

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS ITUMBIARA**

**CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES EXTRATOS
FOLIARES DE *Ruta graveolens***

VANESSA FREITAS SANTOS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. BLYENY HATALITA PEREIRA ALVES

**ITUMBIARA
2012**

VANESSA FREITAS SANTOS

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES EXTRATOS
FOLIARES DE *Ruta graveolens*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química do Instituto Federal de Goiás – IFG – Câmpus Itumbiara, como parte das exigências do curso de Licenciatura em Química para obtenção do título de licenciado em Química.

Orientador: Prof^a. Dra. Blyeny Hatalita Pereira Alves.

ITUMBIARA
2012

Vanessa Freitas Santos

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES EXTRATOS FOLIARES DE *Ruta graveolens*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química do Instituto Federal de Goiás – IFG – Câmpus Itumbiara, como parte das exigências do curso de Licenciatura em Química para obtenção do título de licenciado em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Aprovada em 16 de abril de 2012.



Prof.(a) Orientador(a). Dra. Blyeny Hatalita Pereira Alves
IFG – Câmpus Itumbiara



Prof.(a). Msc. Fernando dos Reis Carvalho
IFG – Câmpus Itumbiara



Prof.(a). Msc. Gláucia Aparecida Andrade Rezende
IFG – Câmpus Itumbiara

615.53 Santos, Vanessa Freitas.
S237a Análise da atividade antioxidante de diferentes extratos foliares de
Ruta graveolens/ Vanessa Freitas Santos. -- Itumbiara: [s. n.], 2012.
48 f.: il.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Curso de Licenciatura
em Química, 2012.

Orientador: Prof. Dra. Blyeny Hatalita Pereira Alves.

1. Extratos foliares. 2. Ruta Graveolens. 3. Radicais livres (Química).
4. Plantas medicinais 5. Arruda I. Alves, Blyeny Hatalita Pereira.
II. Título.

Dedico este trabalho de conclusão de curso e todo meu empenho e dedicação em quatro anos de faculdade ao meu pai Juvenil Elias dos Santos e minha mãe Janice Freitas Santos, que apesar de todas as limitações inerentes a suas vidas de estudo sempre me incentivaram e sacrificaram para oferecer-me a melhor educação que podiam. Ao meu eterno namorado Luiz Romeu, pelo companheirismo, carinho, amor e incentivo, fundamentais para construção de todos os planos e sonhos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua infinita graça em permitir-me viver, e viver ao lado de pessoas maravilhosas, que me apoiam, incentivam e realmente me querem bem. Agradeço a todas as pessoas que estão presentes em minha vida direta ou indiretamente, e a algumas em especial.

Aos meus pais que estão sempre comigo em todas as circunstâncias e acreditam em mim mais que eu mesma, agradeço por sempre me apoiarem e mesmo com todas as limitações e dificuldades me ajudarem nas realizações dos meus objetivos e sonhos.

As minhas irmãs, amigas verdadeiras, cúmplices, enfim irmãs, duas pessoas maravilhosas, presentes de Deus pra mim.

Ao meu amado sobrinho Pedro Lucas, benção de Deus em minha vida, ele realmente me alegra e faz meus dias ficarem mais floridos, mesmo quando estou diante de grandes problemas.

Ao meu eterno namorado Luiz Romeu, por estar comigo na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na riqueza e na pobreza (literalmente né amor), mesmo sem fazer juramento algum. Obrigada amor, por tudo, saiba que você é a diferença na minha vida.

Aos meus colegas de classe, pelo companheirismo nesses quatro anos de curso, em especial ao meu amigo Lenilson, companheiro fiel de curso, estudos, trabalhos, monitorias, iniciações, congressos. Obrigada amigo, pelo apoio e ajuda de sempre.

Aos meus professores, por me ensinaram coisas importantes que levarei por toda a vida. De alguns lembrarei por motivos especiais, Tatiana por me ensinar a gostar de cálculos, ao Thiago por me fazer acreditar que no final tudo se acerta, a Katiuscia pelo carinho com que trata seus alunos, Emanuel por me instigar a querer ser uma professora tão boa quanto ele, Rachel pela didática impecável e a ética profissional de realmente se preocupar com a “formação” de seus alunos, Gláucia pela disposição de sempre, Fernando pela alegria e empolgação que demonstra ao ensinar, Wagner “diretor” que conheci no IFG, sempre preocupado em resolver os problemas levados pelos alunos.

E finalmente quero agradecer em especial a minha orientadora por 3 anos consecutivos, Blyeny Hatalita, pessoa incrível, que me ensinou muito mais que conteúdos curriculares, participante efetiva da minha formação discente e docente, exemplo de inspiração tanto como professora quanto como pessoa, você é muito especial pra mim. Obrigada por tudo, sem o seu incentivo eu não teria feito a metade das coisas que fiz no decorrer deste curso.

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. Mas no fundo isso não tem muita importância. O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre. Em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

Shakespeare

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Aparelho Clevenger para determinação de Óleo - balão volumétrico de fundo redondo (1), tubo de transferência de vapor (2), condensador (3), tubo separador com escala volumétrica (4), tubo de retorno (5) e saída de óleo (6).....	20
FIGURA 2- Esquema para o Extrator Soxhlet; A – manta de aquecimento, B - balão de fundo redondo, C - cartucho com amostra, D – extrator Soxhlet, E –condensador de refluxo.....	21
FIGURA 3- (a) Extrator de lípideos (Solab Científica), (b) Destilador do extrator de lipídeos (Solab Científica), (c) Cartucho com amostra inserido no extrator de lipídeos (Solab Científica).....	22
FIGURA 4- Fatores responsáveis pelo aumento exacerbado dos radicais livres no organismo.....	23
FIGURA 5- Antioxidantes sintéticos mais utilizados.....	25
FIGURA 6- Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.....	27
FIGURA 7- Mecanismo proposto para a reação entre DPPH e Eugenol.....	28
FIGURA 8- Suporte com cartucho de celulose.....	30
FIGURA 9- Cromatograma do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i>	35
FIGURA 10- Curva de Calibração do DPPH.....	36
FIGURA 11- Reatividade do radical DPPH com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas secas de <i>Ruta graveolens</i>	37
FIGURA 12 – (12-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de <i>Ruta graveolens</i> , para infusão alcoólica; (12-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da <i>Ruta graveolens</i> para o extrato da infusão alcoólica.....	37
FIGURA 13 – (13-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de <i>Ruta graveolens</i> , para infusão aquosa; (13-b) Gráfico da % de inibição de	

DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* para o extrato da infusão aquosa.....38

FIGURA 14 – (14-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens*, para o extrato alcoólico da folha seca; (14-b) Gráfico da % de inibição de DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato alcoólico da folha seca.....38

FIGURA 15 – (15-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato alcoólico da folha fresca; (15-b) Gráfico da % de inibição de DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato alcoólico da folha fresca.....39

FIGURA 16 – (16-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato aquoso da folha seca; (16-b) Gráfico da % de inibição de DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato aquoso da folha seca.....39

FIGURA 17– (17-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato aquoso da folha fresca; (17-b) Gráfico da % de inibição de DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato aquoso da folha fresca.....40

FIGURA 18 – (18-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato hexano da folha seca; (18-b) Gráfico da % de inibição de DPPH[•] em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato hexano da folha seca.....40

LISTA DE TABELAS E EQUAÇÕES

TABELAS:

Tabela 1- Diluição dos extratos de <i>Ruta graveolens</i>	31
Tabela 2- Quantificação dos extratos de <i>Ruta graveolens</i>	34
Tabela 3- Valores da % DPPH remanescente, porcentagem de inibição e concentração inibitória de 50% dos radicais DPPH.....	41
Tabela 4- Valores de CE_{50} da <i>Ruta graveolens</i> e do extrato de folhas de diferentes espécies.....	42

EQUAÇÕES:

equação 1- Porcentagem de DPPH remanescente.....	32
equação 2- Porcentagem de DPPH inibido.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. JUSTIFICATIVA.....	15
1.2. OBJETIVOS.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. ARRUDA- <i>Ruta graveolens</i>	17
2.2. HISTÓRIA E MISTISCISMO.....	18
2.3. PODERES CURATIVOS E ESTUDOS.....	18
2.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	19
2.4.1. Hidrodestilação.....	20
2.4.2.Extração por Soxhlet.....	21
2.4.3.Extração por infusão.....	22
2.5. ESTRESSE OXIDATIVO: RADICAIS LIVRES.....	22
2.5.1. Antioxidante.....	24
2.5.2. Atividade antioxidante: Teste de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril- hidrazil).....	26
3. METODOLOGIA.....	29
3.1. COLETA DA ESPÉCIE.....	29
3.2. ANÁLISE QUÍMICA.....	29
3.3. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	29
3.4. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	29
3.5. EXTRAÇÃO.....	30
3.5.1. Extração por hidrodestilação.....	30

3.5.2. Extração por extrator de lipídeos	30
3.5.3. Extração por Infusão.....	31
3.6. ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E CÁLCULO DE CE ₅₀	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	33
4.2. EXTRAÇÕES.....	33
4.2.1. Clevenger.....	33
4.2.2. Extração por extrator de lipídeos.....	33
4.2.3. Infusão.....	34
4.3. QUANTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Ruta graveolens</i>	34
4.4. CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	34
4.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CÁLCULO DE CE ₅₀	35
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

O interesse pelo estudo dos produtos naturais tem aumentado sistematicamente em todo o mundo. No Brasil isso tem ocorrido devido à grande quantidade de espécies da flora brasileira que são utilizadas popularmente na medicina alternativa, culinária, e até mesmo como cosméticos. No entanto, devido à grande diversidade, ainda são poucas as que foram alvos de estudos mais sistemáticos pelas comunidades científicas. A *Ruta graveolens* (arruda) é uma planta conhecida por apresentar atividade analgésica, anti-hemorrágica, antiinflamatória, calmante, estimulante, repelente, vermicida, entre outras. Porém, poucas pesquisas foram realizadas com intuito de analisar sua composição química e sua atividade antioxidante. Neste sentido, esta pesquisa consistiu em analisar a atividade antioxidante dos extratos foliares de *Ruta graveolens*.

As extrações foram realizadas pelos métodos de infusão das folhas secas e através do extrator de lipídeos com folhas frescas e secas com os solventes hexano, álcool e água. A atividade antioxidante foi determinada pelo radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) seguindo o método descrito por Lima (2008). Os extratos aquosos atingiram melhor rendimento em relação às extrações com os solventes hexano e álcool e as folhas frescas apresentaram um rendimento inferior às folhas secas. A espécie apresentou atividades antioxidantes confirmadas através dos cálculos de CE_{50} , o extrato aquoso de folha seca apresentou a maior atividade antioxidante, inibindo 78,98% dos radicais DPPH.

