

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**Gabrielly Soares Ferreira**

**Desenvolvimento de metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d'anta  
(*Dimorphandra mollis* Benth.)**

**Montes Claros**

**2023**

**Gabrielly Soares Ferreira**

**Desenvolvimento de metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d'anta  
(*Dimorphandra mollis* Benth.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Orientador:** Prof. Dr. Ernane Ronie Martins

Montes Claros  
Fevereiro de 2023

Ferreira, Gabrielly Soares.

F383d  
2023      Desenvolvimento de metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d'anta (Dimorphandra mollis Benth.) [manuscrito] / Gabrielly Soares Ferreira. Montes Claros, 2023.  
33 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Ernane Ronie Martins

Banca examinadora: Flaviano Oliveira Silvério, Lourdes Silva de Figueiredo, Ernane Ronie Martins.

Inclui referências: f. 18-20; 30-31.

1. Dimorphandra mollis - Teses. 2. Flavonoides - Teses. 3. Rutina - Teses. I. Martins, Ernane Ronie. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 634.1

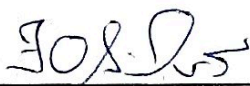
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às 8:00 horas, sob a Presidência do Professor Ernane Ronie Martins, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação do Professor Flaviano Oliveira Silvério, D. Sc. (UFMG/ICA) e da Profa. Lourdes Silva de Figueiredo, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, presencialmente, a Banca de Defesa de Dissertação de **GABRIELLY SOARES FERREIRA**, aluna do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. Após avaliação da defesa de Dissertação da referida aluna, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa de Dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d’anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)”**, sendo a aluna considerada **aprovada**. E, para constar, eu, Professor Ernane Ronie Martins, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

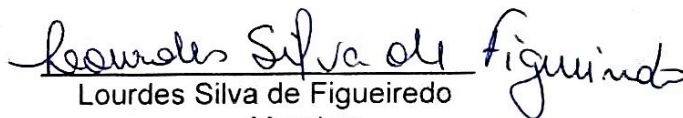
OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 65 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

**Art. 65 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.**

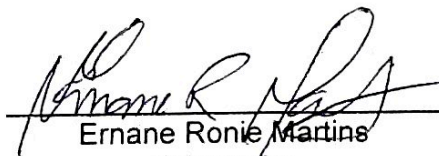
Montes Claros, 28 de fevereiro de 2023.



Flavião Oliveira Silvério  
 Membro



Lourdes Silva de Figueiredo  
 Membro



Ernane Ronie Martins  
 Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por trilhar meu caminho e me dar forças nessa caminhada.

A minha mãe Maria Edimere, fonte de inspiração e coragem e meu padrasto Valmiro, pelo apoio e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós, em especial, Escolástica por toda ajuda e oração.

Aos meus irmãos Isabelly e Vinícius e à minha afilhada Olivya, que sempre estiveram ao meu lado, dando apoio e conforto.

A Vinícius, meu companheiro de vida, pela compreensão, incentivo e amor diante das dificuldades.

Ao meu orientador Ernane, por todos os ensinamentos, dedicação e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPCA, em especial, Francine, Karoline e Emanuelle, pelo companheirismo, amizade e conhecimento compartilhado.

Ao instituto de Ciências agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade e por toda infraestrutura concedida para realização do mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa.

As instituições de apoio à pesquisa CAPES, CNPq, Fapemig e ao PET-Agronomia.

Aos membros da banca de avaliação pela disponibilidade e contribuição.

A todos familiares, professores, servidores e amigos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a concretização desse trabalho.

Muito Obrigada!

**Desenvolvimento de metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d'anta  
(*Dimorphandra mollis* Benth.)**

**RESUMO**

A fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.), espécie nativa do Cerrado é uma das plantas mais utilizadas pela indústria farmacêutica para obtenção de rutina. A extração de rutina pela indústria, a partir de matrizes vegetais, faz uso de solventes orgânicos. No entanto, o uso desses solventes traz riscos à saúde e ao meio ambiente. A utilização de solventes menos tóxicos e de menor custo é uma alternativa para o processo, pois além de preservar a saúde, contribui para o equilíbrio do ecossistema. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma técnica sustentável de extração/purificação de flavonoides dos frutos da fava-d'anta com o mínimo de impacto ambiental. O método para obtenção do extrato rico em flavonoides foi fundamentado em etapas que consistem na separação, purificação e cristalização da rutina. A partir de ensaios preliminares foi possível estabelecer reagentes (sais e solventes) com baixo custo, toxicidade e resíduo para o processo de extração. Os frutos da fava-d'anta foram coletados, secos e armazenados até o momento do processo. Em seguida, foram desintegrados e submetidos ao processo de extração à quente, separação e precipitação de impurezas com posterior filtração. A última etapa do processo consistiu na cristalização da rutina por meio de ajuste do pH da solução. Os extratos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão múltipla. A partir da técnica proposta foi possível obter cerca de 16,47% de extrato enriquecido em flavonoides (39,55% de rutina) a partir de frutos imaturos e 11,14% (20,40% de rutina) a partir de frutos maduros de fava-d'anta. Considerando os aspectos apresentados, conclui-se que foi possível obter processo de extração aquoso de flavonoides da fava d'anta.

