. 2, p. 89-95, 2006.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Plant secondary metabolites**. New Jersey: Humana Press, 2007. 130p.

MENDES, A. D. R. et al. Produção de biomassa e de flavonoides totais por fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.2, 2005.

MIDDLETON, Jr. E.; KANDASWAMI, C. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In: Harborne, J. B. *The flavonoids*. ed. London: Chapman and Hall. 1994.

MINAMI, K.; TESSARIOLI NETO, J. **A cultura da rúcula**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1998. 19p.

MIRANDA, Cintia A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de 2 diversas plantas**. Dissertação - UFLA. Lavras - MG, pag. 34. 2010.

MUÑOZ, F. **Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio, cultivo y processado**. 4 ed. Barcelona: Mundi-Prensa, 2002.

NGUEFACK, J., BUDDE, B. B., JAKOBSEN M.: Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: Their antibacterial activity and ability permeabilize the cytoplasmic membrane *Listeria innocua* examined by flow cytometry letters in Applied Microbiology. **Res. J. of Medicinal Plant**, 39 (5), pp. 395–400 (2004)

OLIVEIRA, M. A. C. de. **Fitoterápico: Perfil Fitoquímico, Controle e Validação da Metodologia Analítica**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Ufpe, Recife, 2005.

PAIVA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. Trad. 4ª ed. Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PALOMINO GARCÍA, L. R.; DEL BIANCHI, V. L. Efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 777-786, mar./abr. 2015.

PINTO, J. M. A. et al. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop protection**, v.29, p.838-842, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. 2003. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n.4, p. 401-436, 1999.

ROGÉRIO, A. P.; DORA, C. L.; ANDRADE, E. L.; CHAVES, J. S.; SILVA, L. F. C.; LEMOS-SENNA, E.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded

microemulsion in the airway allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p. 288-297, abr., 2010.

ROUSSEAC, F.; ROUSSEAC, A. **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques**, University of Le Mans, France, 2007.

SALA, F. C.; ROSSI, F.; FABRI, E. G.; RONDINO, E.; MINAMI, K.; COSTA, C. P. Caracterização varietal de rúcula. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, julho 2004.

SCHMIDT, L. F. **Efeito de extratos naturais de origem vegetal sobre esporos de *Desulfotomaculum nigrificans***. 1994. Tese (Doutorado). Campinas. Universidade de Campinas.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SEDIYAMA, M. A. N.; PEDROSA, M. W. **Hidroponia: uma técnica alternativa de cultivo**. Documento EPAMIG, 2007.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4,n.1, p71-78,2002.

SILVA, M. A. B. GEAGESP. **Seção de Economia**. São Paulo-SP. Comunicação pessoal. 2004.

SILVA, M. B. et al. **Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas**. IN: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: EPAMIG, Cap.3, p.33-54, 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK.P.R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SOBRINHO, T. J. S. P.; et al., Phenolic content and antioxidant capacity of our Cnidocolus species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5 p.2310-2316, 2011

SOUSA C. M. M; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. S.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2): 351-355, 2007.

STANGARLIN, J.R. et al. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.

STRINGHETA, P. C. *et al.*, Luteína: Propriedades antioxidantes e benefícios a saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2006.

TRANI, P. E.; FORNASIER, J. B.; LISBÃO, R. S. **Cultura da rúcula**. Campinas: IAC. 1992. 8p. (Boletim técnico 146).

VIEIRA, M. A. M. et al. Análise de Compostos Fenólicos, Metilxantinas, Tanino e Atividade Antioxidante de Resíduo do Processamento da Erva-Mate: Uma Nova Fonte Potencial de Antioxidantes. *Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2nd International Workshop / Advances in Cleaner Production*. São Paulo – Brazil – May 20th-22nd - 2009.

VRIES, J. DE; JANSSEN, K.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN STAVEREN, W. A.; KATAN, M. B. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. **Cancer Letters**, 114, 141-144, 1997.

WACH, A., PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry**, 100: 699–04, 2007.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.**, v.126, p.485-493, 2001.

YAO, P., NUSSLER, A., LIU, L., HAO, L., SONG, F., SCHIRMEIER, A., NUSSLER, N., Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathway. **Journal of Hepatology**, 47: 253–61, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC. Cap. 23, p. 577-614, 2003.