Palavras- chave: extratos foliares, *Ruta graveolens*, radicais livres, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The interest in the study of natural products has grown steadily throughout the world. In Brazil this has occurred due to the large number of species of flora that are popularly used in alternative medicine, cooking, and even as cosmetics. Notwithstanding, due to the large diversity, there are few that have been targets of more systematic studies by scientific communities. The *Ruta graveolens* (rue) is a plant known to have analgesic, anti-hemorrhagic, inflammatory, soothing, stimulating, repellent, vermifuge, among others activities. However, little research has been carried out in order to analyze their chemical composition and antioxidant activity. In this sense, this research was to analyze the antioxidant activity of leaf extracts of *Ruta graveolens*.

The extractions were performed by the methods of infusion of dried leaves and by extracting lipids with fresh leaves and dried using the solvents hexane, alcohol and water. The antioxidant activity was determined by stable free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) following the method described by Lima (2008). The aqueous extracts achieved better performance compared to solvent extraction with hexane and ethanol and the fresh leaves had an income below the leaves. The species showed antioxidant activities confirmed through calculations of EC₅₀, the aqueous extract of dry leaf showed the highest antioxidant activity, inhibits 78.98% of DPPH radicals.

Keywords: leaf extracts, *Ruta graveolens*, free radicals, antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, ainda é possível perceber, com relativa frequência o uso de plantas no tratamento de doenças. Essa prática, eficaz ou não, é tradicional e utilizada há milhares de anos. Em busca de melhores condições de vida, o homem necessitou recorrer à natureza para obter fontes de alimentação e proteção à saúde e a partir de suas observações e experiências, sofreu um processo biológico evolutivo descobrindo, nas plantas, o tratamento de injúrias e doenças (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Esses conhecimentos ancestrais e que foram repassados através de gerações são, em grande parte, empíricos. Pouco se conhece sobre as suas composições e os efeitos químicos e biológicos em seres vivos. Segundo Cechinel Filho e Yunes (1998), a vegetação mundial contém cerca de 500 mil espécies de plantas, dentre as quais somente 5% são estudadas por comunidades científicas. Esses dados revelam a necessidade de investir cada vez mais em pesquisas voltadas para a área de produtos naturais, já que, de acordo com os autores supracitados, 80% da população utilizam basicamente medicamentos de origem vegetal, devido ao seu baixo custo.

Além das propriedades medicinais, os compostos extraídos das plantas permitem uma ampla aplicação em indústrias agrícolas, cosméticas e alimentícias. No uso agrícola, o estudo é voltado às ações alelopáticas e à extração de substâncias usadas no controle de pragas. Nas indústrias cosméticas e alimentícias, o interesse é pela busca de nutrientes importantes para o corpo humano, em especial compostos que possuam ação antioxidante, pois estes apresentam efeitos benéficos, principalmente contra o envelhecimento precoce (LIMA, 2008).

Este trabalho focalizou o estudo e a análise da atividade antioxidante de uma planta medicinal originária da Europa Meridional e cultivada em vários países, como o Brasil, e especialmente da Europa Oriental: *Ruta graveolens* L., conhecida popularmente por sua versatilidade, é usada por apresentar propriedades fitoterápicas e condimentares.

1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são ricas na ingestão desses alimentos. Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos.

Apesar da espécie em questão ser bastante conhecida e utilizada no país, uma busca bibliográfica realizada em *sites* de pesquisa com as palavras-chaves: arruda, *Ruta graveolens*, composição química da *Ruta graveolens* e atividade antioxidante de *Ruta graveolens*, indicam que até o presente momento, poucos estudos científicos referentes aos constituintes químicos e a potencial ação antioxidante da planta são encontrados na literatura. Com isso, percebe-se a relevância científica em se realizar a caracterização química desta espécie vegetal.

1.2 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos foliares de *Ruta graveolens* (arruda).

ESPECÍFICOS

Obter os extratos alcoólico, aquoso e hexanólico por diferentes métodos de extração.

Determinar a atividade antioxidante dos extratos obtidos da folha.

Comparar a atividade antioxidante dos extratos foliares de *Ruta graveolens*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arruda - *Ruta graveolens*

Ruta graveolens, também conhecida como arruda, arruda-fedorenta, arruda-doméstica, arruda dos jardins e ruta de cheiro forte, é uma planta originária da região Mediterrânea, pertencente à família Rutáceas. É fortemente aromática, possui folhas esparsas ovais, carnudas, de cor verde glauco, apresenta haste lenhosa desde a base e chega a atingir aproximadamente 50 cm de altura. Suas flores são pequenas e amareladas e o fruto é capsular, de quatro ou cinco lobos, salientes e rugosos (BALMÉ, 2004; FETROW; AVILA, 1999).

Além dessa espécie de arruda citada e mais conhecida por sua disponibilidade em várias regiões, também existem outras como a arruda do mato e a arruda do campo. A arruda do mato apresenta propriedades medicinais no combate ao reumatismo, fraqueza e afecções do fígado e como normalizante do ciclo menstrual e estimulante. Os arbustos apresentam ramos revestidos de penugens, folhas imparipenadas (parecidas com folhas de rosas) e flores panículas, pertence a família das leguminosas e tem seu habitat no estado do Nordeste. E a arruda do campo, com arbustos de ramos quadrangulares, folhas oblongas e pequenas, apresentam flores em cachos e frutos de forma capsular, apresenta propriedades estimulantes e aromáticas, é encontrada em maior abundância nos estados de São Paulo e Paraná (TORIANE; OLIVEIRA, 2006).

Ruta graveolens, da família das Rutáceas, espécie discutida e analisada nesse trabalho, devido a sua disponibilidade na região, possui um odor característico e na composição das folhas são encontrados princípios amargos, resina, goma, matérias tânicas e em maior quantidade um glucosídeo denominado Rutina. Quando aproximadamente um quilo dessas folhas é submetido à destilação em vapor de água são obtidos sete gramas de uma essência incolor ou levemente amarelada de perfume intenso (TORIANE; OLIVEIRA, 2006).

2.2 História e misticismo

A crença em poderes curativos e místicos das plantas em geral, remonta épocas antigas, na Mitologia Grega, por exemplo, no Olimpo, morada dos deuses, cada um dos 12 deuses tinha preferência por alguma planta. Zeus adotava o carvalho como símbolo, Atenas tinha preferência pela oliveira. Os Egípcios reverenciavam diversas plantas e usavam para enfeitar templos e fazer coroas para agradar aos deuses. Na Idade Média, padres usavam plantas e ervas na divulgação do cristianismo, rebatizando algumas e retirando outras do uso pagão (TORIANE, OLIVEIRA, 2006)

Ruta graveolens, historicamente, é conhecida por seus poderes míticos, usada como proteção contra mau olhado de invejosos, muitas pessoas andam com um ramo atrás da orelha, também é usual plantar arruda em um vaso e colocá-lo na entrada da casa, pois segundo crenças tem o poder de energizar, com vibrações positivas, todas as pessoas que entram (TORIANE; OLIVEIRA, 2006)

Na Grécia antiga, por exemplo, as mulheres andavam com ramos de arruda nas mãos, pois acreditavam que esses afastavam maus espíritos, moléstias e feitiçaria. Shakespeare, em seu livro “Hamlet”, cita a arruda como “erva sagrada dos domingos”, pois era ingrediente de uma bebida ingerida por possesores antes dos rituais de exorcismo (SILVA e MARQUES, 1992). São muitas as citações que indicam o antigo uso da arruda, por diferentes etnias e é importante salientar que ainda é utilizada pelos seus supostos poderes sobrenaturais em alguns rituais religiosos.

2.3 Poderes curativos e estudos

O uso de plantas para fins medicinais, é prática comum desde os primórdios da humanidade como forma alternativa ou complementar aos medicamentos da medicina tradicional. O uso dessas plantas como forma de tratamento é designado fitoterapia. As maiores influências desses tratamentos alternativos advém das culturas indígenas, africanas e naturalmente europeias. A Organização Mundial da Saúde apresenta cerca de 80% da população mundial como usuarios de algum tipo de planta para tratamento de sintomas dolorosos ou desagradáveis, e cerca de 30% utilizam por recomendações médicas (RIVIOLI, BONFIM, BITTENCOURT, 2007).

Ruta graveolens, além dos conhecimentos mágicos e religiosos, é muito utilizada, devido as diversas propriedades conhecidas empiricamente, dentre elas analgésica, anti-hemorrágica, anti-inflamatória, calmante, estimulante, repelente, vermífida e fungicida.

Porém, apesar dos vários benefícios citados a planta pode provocar algumas reações colaterais devido ao efeito tóxico de superdosagens como risco de aborto espontâneo, fotossensibilidade, hipotensão e reações cutâneas alérgicas (BALMÉ, 2004; FETROW; AVILA, 1999).

O conhecimento empírico a respeito dos poderes curativos da arruda, descende desde a antiguidade, como cita Bruno (2007):

A arruda está entre as primeiras espécies medicinais conhecidas pelos curadores primitivos. Aristóteles comentou que a ingestão da arruda provoca suores fétidos, semelhantes ao cheiro da planta. Plínio a considerou importante medicamento, sendo antídoto poderoso contra picadas de escorpiões, aranhas, insetos venenosos e também contra as mordidas de cães e serpentes. Dióscorides descreveu, na Matéria Médica, várias virtudes da arruda. Andrés de Laguna comentou que a arruda desperta os adormecidos da letargia (BRUNO, 2007, p.32).

De acordo com Toriane; Oliveira (2006), além dessas propriedades mencionadas, a arruda ainda era usada desde a antiguidade pelas propriedades relacionadas ao desejo sexual masculino, como um diminuidor do apetite sexual e como afrodisíacos feminino. Hieronymus Bock, um dos primeiros botânicos da história, recomendava a adição de arruda a alimentos e bebidas de monges e religiosos, para garantir a pureza e a castidade.

Poucos estudos, no entanto, foram realizados no Brasil com intuito de comprovar os benefícios e os riscos provenientes ao uso de *Ruta graveolens*. Entre os poucos encontrados, um trabalho, realizado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará por Silva *et.al* (2010) caracterizou os constituintes químicos do óleo volátil e a atividade nematicida.

2.4 Técnicas de extração

O processo de extração é conhecido e realizado desde os primórdios da civilização. Mesmo desconhecendo as propriedades físico - químicas das moléculas da água, primeiro solvente utilizado pelo homem, ela já era utilizada em técnicas para retirar dos vegetais cores, aromas, sabores, remédios e venenos. Com o passar do tempo, o homem descobriu um segundo solvente, o álcool, que era capaz de extrair outras essências e espíritos, adjetivo atribuído ao óleo essencial recolhido de plantas (TORIANE e OLIVEIRA, 2006).

O interesse em plantas, dos pontos de vista alimentícios, medicinal e cosmetológico, têm desencadeado uma busca incessante por solventes e métodos cada vez mais rentáveis e eficientes. Com isso, a obtenção de óleos essenciais deriva de diferentes

processos de extração, dentre estes hidrodestilação, extração por soxhlet e extração por infusão, técnicas que estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas, viabilizando a produção com determinada composição e pureza desejada (LIMA, 2008).