**Palavras-chave:** Extrativismo. Flavonoides. CLAE-DAD.

## **Development of rutin extraction methodology in fruits of fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**

### **ABSTRACT**

Fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.), a native species from the Cerrado, is one of the plants most used by the pharmaceutical industry to obtain rutin. The extraction of rutin by the industry, from plant matrices, makes use of organic solvents. However, the use of these solvents poses risks to health and the environment. The use of less toxic and lower cost solvents is an alternative for the process, as in addition to preserving health, it contributes to the balance of the ecosystem. Thus, the objective of this work was to develop a sustainable technique for the extraction/purification of flavonoids from fava-d'anta fruits with a minimum of environmental impact. The method for obtaining the extract rich in flavonoids was based on steps that consist of the separation, purification and crystallization of rutin. From preliminary tests it was possible to establish reagents (salts and solvents) with low cost, toxicity and residue for the extraction process. The fava-d'anta fruits were collected, dried and stored until the moment of the process. Then, they were disintegrated and subjected to the hot extraction process, separation and precipitation of impurities with subsequent filtration. The last stage of the process consisted of the crystallization of the rutin by adjusting the pH of the solution. The extracts obtained were submitted to analysis by high performance liquid chromatography and the data obtained were submitted to multiple regression analysis. From the proposed technique, it was possible to obtain about 16.47% of extract enriched in flavonoids (39.55% of rutin) from immature fava-d'anta fruits and 11.14% (20.40% of rutin) from ripe fruits. Considering the aspects presented, it is concluded that it was possible to obtain a process of aqueous extraction of flavonoids from fava d'anta.

**Keywords:** Extractivism. Flavonoids. CLAE-DAD.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Planta jovem de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth) (A), frutos imaturos (B) e maduros (C) na cidade de São João da Lagoa – MG..... 13
- Figura 2- Estrutura química da subclasse flavonol (A) e das moléculas de quercetina (B) e rutina (C) pertencentes a esse grupo..... 14
4. ARTIGO
- Figura 1. Esquema representativo das etapas do processo de obtenção de extrato enriquecido de flavonoides de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth..... 23
- Figura 2. Superfície de resposta para rendimento de rutina (g) em função de doses de borato de sódio e cloreto de sódio aplicados no processo de extração de flavonoides em 50 g de frutos imaturos de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.)..... 27
- Figura 3. Cromatogramas e espectros de absorção na região do ultravioleta (350 nm) do padrão de rutina (A) e dos extratos metanólicos de frutos imaturos (B) e maduros (C) de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.) analisados por CLAE-DAD..... 28
- Figura 4. Cromatogramas e espectros de absorção na região do ultravioleta (350 nm) dos extratos enriquecidos obtidos a partir de frutos imaturos (A) e maduros (B) analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos..... 29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Patentes relacionadas a métodos de extração de rutina disponíveis em bases de dados..... 16

### 4. ARTIGO

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas nas análises..... 25

Tabela 2. Equação de regressão obtida a partir da análise do padrão de rutina (pureza > 95%, Sigma-Aldrich), em faixa linear de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) por CLAE –DAD..... 25

Tabela 3. Rendimento da extração de rutina, a partir de frutos verdes de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.), em função das doses de borato de sódio e cloreto de sódio..... 26

Tabela 4. Análise de regressão para rendimento de rutina em frutos de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.)..... 27

Tabela 5. Teor médio de rutina dos frutos imaturos e maduros de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.) coletados em São João da Lagoa – MG..... 29

Tabela 6. Rendimento do extrato enriquecido e de rutina obtidos a partir de frutos imaturos e maduros (secos) de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.)..... 30

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS .....	11
2.1. Objetivo Geral .....	11
2.2. Objetivos Específicos .....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
3.1. Fava-d'anta .....	12
3.2. Flavonoides .....	13
3.3. Extração de rutina .....	14
3.4. Referências .....	18
4. ARTIGO.....	21
4.1. Artigo 1 - Método de extração aquosa de flavonoides de frutos de fava-d'anta ( <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.).....	21
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

O extrativismo de plantas medicinais no Cerrado é uma forma de sobrevivência para comunidades locais, que em alguns casos tem essa atividade como fonte alternativa de renda. Entre as espécies com potencial de exploração econômica destaca-se a fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.). Espécie rica em bioflavonoides, dos quais se destacam a rutina e a quercetina, sendo seus frutos uma das principais fontes de rutina para abastecimento da indústria farmacêutica (NUNES *et al.*, 2012; FILIZOLA, 2013).