2.4.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é o método que consiste em levar à ebulição com água, a amostra para extração. É um método muito eficiente, no qual as substâncias voláteis, como os óleos essenciais, destilam com o vapor de água e podem ser separadas da água no destilado, por serem imiscíveis (LIMA, 2008).

O aparelho utilizado nessa técnica é o Clevenger modificado, segundo Santos, et.al.(2004) “é um extrator dimensionado para operar em circuito fechado e foi projetado com base nos cálculos hidrodinâmicos, de modo que seja mantido o equilíbrio do sistema durante o período de extração de óleos essenciais, fixado em 240 minutos”.

O Clevenger é composto por um balão volumétrico de fundo redondo, tubo de transferência de vapor, condensador, tubo separador com escala volumétrica, tubo de retorno e saída de óleo (Figura 1). O balão volumétrico, com a amostra e a água, é colocado em uma manta aquecedora, a mistura entra em ebulição e os vapores sobem pelo tubo de transferência de vapor, entrando em contato com o condensador. Os vapores são condensados e depositados na parte superior do tubo separador. Como o óleo essencial é menos denso que a água, esta volta para o balão volumétrico através do tubo de retorno e o óleo essencial permanece no tubo separador até o fim do processo, onde ele é recolhido na saída de óleo.

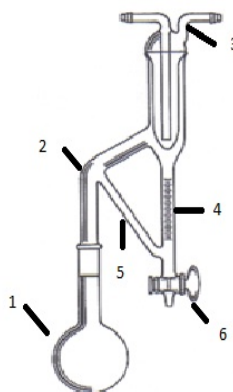


FIGURA 1- Aparelho Clevenger para determinação de Óleo- balão volumétrico de fundo redondo (1), tubo de transferência de vapor (2), condensador (3), tubo separador com escala volumétrica (4), tubo de retorno (5) e saída de óleo (6).

Disponível em: http://www.unividros.com/aparelho_oleo_clevenger.php.

2.4.2 Extração por Soxhlet

A extração por Soxhlet (Figura 2) é muito eficiente quando se deseja extrair continuamente substâncias de amostras sólidas. O aparelho é composto por três partes, um balão, um corpo extrator e um condensador de refluxo. No balão, acrescenta-se o solvente e inicia-se o aquecimento, o solvente entra em ebulição e condensa. Após a condensação, o solvente fica retido no cartucho de celulose, inserido dentro do corpo extrator, com a amostra. Depois de alguns minutos em contato com a amostra, a substância é extraída e o solvente com a substância retornam ao balão em um processo contínuo (DIAS; COSTA; GUIMARÃES, 2004).

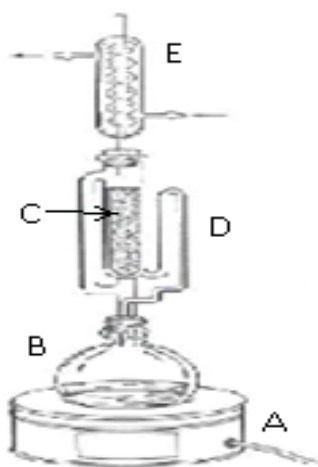


FIGURA 2. Esquema para o Extrator Soxhlet; A – manta de aquecimento, B – balão de fundo redondo, C – cartucho com amostra, D – extrator Soxhlet, E –condensador de refluxo

O extrator utilizado nessa pesquisa não foi o mesmo descrito por Dias *et.al* (2004). Apesar do processo de extração ser basicamente o mesmo, ele se difere quanto a retenção de solvente no corpo extrator. O extrator da Solab Científica (Figura 3) possui um recipiente que fica encaixado em uma base aquecedora, um condensador e um cartucho de sustentação para se inserir o cartucho de celulose. O solvente é colocado no recipiente na base aquecedora e se condensa. Quando ocorre a condensação o solvente goteja aos poucos, no cartucho onde está a amostra, extraindo a substância em um processo contínuo.

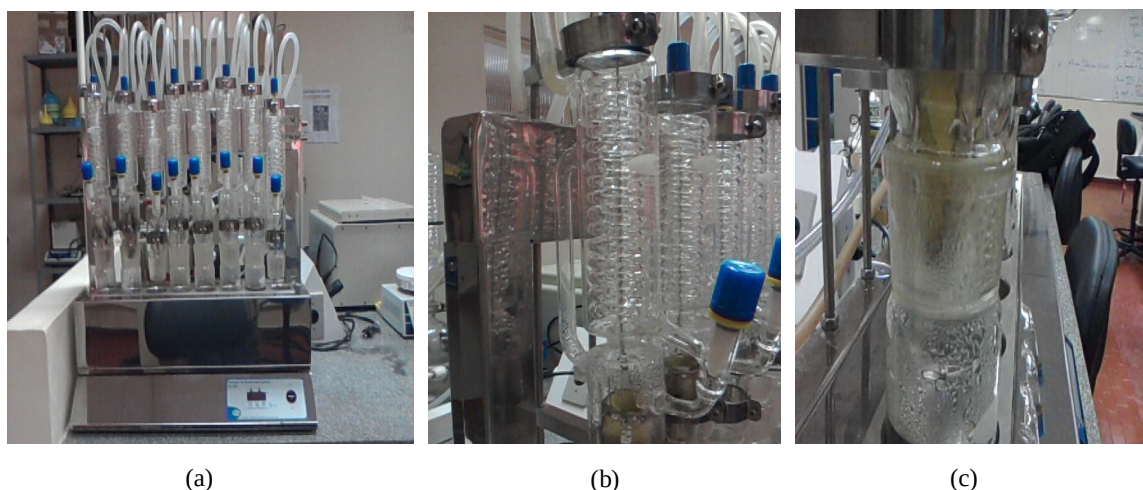


FIGURA 3- (a) Extrator de lípidos (Solab Científica), (b) Destilador do extrator de lípidos (Solab Científica), (c) Cartucho com amostra inserido no extrator de lípidos (Solab Científica).

Segundo Dias *et.al* (2004), as principais vantagens da extração por Soxhlet comparando com os outros métodos de condensação, são a economia de solvente utilizado, a eficiência do processo e o pouco tempo de observação necessário por parte do operador.

2.4.3 Extração por infusão

Este método consiste em colocar as amostras imersas nos solventes, como etanol e água demanda um tempo maior de extração, geralmente de quatro dias ou mais. As infusões feitas com a água sofrem uma separação dos óleos do restante da suspensão com diclorometano. Depois são colocadas em evaporador rotativo para eliminar o solvente. As infusões feitas com etanol são colocadas em evaporador rotativo para separar o solvente de extração, o etanol, e, desta forma, se obtém o óleo puro.

2.5 Estresse oxidativo: radicais livres

Os radicais livres são moléculas instáveis de elevada reatividade, produzidas naturalmente pelas mitocôndrias do organismo, formadas normalmente durante a respiração e a digestão de alimentos. Seus átomos possuem um número ímpar de elétrons, ou seja, é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ocupando um orbital molecular. Essa instabilidade momentânea o faz reagir inespecificamente com diversas e diferentes moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

A intervenção dos radicais livres está presente em todas as diversificações da química, desde a despoluição da troposfera, a partir da degradação do metano pela participação do radical hidroxila no ciclo do ozônio, até as reações de polimerização conhecidas pela importância sintética, tanto em nível laboratorial quanto industrial. Contudo, o crescente estudo da química radicalar se dá devido aos seus efeitos- danosos ou não- em meio biológico (COOPER, 1995).

Algumas moléculas instáveis de radicais livres não possuem malefícios, ao contrário, são benéficas ao organismo, pois permitem o combate a inflamações, destroem bactérias e controlam o tônus dos músculos lisos, que regulam o funcionamento dos órgãos internos e vasos sanguíneos. Esses radicais tornam-se um problema pelo desenvolvimento excessivo, devido a fatores como poluição do ar, luz ultravioleta do sol, toxicidade de herbicidas, antibióticos e consumo de álcool e cigarro (COOPER, 1995).

Essa exacerbada produção de radicais livres ocorre por um processo conhecido como estresse oxidativo (Figura 4) desencadeando ou agravando diversas patologias, como doenças do coração, diabetes, doenças neurológicas degenerativas, AIDS e vários tipos de câncer. O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio das reações de oxidorredução celular, aumentando significativamente o potencial de redução da célula, produzindo assim, moléculas radicalares e não- radicalares, como hidroxila, superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, nitritos, nitratos, que atacam lipídios, proteínas e DNA (DAVID; DAVID; BARREIROS, 2006).

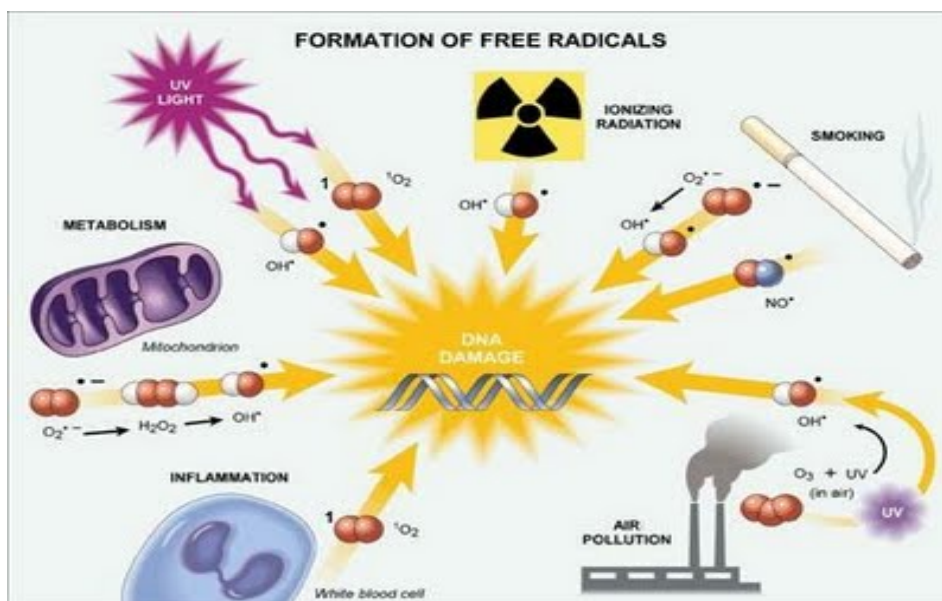


FIGURA 4- Fatores responsáveis pelo aumento exacerbado dos radicais livres no organismo.
Disponível em: <http://andreiatorres.blogspot.com.br/2009/08/o-que-sao-radica-livres.html>

2.5.1 Antioxidante

O termo antioxidante designa a propriedade de evitar a reação de oxidação de outras substâncias químicas. Os antioxidantes são um conjunto de substâncias formado por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, que retardam ou inibem os efeitos danosos dos radicais livres em organismos, causados por reações metabólicas ou por fatores externos, como radiação ionizante (TOVANI, 2009).

Segundo Halliwell (1999), os antioxidantes, de forma geral, são as substâncias que retardam ou inibem a oxidação do substrato quando estão em baixas concentrações comparadas com o substrato oxidável. Os radicais formados a partir de antioxidantes não formam uma reação em cadeia, pois não possuem reatividade para propagação das reações, eles são neutralizados por outros radicais e formam produtos estáveis, ou que podem reagir com outro antioxidante.

O organismo humano consegue sintetizar algumas enzimas antioxidantes, como, Superóxido Dismutase (SOD), que ocasiona a redução do radical superóxido para formação de peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) que trabalham simultaneamente no organismo com a proteína glutathione para reduzir o peróxido de hidrogênio e formar água, e também alguns antioxidantes não enzimáticos como peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro, ácido diidroliprótico. No entanto, grande parte dos agentes antioxidantes, como α - tocoferol, β - caroteno, ácido ascórbico, flavonoides e poliflavonoides, estão presentes em alimentos como vegetais, frutas, legumes e cereais integrais (ZOPPI, 2004).

Além de reduzir os efeitos danosos dos radicais livres no organismo humano, os antioxidantes são usados em grande escala nas indústrias, principalmente nas alimentícias. O estudo das propriedades antioxidantes de alguns produtos químicos se iniciou com Moureu e Dufraise durante a Primeira Guerra Mundial. Foram testados mais de 500 compostos, porém apenas alguns podem ser usados para consumo humano, já que é necessário que eles apresentem algumas características, dentre elas, eficácia em baixas concentrações, efeitos desejáveis quanto ao odor, sabor e cor, estabilidade no processo de armazenamento e principalmente que não tenham efeitos tóxicos, além dos custos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Ainda de acordo com Ramalho; Jorge (2006), os antioxidantes podem ser classificados em seis grupos, conhecidos como primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários são compostos

fenólicos que inibem a propagação da reação por meio da doação de um átomo de hidrogênio que é abstraído por radicais livres formando espécies inativas para reação em cadeia. Os sinérgicos, por sua vez, atuam em conjunto com os primários, a fim de aumentar a ação antioxidante deste, já que possuem pouco ou nenhuma atividade antioxidante. Os antioxidantes biológicos envolvem diferentes enzimas, capazes de remover oxigênio ou compostos altamente reativos de sistemas alimentícios. Os quelantes, devido a sua estrutura em forma de garras agem complexando íons metálicos como cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. E por fim, os antioxidantes mistos que incluem vários compostos de plantas e animais, dentre esses, proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido caféico.

Desde o início dos anos 80 tem aumentado consideravelmente a busca por antioxidantes, preferencialmente de origem natural, pois o consumo de substâncias com propriedades antioxidantes pode produzir uma proteção efetiva contra os processos oxidativos naturais do organismo (BERNARDI, 2007).

Segundo Coneglian *et.al* (2011), os antioxidantes usados nas indústrias de alimentos podem ser de origem natural ou sintetizados. Os sintéticos mais utilizados são BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), PG (galato de propila) e TBHQ (terc-butil hidroquinona). Possuem estrutura fenólica que permite a doação de um próton a um radical livre, interrompendo dessa forma o processo de oxidação desses radicais, estes que estão representados abaixo (Figura 5).

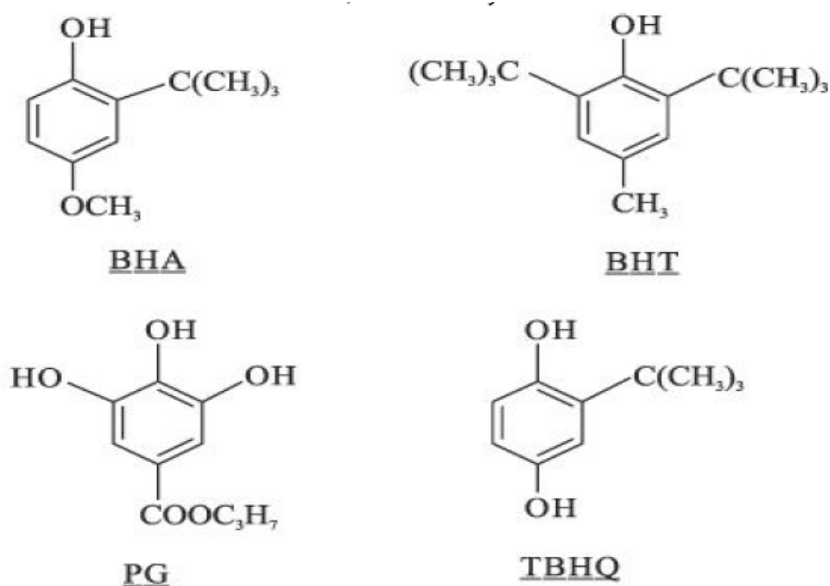


FIGURA 5- Antioxidantes sintéticos mais utilizados

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023

Ainda de acordo com Coneglian *et.al* (2011), esses antioxidantes sintéticos estão cada vez mais sendo substituídos pelos de origem natural, pois alguns estudos realizados comprovaram possíveis toxicidades e riscos à saúde humana. Os antioxidantes naturais mais utilizados são o tocoferol (vitamina E) e a vitamina C. A vitamina E atua como antioxidante primário, sequestrando as moléculas de oxigênio através da reação com os radicais livres e a vitamina C atua como antioxidante quelante através da oxidação lipídica.

2.5.2 Atividade antioxidante: Teste de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O aumento do processo oxidativo das células, está diretamente relacionado com várias patologias degenerativas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer e de Parkinson e outras doenças inflamatórias e imunológicas. Nesse sentido, tem-se evidenciado um aumento nos estudos relacionados à antioxidantes em fármacos, cosméticos, alimentos e produtos naturais, com intuito de combater ou minimizar os efeitos danosos do estresse oxidativo (TOMEI; SALVADOR, 2007).

Segundo Tomei e Salvador (2007), com o aumento nas pesquisas acerca da análise antioxidante, principalmente de produtos naturais, houve consequentemente uma crescente busca e validação de metodologias analíticas sensíveis, de baixo custo e boa qualidade para avaliar o status antioxidante de diferentes amostras. Dentre estas, as principais e mais utilizadas são, o ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), ensaio de redução do β - caroteno, quimioluminescência do luminol, ensaio com reagente Folin-Ciocalteu, redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), ensaio TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), ensaio FRAP (*ferric reducing antioxidant power*).

Esses métodos são classificados em diretos e indiretos. O ORAC, ensaio de redução do β - caroteno e quimioluminescência do luminol fazem parte do método direto que é caracterizado pela presença de uma competição entre um oxidante e o antioxidante. Já os métodos Folin-Ciocalteu, redução do radical DPPH, ensaio TEAC, ensaio FRAP, são classificados como indiretos e diferente da competição que ocorre nos métodos diretos, neste acontece uma reação de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante por transferência de elétrons e a intensidade da mudança de cor que ocorre nessa reação é proporcional a atividade antioxidante (CASTELO- BRANCO; TORRES, 2011).

De acordo com Alves *et.al.*(2010) além desses métodos citados, ainda existem muitos que estão sendo usados e estudados, já que, devido aos diferentes tipos de radicais

livres e suas formas de atuação no organismo humano, dificilmente existirá um método eficiente e universal capaz de medir precisa e quantitativamente a atividade antioxidante em diferentes meios, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos.

O método DPPH, foi sugerido inicialmente em 1950, tempos depois, foi utilizado na determinação antioxidante de fenóis, alimentos e amostras biológicas. O radical DPPH é muito instável devido à disposição de elétrons desemparelhados por toda a molécula, sua coloração é púrpura e abrange uma banda de absorção em etanol de 520 nm. Quando o DPPH é reduzido, perde a coloração original, ficando de cor amarelada. Essa mudança de cor ocorre devido à capacidade antioxidante de uma substância específica que consegue sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina (Figura 6) (ALVES *et.al*, 2010).

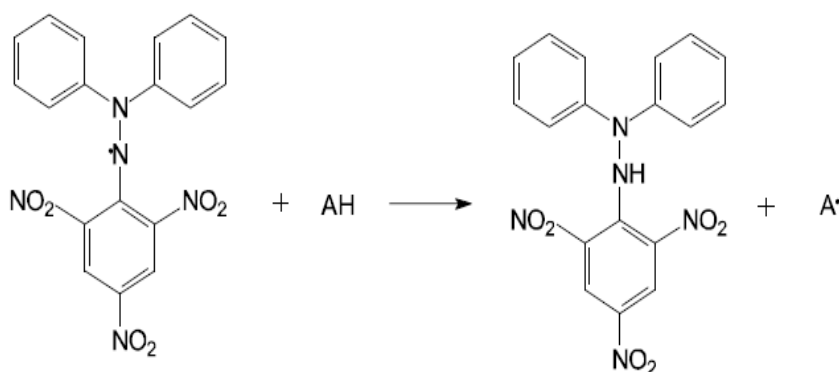


FIGURA 6. Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.

Brand-Williams; Cuvelir, Berset (1995), propõe um mecanismo para a reação de inibição do radical DPPH pelo antioxidante Eugenol (Figura 7).

Nesse mecanismo, com a apresentação de três supostas etapas, o início ocorre com o sequestro do hidrogênio do grupo hidroxila desimpedido do Eugenol pelo radical DPPH. Posteriormente segue a primeira etapa com a doação do segundo hidrogênio pela deslocalização do Elétron da posição orto à posição para, que está substituído. A segunda etapa ocorre por dimerização de dois radicais fenoxil para fenóis, com as posições orto e para livres. Em seguida, dois grupos hidroxilas são regenerados pela transferência intramolecular do radical H e podem interagir novamente com o DPPH. A terceira etapa ocorre através da complexação de uma molécula de radical DPPH com o radical arila da molécula de Eugenol.