A obtenção dos frutos de fava-d'anta ocorre exclusivamente pela atividade extrativista. O interesse comercial pelos bioflavonoides presentes nos frutos não garante o equilíbrio entre os valores de comercialização pelas indústrias e o repassado para os extrativistas (COSTA *et al.*, 2022). Dessa forma, as indústrias retiram matérias-primas a baixo custo, sem que haja retornos para a população local, principalmente nas regiões de ocorrência da espécie onde as dificuldades socioeconômicas são evidentes (NUNES *et al.*, 2012).

Dentre os elos frágeis da cadeia de valor dos frutos da fava-d'anta, destacam-se a falta de políticas públicas, incentivos e tecnologias para plantios. Estudos apontam que os procedimentos de coleta, em sua maioria danificam a espécie, no curto prazo, pelo uso de técnicas inapropriadas e, em longo prazo, pela remoção de sementes que possibilitariam novas plantas (NUNES *et al.*, 2012). A alta dependência da extração da fava-d'anta para a subsistência das famílias extrativistas e o preço pago pelo quilo do recurso fazem com que os catadores não respeitem os limites de coleta e realizem superexploração da espécie para obter maiores quantidades do recurso (DE ALCÂNTARA; LUCENA; CRUZ, 2021).

Além dos problemas mencionados, a extração de rutina pela indústria, a partir de matrizes vegetais, é feita com utilização de solventes orgânicos, como o metanol e o etanol (CHUA, 2013). No entanto, o uso desses solventes traz riscos à saúde e ao meio ambiente, por sua toxicidade. A utilização de solventes menos tóxicos e de menor custo é uma alternativa para o processo, pois além de preservar a saúde, contribui para o equilíbrio do ecossistema (LEITE *et al.*, 2020).

Diante do exposto, este estudo foi realizado com o intuito de desenvolver um método sustentável de extração de rutina dos frutos de fava-d'anta, a fim de agregar valor à matéria prima, bem como estabelecer uma técnica alternativa na extração de bioflavonoides de amostras vegetais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver metodologia de extração de rutina em frutos de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) empregando água.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Desenvolver método de produção de extrato concentrado em flavonoides;
- Analisar o perfil do extrato de flavonoides obtido por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar o rendimento de extração de flavonoides em frutos imaturos e maduros.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Fava-d'anta

Pertencente à família Fabaceae, as espécies do gênero *Dimorphandra* são conhecidas em diferentes regiões do Brasil como fava-d'anta, favela, falso-barbatimão, barbatimão-de-folha-miúda, favanta ou faveira (SILVA, 2016). São relatadas duas espécies de interesse comercial pelas características químicas de seus frutos, *D. gardneriana* Tul. e *D. mollis* Benth., típicas do Cerrado e encontradas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2008; PACHECO *et al.*, 2010).

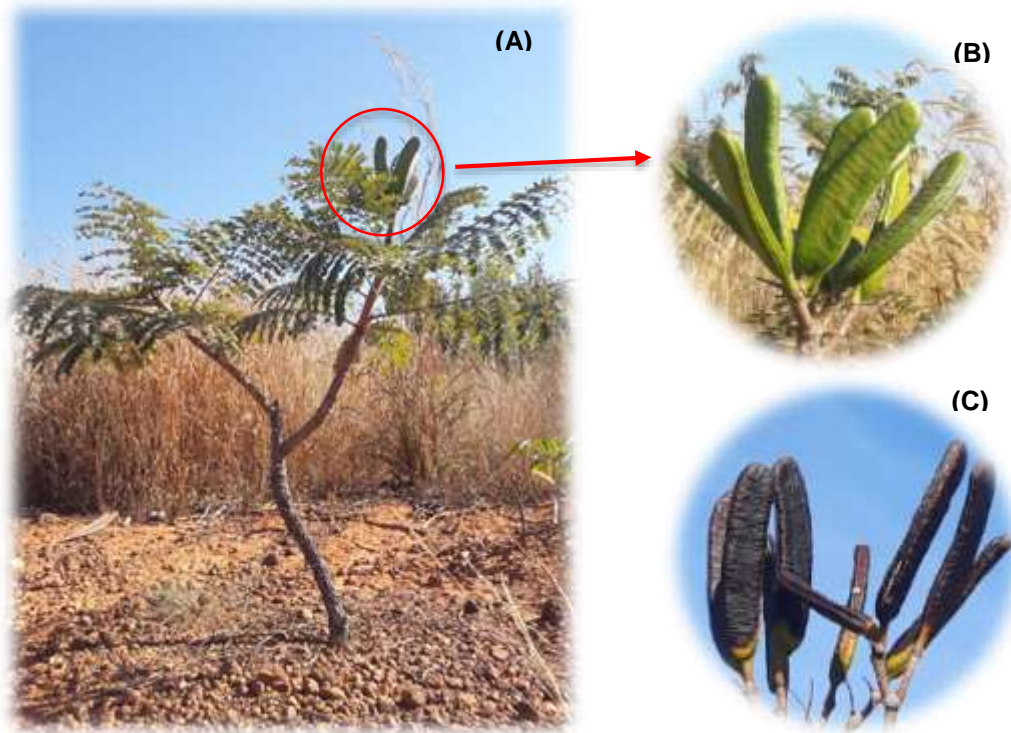
A fava-d'anta apresenta bioflavonoides em seus frutos, com destaque para a rutina e a quercetina, sendo uma das principais fontes para o mercado de cosméticos e fitofármacos (FILIZOLA, 2013). A obtenção dessa matéria prima depende da prática do extrativismo, sendo uma alternativa socioeconômica para comunidades locais, que tem essa atividade como fonte de renda (GOMES; GOMES, 2000; NUNES *et al.*, 2012). O preço de venda descrito na literatura é em média R\$ 0,43 por kg de frutos verdes e R\$ 0,78 por kg de frutos secos, sendo o último preferido pelos compradores (COSTA *et al.*, 2022).

Além da rutina e da quercetina da fava-d'anta, extrai-se também a ramnose, aditivo alimentar utilizado pela indústria alimentícia como aromatizante (GOMES; GOMES, 2000). Ainda, pode-se extrair galactomanana a partir do endosperma das sementes, com potencial para ser utilizada como emulsificante, estabilizante e espessante pela indústria (CUNHA, 2009; PANEGASSI; SERRA; BUCKERIDGE, 2000). Diante da sua importância comercial e social, *D. mollis* está entre as espécies em estudo visando ser incluída na Política de Garantia do Preço Mínimo para a Sociobiodiversidade (PGPMBIO) (VIANA, 2015).

O fruto da fava-d'anta é um legume, achatado, com coloração variando de verde (imaturo) (Figura 1B), marrom-escuro a quase negro (Figura 1C), opaco, de superfície irregular, rugoso, com ápice e base arredondados, bordo irregular lenhosos (seco) (SILVA, 2016). O epicarpo apresenta células de contorno retangular e paredes espessadas. O mesocarpo é externamente constituído de células do tipo parenquimático, alongadas no sentido radial e, frequentemente, incluindo cristais de rutina, em forma de ouriço (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Os frutos são coletados imaturos, sendo que o teor de rutina é superior nesse estágio, indicado pela coloração verde-escura do fruto, como foi observado por Vieira (2018).

A exploração da fava-d'anta para abastecer a indústria farmacêutica tem ocasionado o extrativismo predatório. A extração de frutos tem impactado na manutenção e regeneração das plantas, podendo afetar negativamente a extração a longo prazo, sendo uma ameaça para a espécie (DE ALCÂNTARA; LUCENA; CRUZ, 2021; LANDIM; COSTA, 2012; RIBEIRO-SILVA; SCARIOT; DE MEDEIROS, 2012).

Figura 1- Planta jovem de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) (A), frutos imaturos (B) e maduros (C) na cidade de São João da Lagoa – MG