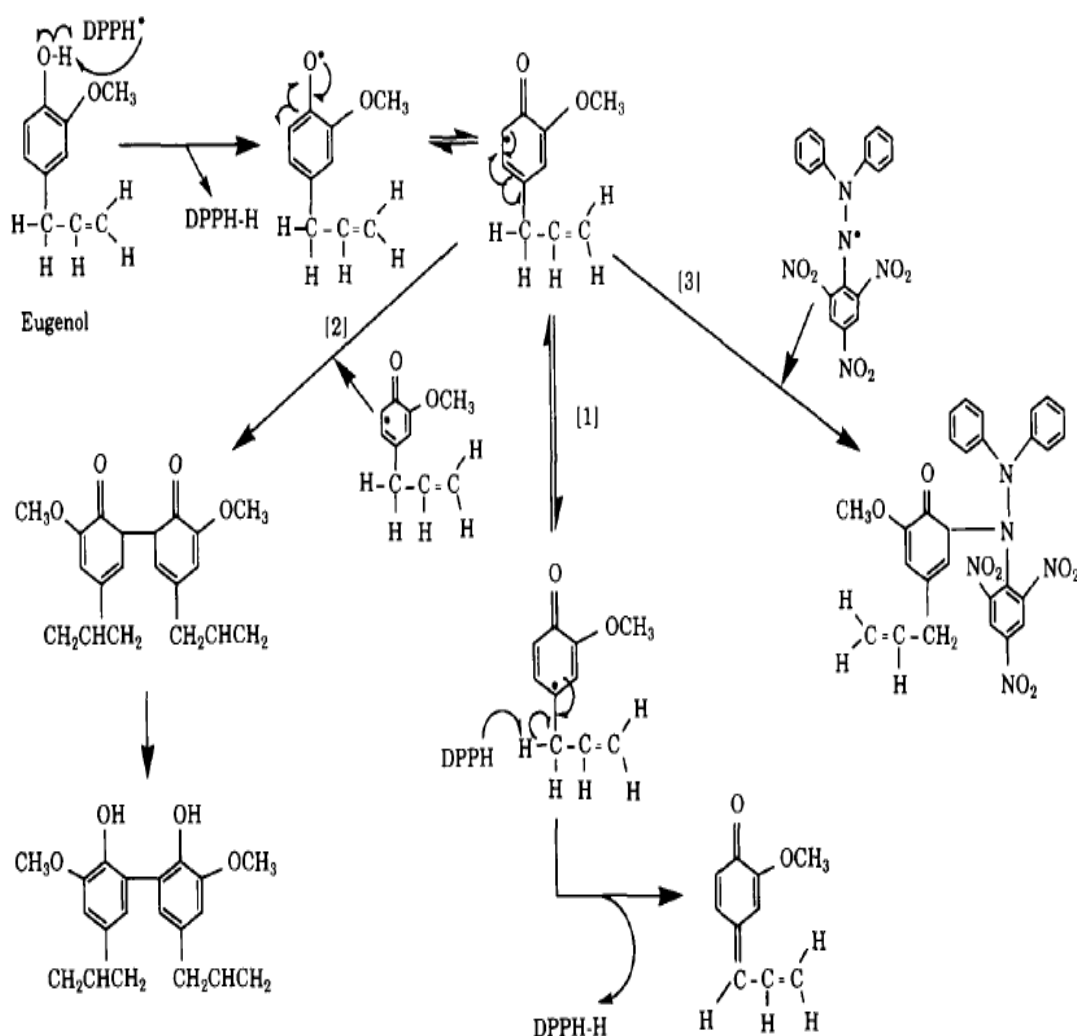


FIGURA 7- Mecanismo proposto para a reação DPPH com eugenol.

De acordo com Tomei e Salvador (2007) e Alves *et.al* (2010), o método DPPH baseia-se na capacidade deste em reagir com doadores de hidrogênio, e quando em contato com antioxidantes receber H^+ , sendo dessa forma reduzido. O DPPH, devido a sua absorbância, pode ser facilmente detectado por espectroscopia, por isso é considerado um dos métodos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante em sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, como flavonoides e terpenoides.

Uma forma de representar os resultados de método é calcular a quantidade de antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH presentes na solução, esse índice é conhecido com EC_{50} . Nesse cálculo, quanto menor o valor de EC_{50} apresentado pelo extrato, menor quantidade do extrato será necessário para reduzir a metade do radical e maior será a atividade antioxidante (LIMA, 2008).

3 METODOLOGIA DA PESQUISA

3.1 Coleta da espécie

As amostras de folhas foram coletadas em hortas e residências no município de Itumbiara – GO, respectivamente nos bairros Vila Vitoria I e Santos Dumont. As coletas foram realizadas nos meses de Setembro de 2011, Janeiro e Fevereiro de 2012.

3.2 Análise Química

As análises químicas foram realizadas no IFG- Câmpus Itumbiara e no laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. No IFG, foram realizadas as extrações e no laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia foram realizados os testes de atividade antioxidante.

3.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas inicialmente no mês de Setembro. Após a coleta, as folhas foram levadas ao Laboratório de Química do IFG- Câmpus Itumbiara e colocadas para secar em uma estufa à temperatura de 36°C e deixadas por cerca de 76 h. Após isso, foram trituradas, pesadas e condicionadas em béqueres plásticos vedados com parafilme em freezer.

As amostras coletadas nos meses de janeiro e fevereiro de 2012 foram levadas ao Laboratório do IFG- Câmpus Itumbiara, onde foram cortadas, pesadas e de imediato levadas para extração.

3.4 Determinação de umidade

Para determinação de umidade, colocou-se três amostras de folhas em uma estufa por aproximadamente 24 h a uma temperatura de 105,0°C (Estufa de esterilização e secagem-DL-SE). Após esse tempo, as amostras foram pesadas e calculou-se a umidade por diferença de peso (massa inicial – massa final). O teor de umidade foi expresso em %.

3.5 Extração

3.5.1 Extração por hidrodestilação

A extração por hidrodestilação foi realizada pelo aparelho Clevenger, nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2012 com a utilização de folhas frescas. Foi adicionado em um balão de fundo redondo de 500 mL, 50 g de folhas e cerca de 250 mL de água destilada e levados a ebulição. Essa extração foi deixada por aproximadamente 8 horas. O óleo essencial arrastado pela água foi recolhido em um funil de separação e adicionado diclorometano para separação do óleo e água. O óleo e o solvente foram recolhidos em pequenos frascos com tampa e armazenados em freezer até a utilização.

3.5.2 Extração por extrator de lipídeos

Em um primeiro momento, foram pesadas cerca de 5 g da folha seca, em uma balança analítica e colocada em um cartucho de celulose (Figura 8) próprio para este método. O cartucho juntamente com a amostra foi inserido em um extrator de lipídeos da Solab Científica, e a extração foi realizada com três (03) solventes, hexano, etanol e água, em sequência. Depois, a extração foi realizada com aproximadamente 5 g de folhas frescas do mesmo modo da primeira. O tempo necessário para cada extração foi de aproximadamente 9 horas. O extrato recolhido foi separado do solvente por rotoevaporação, condicionado em frascos com tampa e armazenados em freezer até a utilização.



FIGURA 8- Suporte com cartucho de celulose

3.5.3 Extração por Infusão.

Para extração por infusão, foram colocados em um béquer 100g de folhas secas com 250 mL de água destilada e em outro a mesma quantidade de folhas em 250 mL de etanol e tampadas com vidro de relógio vedado por parafilme, essa mistura foi deixada em extração por sete dias e então foi filtrada e rotoevaporada para separação do solvente.

3.6 Atividade antioxidante e cálculo de CE_{50}

A atividade antioxidante foi determinada através do radical livre estável 2,2-di(4-t-octilfenil)-1-picrihidrazila (DPPH[•]) seguindo o método descrito por Lima (2008). Preparou-se uma solução de DPPH, 40 µg/ mL em metanol, construindo-se uma curva analítica com diferentes concentrações (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 µg/mL).

Para quantificação dos extrativos solúveis, 1,00 mL de cada extrato foi recolhido e seco num frasco calibrado a 105 °C, durante 6 horas em estufa e depois, resfriado à temperatura ambiente em dessecador e pesado. Os extratos foram diluídos em metanol nas concentrações de 600, 480, 360, 240, 120 e 60 µg/mL (TABELA 1). Para avaliar a atividade antioxidante foram colocados 0,3 mL de cada concentração das amostras e 2,7 mL da solução previamente preparada de DPPH em tubos de ensaio em duplicata. Foi feito um branco nas mesmas condições, com todos os reagentes, exceto a amostra. Posteriormente foram feitas as leituras a cada 15 minutos durante 1 hora no comprimento de onda de 517 nm, em um espectrofotômetro Shimatzu UV- 160 1 PC.

Tabela 1- Diluição dos extratos de *Ruta graveolens*.

Extratos de <i>Ruta graveolens</i>*		
	solução 100%	metanol
100%	0,5 mL	
80%	0,5 mL	0,125 mL
60%	0,5 mL	0,33 mL
40%	0,5 mL	0,75 mL
20%	0,5 mL	2,00 mL
10%	0,5 mL	4,5 mL

* Solução preparada a partir da diluição do extrato inicial

Seguindo ainda a metodologia de Lima (2008), para obtenção do CE_{50} (concentração de inibição de 50% do DPPH), calculou-se a porcentagem de DPPH remanescente, empregando a equação 1:

$$\% \text{ DPPHrem} = \{[\text{DPPH}] \text{ am} / [\text{DPPH}] \text{ bran}\} * 100 \quad \textbf{(equação 1)}$$

Em que:

[DPPH] am: concentração de DPPH na concentração avaliada (extrato)

[DPPH] bran: concentração de DPPH no branco (todos os reagentes exceto a amostra)

Para obter-se a porcentagem de DPPH inibido pelas amostras, utilizou-se a equação 2:

$$\% \text{ I} = 100 - \% \text{DPPH REM} \quad \textbf{(equação 2)}$$

E para obtenção da CE_{50} , plotaram-se os valores de %IDPPH versus as concentrações das amostras analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi feita por diferença de peso. As folhas de arruda apresentaram um teor de umidade, em porcentagem, de $72,50 \pm 0,59$ %.

4.2 Extrações

4.2.1 Clevenger

Nas primeiras extrações com o Clevenger, em que as amostras com cerca de 50 g de folhas foram deixadas em refluxo por aproximadamente 2 horas, conforme descrito por Silva *et.al* (2010) não foi possível visualizar com nitidez o óleo essencial, que, de acordo com os mesmos autores possui cor amarelo-esverdeado. Nas extrações seguintes, em que as amostras com as mesmas quantidades de folhas foram deixadas no processo de extração por cerca de 8 horas, foi possível medir 0,1 mL de óleo essencial, com a cor mencionada acima. Foi utilizado o solvente diclorometano, que é miscível em óleo e imiscível em água para separar o óleo essencial e depois foram acondicionados em baixa temperatura para evitar a evaporação, pois tanto o óleo quanto o solvente são caracterizados por serem muito voláteis.

4.2.2 Extração por extrator de lipídeos

Nas extrações pelo extrator de lipídeos foram obtidos os extratos hexanólico, alcoólico e aquoso das folhas secas e frescas de *Ruta graveolens*. Na extração das folhas frescas com hexano, não foi possível quantificar os extrativos, devido ao alto teor de umidade. Pois segundo Dias et al.(2004) a secagem afeta sobremaneira o rendimento e a composição química das espécies, especialmente as aromáticas por possuírem substâncias muito voláteis, que são facilmente perdidas devido à variação de temperatura. A secagem das plantas minimiza a perda de princípios ativos e retarda a deterioração em decorrência da redução da atividade enzimática, permitindo a conservação das plantas por um período maior e um melhor rendimento extrativo (COSTA *et.al*, 2005).

4.2.3 Infusão

A infusão alcoólica e aquosa foi realizada com as folhas secas devido à conservação pela atuação regressiva na ação enzimática e a maior quantidade de princípios ativos em relação à folha fresca (COSTA *et.al*, 2005). Os rendimentos dos extrativos por infusão foram inferiores a extração por extrator de lipídeos conforme é apresentado na tabela 2.