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

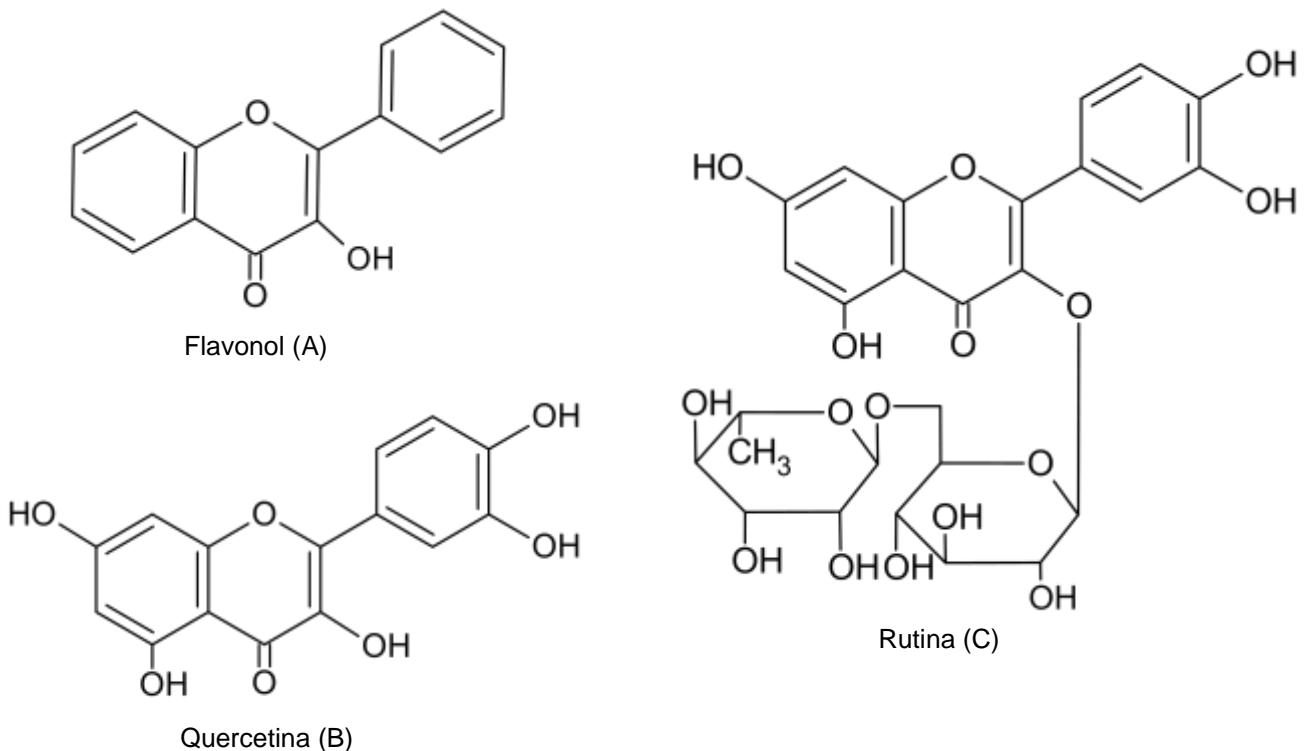
### 3.2. Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários derivados de vasta diversidade de plantas e frutos, e constituem componentes importantes da dieta humana (PATEL; PATEL, 2019). Eles podem ser encontrados em diversas formas estruturais, mas de forma geral, sua estrutura é baseada em esqueleto com 15 carbonos, que consiste em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos (KUBALT, 2016). São conhecidos diferentes tipos de flavonoides, sendo as suas principais classes os flavonóis, isoflavonas, flavonas, flavanonas, antocianinas, antocianidinas e catequinas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Esses compostos apresentam várias atividades farmacológicas e biológicas. São atribuídas a esses metabólitos ações antioxidante (BOUDKHILI *et al.*, 2015; SAIT *et al.*, 2015), antitumoral (GUO, 2013; RADHIKA; GHOSHAL; CHATTERJEE, 2012) e anticancerígena (RAVISHANKAR *et al.*, 2013). Nas plantas, são responsáveis pela pigmentação, atuam no desenvolvimento e proteção contra infecções e incidência de raios ultravioleta (MACHADO *et al.* 2008).

Na subclasse dos flavonóis está a quercetina, molécula-base a partir da qual será formada a rutina (Figura 2). A rutina é um pó formado por cristais em forma de agulhas amarelo-pálidas, insípido e inodoro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019). Quimicamente, trata-se de glicosídeos de flavonol que são sintetizados principalmente nas plantas superiores (PATEL; PATEL, 2019).

Figura 2- Estrutura química da subclasse flavonol (A) e das moléculas de quercetina (B) e rutina (C) pertencentes a esse grupo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A rutina tem várias atividades farmacológicas, como a ativação da enzima antioxidante superóxido dismutase, promovendo aumento de lipoproteínas de alta densidade e diminuindo os fatores de risco para a aterosclerose e doença venosa crônica (DVC) (RODRIGUES *et al.*, 2003). Pode ser utilizada no tratamento de doenças gastrointestinais e diabetes (HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2014), e também no tratamento de distúrbios neurodegenerativos (NA *et al.*, 2014). Devido às atividades farmacológicas significativas, esse bioflavonoide é uma das substâncias promissoras na formulação de medicamentos (PATEL; PATEL, 2019).

### 3.3. Extração de rutina

A extração da rutina a partir de matrizes vegetais tem como método convencional a utilização de solventes orgânicos, associado à técnicas, como, aquecimento, força química e mecânica, ultrassom, micro-ondas e infravermelho com intuito de melhorar o rendimento do processo (CHUA, 2013). Alguns métodos apresentam aplicação industrial e outros são executados apenas para escala analítica, isso devido ao custo, perda do rendimento e tempo de extração (YANG; ZHANG, 2008).

Alguns métodos utilizam solvente alcoólico polar (etanol e metanol) para rutina. Além desses, a mistura etanol/água e apenas água tem sido utilizada como solventes sendo considerados métodos promissores, pela baixa toxicidade e economia, apesar da baixa solubilidade da rutina em água (12,5 g/100 mL) (KOONES; CLIFTON, 1948, ALTIOK *et al.*, 2008). A extração com solvente também pode ser realizada

envolvendo aquecimento (YANG; ZHANG, 2008). No entanto, o rendimento da extração de rutina pode ser comprometido devido a processos indesejáveis como a ionização, hidrólise e oxidação após longa duração de extração (RAVBER *et al.*, 2016).

A temperatura e o tempo de extração são condições que devem ser avaliadas na extração. A extração em temperatura próxima a 100°C pode degradar a rutina, especialmente em sistemas de extração aquosos, e se o tempo da extração for demorado, a concentração pode ser ainda mais comprometida (CHUA, 2013).

Na extração de rutina, dos frutos de *D. mollis*, são empregadas metodologias com utilização de metanol e etanol como solventes. Extrato dos frutos de *D. mollis*, utilizando etanol absoluto, apresentou teor de flavonoides totais de 33,71% expressos em rutina (HUBINGER; SALGADO; MOREIRA, 2009). Outro trabalho com frutos da fava utilizou a decocção em etanol/água (1:1) no processo de extração e obteve valores próximos (26,27%) aos métodos que utilizam solventes como o metanol e etanol (LEITE *et al.*, 2020). O uso da água como solvente para obtenção de extrato enriquecido de rutina, a partir dos frutos de fava d'anta, apresentou resultados promissores (KOONES, 1948; SANTOS, 2006).

A partir de consulta por documentos de patente em bases de dados, foi elaborada a Tabela 1 com os principais resultados encontrados em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/>; <https://patents.google.com/> e <https://busca.inpi.gov.br/pePI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>.

Tabela 1 – Patentes relacionadas a métodos de extração de rutina disponíveis em bases de dados

Número / Título do documento de patente	Espécie	Procedimentos	Principais diferenças do método desenvolvido neste trabalho
US2450555A/ Extração de rutina	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração aquosa em ebulição;</li> <li>- Adição de bórax e agitação;</li> <li>- Ressuspensão em água aquecida;</li> <li>- Adição de cloreto de sódio;</li> <li>- Adição de ácido fosfórico (pH 1,8);</li> <li>- Dissolução de precipitado em borato;</li> <li>- Adição de ácido fosfórico (pH 1,5).</li> </ul>	Houve redução das etapas além de mudanças nas concentrações dos materiais utilizados.
BR0314481A/ Extração, purificação e conversão de flavonoides da biomassa vegetal	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração aquosa com agitação contínua a 90 °C;</li> <li>- Concentração do extrato sob pressão reduzida;</li> <li>- Precipitação, centrifugação e filtração do sobrenadante.</li> </ul>	Difere na condição de extração e centrifugação.
BR112014029436-4/ Método de obtenção de extrato rico em rutina a partir de uma planta	<i>Uncaria elliptica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração com metanol e agitação por duas horas a 30-35 °C;</li> <li>- Adição de ácido ascórbico;</li> <li>- Cristalização da rutina por resfriamento;</li> <li>- Filtragem seguida por enxágue com metanol.</li> </ul>	Não há utilização de solventes orgânicos.
CN115165492A/ Processo de extração e aplicação da rutina do trigo sarraceno	<i>Fagopyrum esculentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração ultrassônica (temperatura de 60 a 80°C e velocidade de rotação de 3.000 rpm) com solvente orgânico (etanol/acetona).</li> </ul>	A extração não é realizada sob condição ultrassônica e não faz uso de solventes orgânicos.
CN106749454A/ Método de extração de rutina	<i>Sophora japonica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração com adição de bórax e metabissulfito de sódio;</li> <li>- Uso de etanol e agitação em banho-maria com temperatura de 60-70°C;</li> <li>- Centrifugação (6-8 min a uma velocidade de 2800-3200 rpm);</li> <li>- Adição de ácido clorídrico concentrado (pH 3,2-5,0).</li> </ul>	Difere nos materiais utilizados. Não faz utilização de solventes orgânicos, além de não realizar centrifugação.