4.3 Quantificação dos extratos de *Ruta graveolens*

A tabela 2 apresenta o rendimento determinado para cada extração realizada, exceto para a extração com Clevenger, pois a quantidade de óleo obtida não permitiu sua quantificação. Possivelmente devido à época da colheita, que, ocorreu nos meses de Janeiro e Fevereiro. Segundo Toriane e Oliveira (2006), para o recolhimento e bom rendimento dessa essência é necessário que a colheita seja feita na época certa, em dezembro ou de abril a maio e antes da floração, pois em outro período o princípio ativo presente no óleo essencial estará em menor quantidade nas folhas e em maior quantidade nas sementes (TORIANE; OLIVEIRA, 2006).

Tabela 2- Quantificação dos extratos de *Ruta graveolens*

Rendimento dos extrativos de <i>Ruta graveolens</i>		
1	Extrato hexano- folha seca	670 µg/mL
2	Extrato alcoólico- folha seca	1260 µg/mL
3	Extrato aquoso- folha seca	3000 µg/mL
4	Extrato alcoólico- folha fresca	800 µg/mL
5	Extrato aquoso- folha fresca	4570 µg/mL
6	Infusão alcoólica	13170 µg/mL
7	Infusão aquosa	19833 µg/mL

4.4 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

A identificação das substâncias por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas não foi realizada devido a problemas técnicos com o cromatógrafo que seria utilizado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia. Contudo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica e entre os poucos trabalhos referentes à identificação dos compostos voláteis de *Ruta graveolens* por este método cromatográfico, destacam-se alguns com as respectivas composições encontradas no óleo essencial.

Os resultados obtidos por Silva *et.al* (2010) comprovam a eficácia do óleo quanto a atividade nematicida e apresentam a identificação de 50% dos componentes do óleo essencial, 2- nonanona; 2- decanona e 2- undecanona, que são os majoritários, pois equivalem a 92% da constituição química. Já Arruda et al. (2011) identificou 41 compostos, 13 cetonas, 12 terpenos, 5 alcoóis, 5 ácidos, 3 ésteres, 2 aldeídos e 1 fenólico, dentre esses, as cetonas 2- nonanona e 2- undecanona, apresentaram 54,7 e 23,7% da composição total do óleo essencial.:

Holanda et al.(2011), além de identificar os dois compostos majoritários citados por Silva et al (2010) e Arruda et al (2011), ainda atribui a eficácia da atividade larvicida e atividade antimicrobiana, comprovada por bioensaios realizados com o óleo essencial, a esses compostos metil-cetonas identificados (Figura 9).

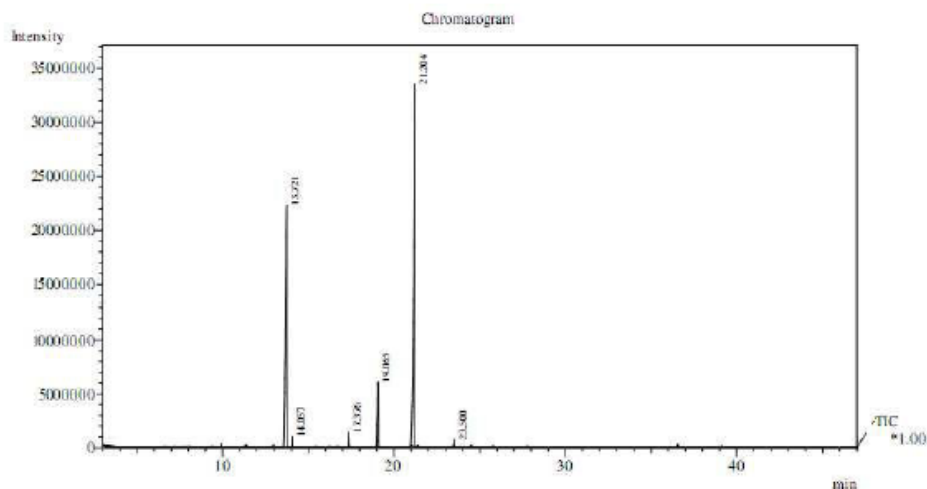


FIGURA 9- Cromatograma do óleo essencial de *Ruta graveolens*

4.5 Atividade antioxidante e cálculo de CE₅₀

A atividade antioxidante foi calculada pela inibição do radical DPPH, que segundo Lima (2008), mede a capacidade de consumo do radical livre (1,1- Difenil-2- picrilidrazila), de coloração púrpura, formando um radical estável e incolor pelo recebimento de átomos de hidrogênio radicalar e elétrons.

Para a análise da atividade antioxidante, foi construída uma curva de calibração do DPPH (Figura 10), que permite determinar a concentração desse radical em função do tempo da reação. Essas concentrações foram usadas para o cálculo da % de inibição do radical DPPH.

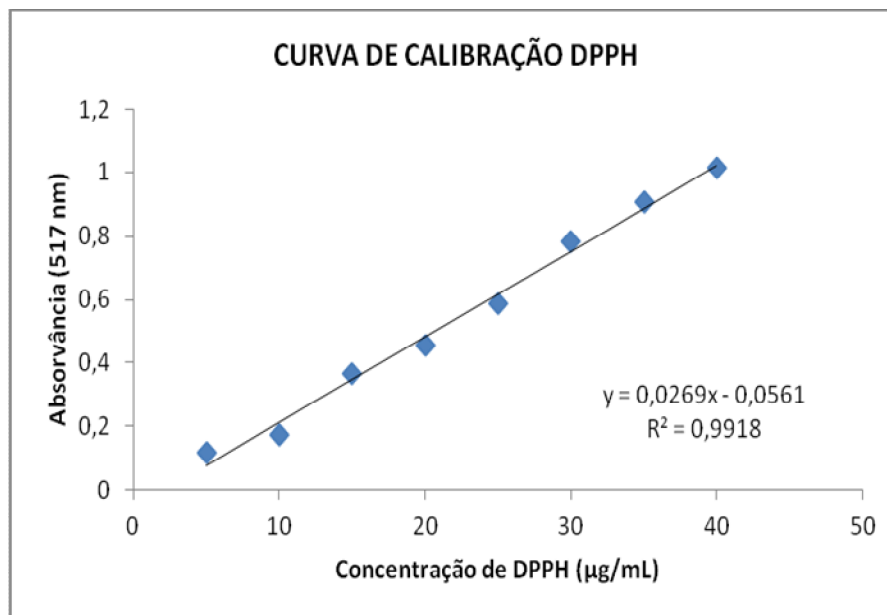


FIGURA 10- Curva de Calibração do DPPH

Os extratos analisados foram diluídos em metanol em concentrações de 600, 480, 360, 240, 120 e 60 $\mu\text{g/mL}$ e destas soluções foram retirados 0,3 mL de cada concentração, em duplicata, para reação com DPPH. Essas soluções foram cobertas por papel alumínio e manuseadas em baixa iluminação para evitar a degradação do DPPH e a cada 15 minutos eram submetidas à leitura no espectrofotômetro por 1 hora, conforme método utilizado por Lima (2008).

A figura 11 mostra a variação da coloração do DPPH, cada cor representa a intensidade da reação e consequentemente a atividade antioxidante em cada concentração. A solução de DPPH originalmente apresenta uma coloração violeta e quando em contato com uma substância antioxidante, que consegue sequestrar o radical DPPH, este muda a coloração para um tom amarelado (DUARTE- ALMEIDA, 2006).



FIGURA 11- Reatividade do radical DPPH com diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas secas de *Ruta graveolens*

Através dos resultados obtidos pela equação 2 (item 3.6 - metodologia), traçaram-se os gráficos das atividades antioxidantes em função do tempo para os extrativos de *Ruta graveolens* (Figuras 12-a, 13-a, 14-a, 15-a, 16-a, 17-a e 18-a). A partir das absorvâncias, traçaram-se os gráficos de consumo de DPPH em função das diferentes concentrações dos extratos (Figuras 12-b, 13-b, 14-b, 15-b, 16-b, 17-b e 18-b).

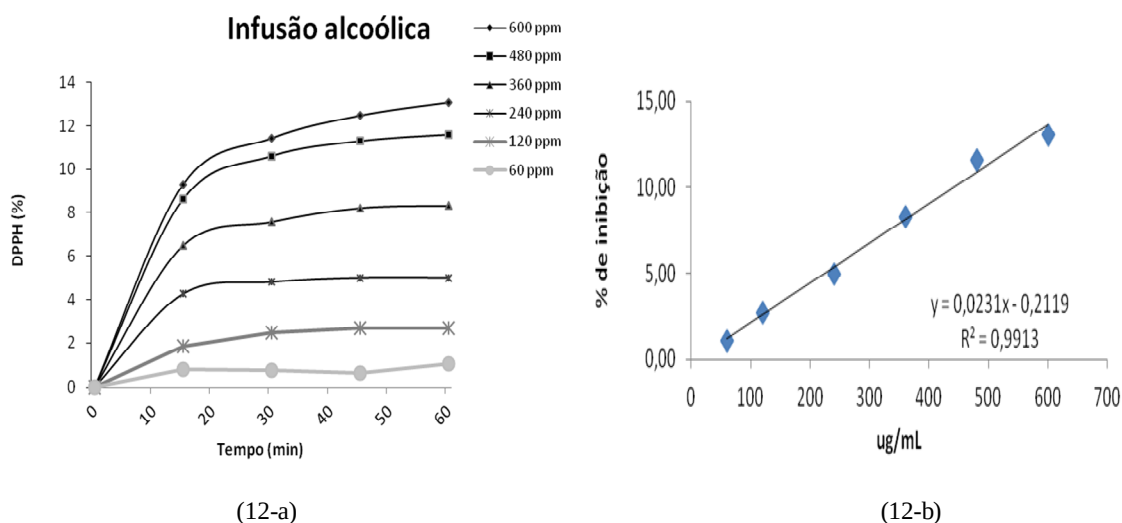


Figura 12 – (12-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens*, para infusão alcoólica; (12-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* para o extrato da infusão alcoólica.

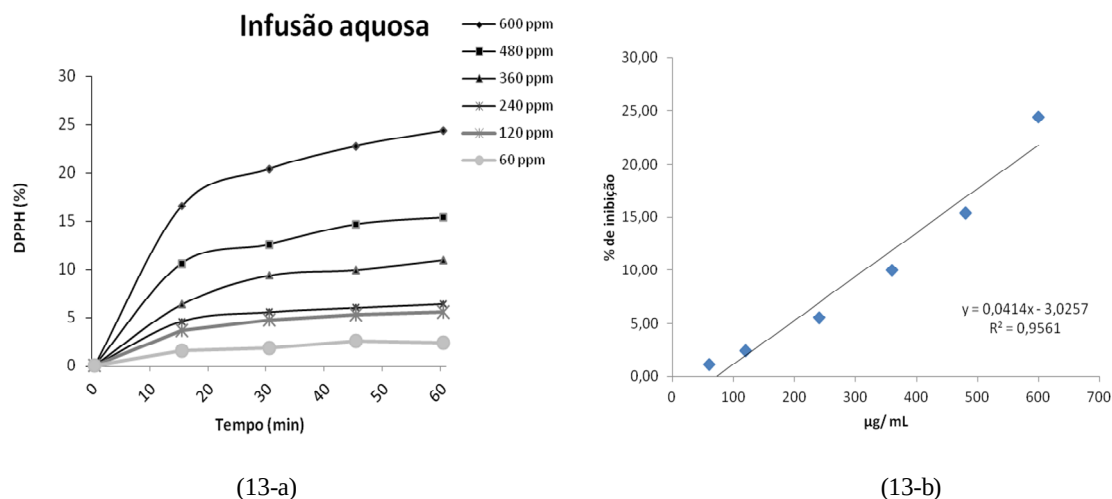


Figura 13 – (13-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens*, para infusão aquosa; (13-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* para o extrato da infusão aquosa.