(Continua na próxima página)

Tabela 1 – (Continuação)

<p>CN101081859A/ Método de extração de rutina</p>	<p><i>Fagopyrum esculentum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração com metanol, destilação para recuperação de metanol;</li> <li>- Dissolução do extrato grosso em isopropanol;</li> <li>- Extração com triclorometano;</li> <li>- Dissolução do produto grosseiro de rutina em solvente misto de álcool e acetato de etila;</li> <li>- Filtração.</li> </ul>	<p>Não faz utilização de solventes orgânicos.</p>
<p>CN115109108A/ Método de extração da rutina do trigo sarraceno</p>	<p><i>Fagopyrum esculentum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração sob condição ultrassônica, em solução extratora (etanol, sulfito de sódio e água) com valor de pH de 8,5-9,5;</li> <li>- Ajuste do valor de pH da solução de extração para 2,5-3,5, repouso e filtração;</li> <li>- Lavagem do produto bruto de rutina com água e secagem a vácuo.</li> </ul>	<p>A extração não é realizada sob condição ultrassônica e não faz uso de solventes orgânicos.</p>
<p>CN111718384A/ Método para extração de rutina de botões de flores de <i>Sophora</i></p>	<p><i>Sophora japonica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração aquosa com decocção;</li> <li>- Concentração do líquido de decocção;</li> <li>- Ajuste do pH para 4-5 com ácido clorídrico;</li> <li>- Repouso e centrifugação do precipitado.</li> </ul>	<p>Difere nas etapas e materiais utilizados, além de não realizar centrifugação.</p>
<p>CN114773407A/ Método de extração e aplicação de rutina</p>	<p><i>Sophora japonica</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Extração em solução aquosa de sulfito de sódio em estado de leve ebulição e agitação;</li> <li>- Adição de ácido diluído para ajustar o valor de pH para 4-5;</li> <li>- Filtração e lavagem com água até o valor do pH ser 6-7.</li> </ul>	<p>Difere nas etapas e materiais utilizados, faixa de pH.</p>

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

### 3.4. Referências

- ALTIOK, E. *et al.* Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 2, p. 342-348, 2008.
- BOUDKHILI, M. *et al.* Isolation and antioxidant activity of flavonoids from *Coriaria myrtifolia* methanolic extract. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 1, p. 141–142, 2015.
- BRASÍLIA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 6ª ed., 2019. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 298, de 12 de agosto de 2019.
- CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805–817, 2013.
- COSTA, K. P. *et al.* Caracterização da cadeia produtiva da fava-d'anta na área de preservação ambiental do Rio Pandeiros, MG, Brasil. **Revista Fitos**, v. 15, n. Supl 1, p. 44-52, 2022.
- CUNHA, P. L. *et al.* Isolamento e caracterização de galactomanana de sementes de *Dimorphandra gardneriana* Tul. como um potencial substituto da goma guar. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 880–885, 2009.
- DE ALCÂNTARA, M. S.; DE LUCENA, R. F. P.; DA CRUZ, D. D. Toward sustainable production chain by SWOT-AHP analysis: a case study of Fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana* Tulasne) production chain. **Environment, Development and Sustainability**, v. 24, n. 2, p. 2056–2078, 2021.
- FILIZOLA, B. C. **Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável da Fava d'anta**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2013. ISBN 978-85-63288-12-7.
- GOMES, L. J.; GOMES, M. A. O. Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava-d'anta. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 161, p. 66-69, 2000.
- GUO, L. X. Antitumor effects and mechanisms of total saponin and total flavonoid extracts from *Patrinia villosa* (Thunb.) juss. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 165–171, 2013.
- HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 9, p. 783–788, 2014.
- HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p.690-696, 2009.
- KOONES, H. F.; CLIFTON, N. J. Extraction of rutin. United States Patent Office (2,450,555), 5 Oct, 1948.
- KUBALT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Science**, v. 80, n. 2, p. 97-108, 2016.
- LANDIM, L. P., COSTA, J. G. M. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d'anta) - Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 1, p. 6–11, 2012.
- LEITE, D. O. D. *et al.* Evaluation of solvents extractors of rutin from *Dimorphandra Gardneriana* (Leguminosae) and in vitro antioxidant tests. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n.4, p. 16802-16818, 2020.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008. 368 p., v.1.
- NA, J. Y. *et al.* Rutin alleviates prion peptide-induced cell death through inhibiting apoptotic pathway activation in dopaminergic neuronal cells. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 34, n. 7, p. 1071–1079, 2014.