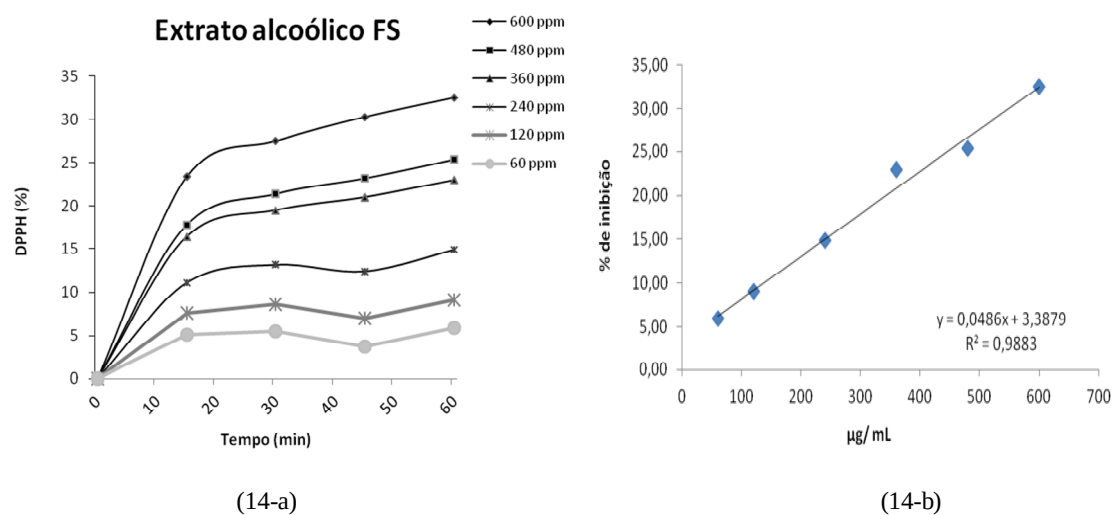


Figura 14 – (14-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens*, para o extrato alcoólico da folha seca; (14-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato alcoólico da folha seca.

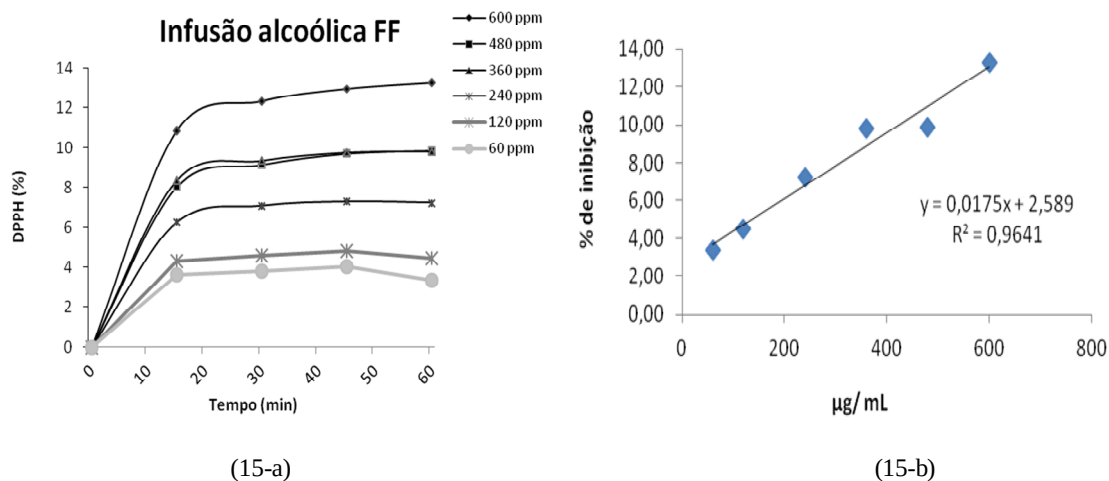


Figura 15 – (15-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato alcoólico da folha fresca; (15-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato alcoólico da folha fresca.

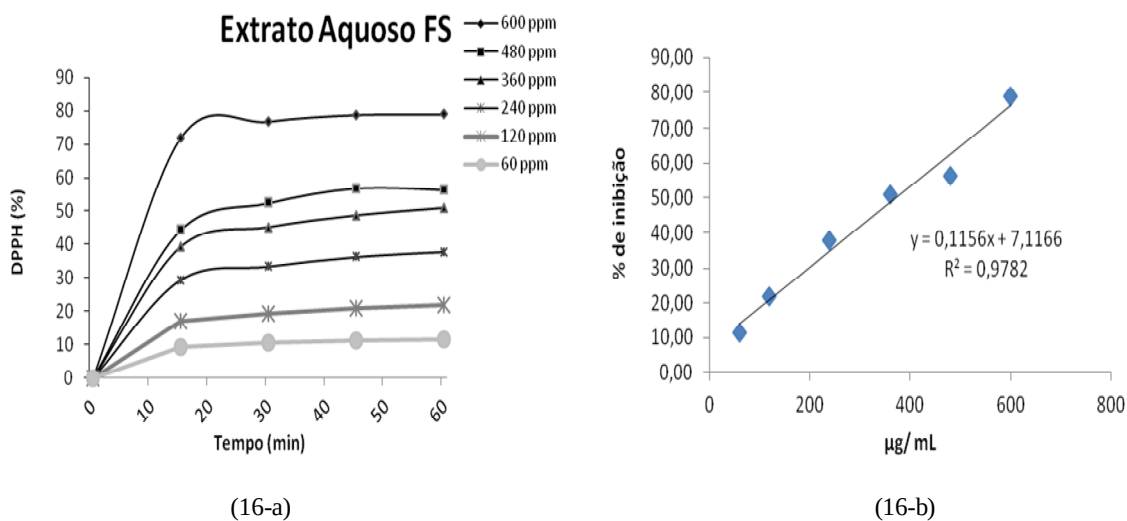


Figura 16 – (16-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato aquoso da folha seca; (16-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato aquoso da folha seca.

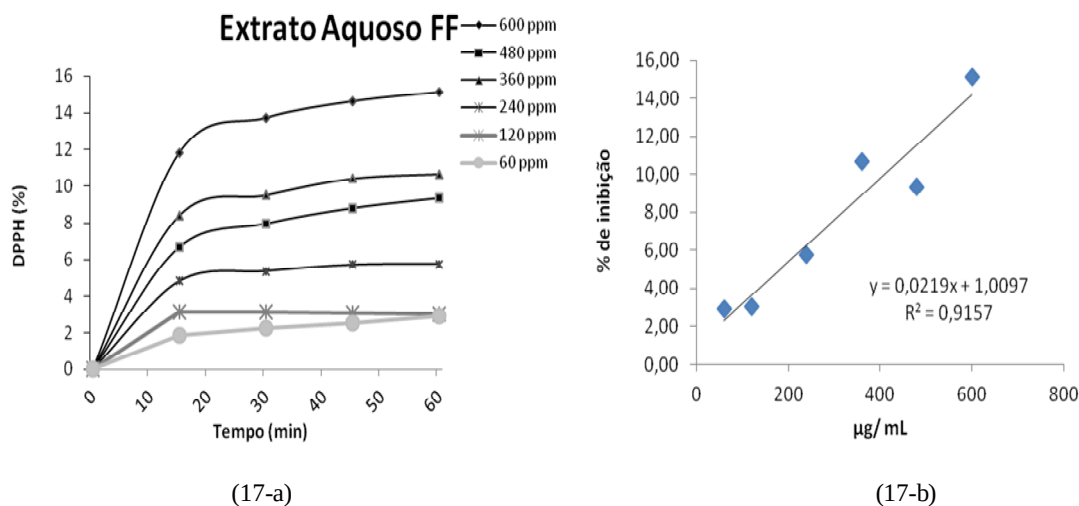


Figura 17– (17-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato aquoso da folha fresca; (17-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato aquoso da folha fresca.

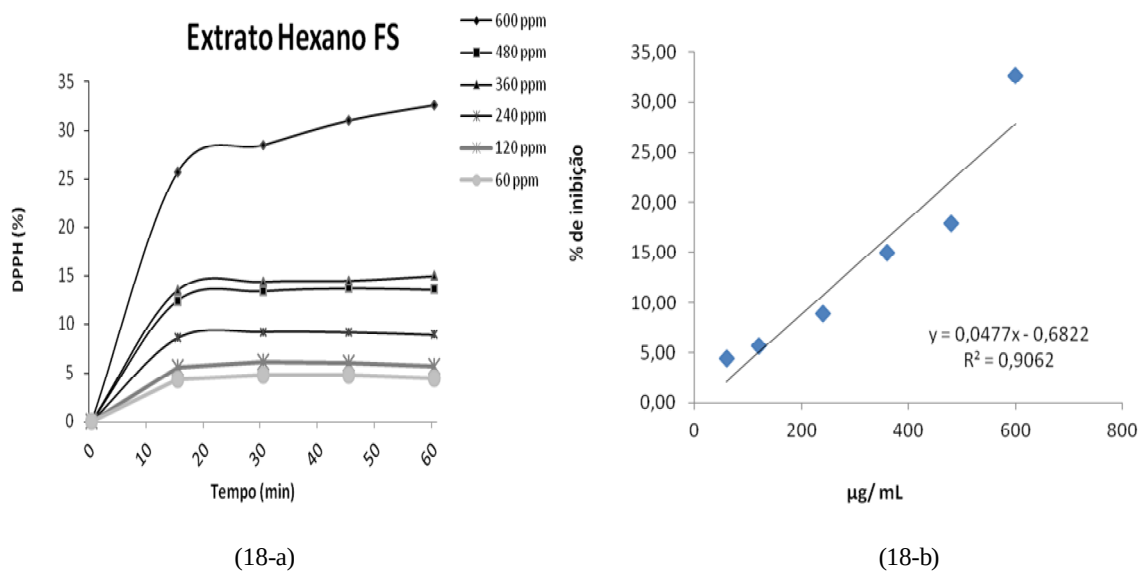


Figura 18 – (18-a) Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo em diferentes concentrações de *Ruta graveolens* para o extrato hexano da folha seca; (18-b) Gráfico da % de inibição de DPPH em função das diferentes concentrações da *Ruta graveolens* do extrato hexano da folha seca

Os resultados obtidos de cada amostra, pelas absorvâncias em cada tempo seguem na tabela 3.

Tabela 3- Valores da % DPPH remanescente, porcentagem de inibição e concentração inibitória de 50% dos radicais DPPH

% DPPH rem, % I e CI_{50} dos extratos de <i>Ruta graveolens</i> .			
	% DPPH _{rem}	%I	CI_{50}
1 Extrato hexano- folha seca	67,40	32,60	1062,52 µg/mL
2 Extrato alcoólico- folha seca	67,47	30,27	959,09µg/mL
3 Extrato aquoso- folha seca	21,02	78,83	370,9µg/mL
5 Extrato alcoólico- folha fresca	86,73	13,27	2709,2µg/mL
6 Extrato aquoso- folha fresca	84,89	14,62	2237,0µg/mL
7 Infusão alcoólica	86,92	13,08	2173, 67µg/mL
8 Infusão aquosa	75,62	24,38	1280,81 µg/mL

As equações utilizadas para o cálculo da porcentagem de DPPH remanescente, porcentagem inibitória de DPPH e concentração de inibição de 50% do DPPH (CE_{50}), estão expressas na metodologia, e foram respectivamente as equações 1 e 2.

A CE_{50} é o indicador de presença ou não de atividade antioxidante na amostra, de acordo com Chang *et al.* (2001), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} (concentração de inibição de 50% do DPPH) e maior a sua atividade antioxidante.

Os valores demonstrados na tabela anterior indicam que o extrato aquoso da folha seca apresentou o menor valor de CE_{50} , apresentando a maior atividade antioxidante dentre os extratos analisados. Os extratos aquosos apresentaram maior atividade antioxidante que os extratos alcoólicos, o mesmo foi observado para os extratos de folhas secas em comparação com as frescas.

A elevada atividade antioxidante das folhas secas, em detrimento às folhas frescas, pode ser explicada pelo melhor rendimento dos extratos, devido à redução da degradação enzimática e a consequente minimização das perdas de princípios ativos (COSTA *et al.*, 2005).

A tabela 4 apresenta a comparação dos valores de CE_{50} calculados para a folha de *Ruta graveolens* com outras plantas.

Tabela 4- Valores de CE_{50} da *Ruta graveolens* e do extrato de folhas de diferentes espécies.

Espécie	Nome popular	CE_{50} (μ g/ mL)		
		Álcool	Água	Hexano
<i>Pseudobombax</i> (LIMA, 2010)	Embiruçu	108,2		
<i>Eugenia uniflora</i> L (VICTORIA et al, 2011)	Amora		833,3	
<i>S. paniculatum</i> (RIBEIRO et.al, 2007)	Jurubeba	23,4	35,2	134,3
<i>Piper aleyreanum</i> (SILVA et al, 2009)	Pimenta longa	48,9		
<i>Piper marginatum</i> (SILVA et al, 2009)	Pimenta do mato	44,8		
<i>Piper dilatatum</i> (SILVA et al, 2009)	Pau de junta	330,6		
<i>Mimosa paraibana</i> (NUNES et al, 2008)	Maricá			73,1
<i>Ginkgo biloba</i> (VICENTINO; MENEZES, 2007)	Nogueira do Japão		38,9	
<i>Ruta graveolens</i> - Folha Fresca	Arruda	2709,2	2237	
<i>Ruta graveolens</i> - Folha Seca	Arruda	959,1	370,9	1139,3

Dentre as plantas apresentadas, o extrato alcoólico (folha fresca e seca) e o extrato hexano (folha seca) de *Ruta graveolens* apresentaram atividade antioxidante bastante inferior em relação às outras, já o extrato aquoso (folha seca) demonstrou uma boa atividade antioxidante sendo superior em relação à *Eugenia uniflora* L.

5 CONCLUSÃO

Verificou-se que as extrações aquosas atingiram um melhor rendimento de extratos em relação aos solventes álcool e hexano, devido a interação polar do grupo carbonila, presente nas cetonas, componentes majoritários da *Ruta graveolens*.

Também foi possível analisar que as folhas frescas apresentaram um rendimento inferior e conseqüentemente menor atividade antioxidante, devido ao alto teor de umidade, que favorece a perda de princípios ativos pela volatilização devido à variação de temperatura.

A espécie apresentou atividades antioxidantes confirmadas através dos cálculos de CE_{50} e comparadas com outras espécies já analisadas. O extrato aquoso da folha seca foi o que melhor solubilizou substâncias com princípios antioxidantes, apresentando o menor valor de concentração de inibição de 50% de DPPH.

Outros estudos poderão ser realizados com óleos essenciais e extratos desta planta, afim de comparar a atividade antioxidante, por diferentes métodos.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, Clayton Q; DAVID, Jorge M; DAVID, Juceni P; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARRUDA, Neusa P; CASTRO, Julio P; REZENDE, Claudia M. **Caracterização da fração volátil do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.** 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T1398-1.pdf>. Acesso em: 08/04/2012.

BALMÉ, François. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus. 2004.

BERNARDI, Ana Paula Machado. **Análise Química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.** 2007, Tese (doutorado)- Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

BRAND- WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm wiss.u. technol**, v.28, p.25-30, 1995.

BRUNO, Paulo Roberto. **Bioeletrografia em plantas de *Ruta graveolens* tratadas com duas homeopatias.** 2007. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós- graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CASTELO-BRANCO, Vanessa Naciuk; TORRES, Alexandre Guedes. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, Campinas, vol. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

CHANG, Shang-Tzen; WU, Jyh-Horng; WANG, Sheng-Yang; KANG, Pei-Ling; YANG, Ning-Sun; SHYUR, Lie-Fen.; Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3420-3424, 2001.

CONEGLIAN, Sabrina Marcantonio, LIMA, Beatriz da Silva, SILVA, Lorryny Galoro, LAZZARI, Claudia Mara, SERRANO, Román David Castañeda, TONELLO, Cleiton Luiz. Utilização de antioxidantes nas rações. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 5, 2011.

COOPER, Kenneth H. **Revolução antioxidante**. Rio de Janeiro: Record, 1995.

COSTA, Larissa. C. B.; CORRÊA, Ricardo. M.; CARDOSO, Julio. César. W.; PINTO, José. Eduardo. B. P.; BERTOLUCCI, Suzan. K. V.; FERRI, Pedro. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

DAVID, Jorge M; DAVID, Juceni P; BARREIROS, André L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

DIAS, Ayres Guimarães; COSTA, Marco Antonio da; GUIMARÃES, Ivo Canesso. **Guia prático de química orgânica técnicas e procedimentos: aprendendo a fazer**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício; SANTOS, Ricardo José dos; GENOVESE, Maria Inês; LAJOLO, Franco Maria. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e métodos de sequestro de radicais DPPH. **Ciência, tecnologia. E alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p. 446-452, 2006.

FETROW, Charles W; AVILA, Juan R. Manual de **medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CECHINE FILHO, Valdir; YUNES, Rosendo A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n. 1, 1998.

HALLIWELL, Barry. Free radicals in Biology and Medicine. **Journal of free radicals in biology and medicine**, v.1, p.331-334, 1999.

LIMA, Rafaela Karin de. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H. B. K.: caracterização química, atividade biológica e antioxidante**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós- graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2008.

MIGUEL, Marilis Dallarmi; MIGUEL, Obdúlio Gomes. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999.

NUNES, Xirley P; MESQUITA, Rafael F; SILVA, Davi A; LIRA, Daysianne P; COSTA, Vicente C. O; SILVA, Marianna V. B; XAVIER, Aline L; DINIZ, Margareth F. F. M; AGRA, Maria de Fátima. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**. João Pessoa, v.18, 2008.

ORLANDA, José Fábio França; SOUZA, Antônio Gouveia de; FILHO, Victor Elias M; NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. **Atividade larvívica do óleo essencial de arruda (*Ruta graveolens* Linnaeus) contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0594-1.pdf>. Acesso em: 08/04/2012.

RAMALHO, Valéria Cristina.; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RIBEIRO, Sarila Resende; FORTES, Carlos Camisa; OLIVEIRA, Sarah Cristina Caldas; CASTRO, Carlos Frederico de Souza. Avaliação da atividade antioxidante de *solanum paniculatum* (solanaceae). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. Umuarama, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

RIVIOLI, Joice; BONFIM, Jessica Sanches; BITTENCOURT, Nilza de Lucas Rodrigues. **Mitos e realidades no uso de plantas medicinais**. Encontro internacional de produção científica Cesumar. Paraná, 2007. Disponível em: http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2007/anais/joice_rivoli.pdf. Acesso em: 11/12/2011.

SALVADOR, Mirian; HENRIQUES, João A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004.

SANTOS, Alberdan Silva; ALVES, Sérgio de Mello; FIGUEIRÊDO, Francisco José Câmara; ROCHA NETO, Olinto Gomes da. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Comunicado técnico 99. Belém. Amazônia Oriental: Embrapa, 2004.

SILVA, Breno Marques; MARQUES, Ednamara Batista Vasconcelos. **Os remédios florais de minas**. Belo Horizonte: Luz azul cultural, 1992.

SILVA , Francisca Gleiciane Eloi da; MENDES , Francisco Rogênio da Silva; CAVALCANTE, Fábio Lima; BARBOSA, Francisco Geraldo; ASSUNÇÃO, João Carlos da Costa. **Composição Química e atividade nematocida do óleo essencial de Ruta graveolens (arruda)**. V CONNEPI, 2010. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceara. Quixada, 2010.

SILVA, Joyce Kelly do R. da; GIRARD, Cássia Karina T; ANDRADE, Eloísa Helena A; GUIMARÃES, Elsie F; MAIA, José Guilherme. **Polifenóis totais e capacidade antioxidante de extratos de espécies de Piper (Piperaceae) com ocorrência na Serra de Carajás, PA**. 32º encontro anual da sociedade brasileira de Química. Fortaleza, 2009. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1259-1.pdf>. Acesso em: 09/04/2012.

TOMEI, Rafael Rodrigues; SALVADOR, Marcos José. **Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais**. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, Paraíba, 2007. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00322_01C.pdf. Acesso em: 21/02/2012.

TORIANE, Ana Lúcia Trinquinato; OLIVEIRA, Lourenço de. **Ruta graveolens L.: O conhecimento e suas particularidades**. 2006. 70p. Monografia de especialização-Faculdades Integradas “espitira”. Curitiba, 2006.

TOVANI BENZAQUEN INGREDIENTES. Os antioxidantes. **Food Ingredientes Brasil**, n.6, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 14/12/2011.

VICENTINO, Amanda R. R; MENEZES, Fábio de Sousa. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista brasileira de farmacognosia**. João Pessoa, v.17, 2007.

VICTORIA, Francine Novack; SAVEGNEGO, Lucielli; LENARDÃO, Eder João. Atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de Pitanga. XIII ENPOS. Londrina, 2011. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/enpos/2011/anais/pdf/CB/CB_00360.pdf. Acesso em: 09/04/2012.

ZOPPI, Cláudio César. Radicais Livres, antioxidantes, estresse oxidativo e atividade física. **Diálogos possíveis**, v. 3, n.1, p. 185- 195, 2004.