NUNES, J. D. *et al.* O extrativismo da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) na região do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 370–375, 2012.

MACHADO H., NAGEM T.J., PETERS V.M., FONSECA C.S., OLIVEIRA T.T.D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. 2008.

OLIVEIRA, D. M. T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 3, p. 263–269, 1999.

PACHECO, M. V. *et al.* Germination and vigor of *Dimorphandra mollis* Benth. seeds under different temperatures and substrates. **Revista Árvore**, v. 34, n. 2, p. 205-213, 2010.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1-15, 2016.

PANEGASSI, V. R.; SERRA, G. E.; BUCKERIDGE, M. S. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. **Food Science and Technology** [online], v. 20, n. 3, p. 406-415, 2000.

PATEL, K.; PATEL, D. K. The beneficial role of rutin, a naturally occurring flavonoid in health promotion: A systematic review and update. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. (Org.). **Bioactive Foods as Dietary Interventions for Arthritis and Inflammatory Diseases**. 2. ed. Allahabad, India: Academic Press, 2019 cap. 26, p. 457–479.

RADHIKA, M.; GHOSHAL, N.; CHATTERJEE, A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of potentilla fulgens in breast cancer cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, art. 24, p. 1-14, 2012.

RAVBER, J. *et al.* Hydrothermal Degradation of Rutin: Identification of Degradation Products and Kinetics Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 48, p. 9196–9202, 2016.

RAVISHANKAR, D. *et al.* Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2821-2831, 2013.

RIBEIRO-SILVA, S.; SCARIOT, A.; DE MEDEIROS, M. B. Uso e práticas de manejo de faveira (*Dimorphandra Gardneriana* Tul.) na região da chapada do araripe, ceará: diretrizes ecológicas e socioeconômicas. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 65–73, 2012.

RODRIGUES, H. G., *et al.* Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

SAIT, S., *et al.* HPLC-UV/DAD and ESI-MS(n) analysis of flavonoids and antioxidant activity of an algerian medicinal plant: Paronychia argentea Lam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 231–240, 2015.

SANTOS, E. A. M. **Obtenção de rutina de *Dimorphandra* sp:** do processamento dos frutos à obtenção de extrato enriquecido. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

SILVA, R. S. *Dimorphandra mollis*. In: Vieira, R. F.; Camillo, J.; Coradin, L. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2016. cap. 5, p. 761-769.

VIANA, J. P. **Operacionalização da Política de Garantia de Preços Mínimos para Produtos da Sociobiodiversidade 2009-2013: Há espaço para crescer.** [s.l.] Texto para Discussão, 2015.

VIEIRA, I. T. D. **Monitoramento de flavonoides totais e rutina em frutos de fava-danta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018.

YANG, Y.; ZHANG, F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 4, p. 308-313, 2008.

## 4. ARTIGO

### 4.1. Artigo 1 - Método de extração aquosa de flavonoides de frutos de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)

Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico Industrial Crops and Products

#### Resumo

Fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.), espécie nativa do Cerrado, é uma das principais fontes de bioflavonoides para indústria farmacêutica, sobretudo rutina. A extração industrial de rutina, a partir de matrizes vegetais, faz uso de solventes orgânicos como metanol e etanol. No entanto, o uso desses solventes traz riscos à saúde e ao meio ambiente, por sua toxicidade. A utilização de solventes menos tóxicos e de menor custo, é uma alternativa para o processo, pois além de preservar a saúde, contribui para o equilíbrio do ecossistema. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma técnica sustentável de extração/purificação de flavonoides dos frutos da fava-d'anta com o mínimo de impacto ambiental. O processo de extração aquosa de flavonoides de frutos de fava-d'anta foi fundamentado em etapas que consistem na separação, purificação e cristalização de rutina. Os frutos foram submetidos a processo de extração à quente, seguido de precipitação de impurezas com posterior filtração. A próxima etapa consistiu na precipitação de flavonoides por meio de ajuste do pH (1,5) da solução. Por último, o precipitado foi filtrado, lavado, seco e pulverizado. Por meio de experimento com metodologia de superfície de resposta, as condições de extração foram otimizadas. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de alta eficiência. O uso de 45 g de borato de sódio forneceu maior rendimento de flavonoides. Nesta condição, os rendimentos de extrato enriquecido de flavonoides foi de 164,7 mg/g de frutos imaturos e 111,4 mg/g de frutos maduros, o teor de rutina desses extratos foi em média de 39,55 % e 20,40 %, respectivamente. Também foi realizada análise dos extratos metanólicos dos frutos imaturos e maduros dos frutos de fava-d'anta, cujo teor de rutina foi de 17,65 % e 8,30 %, respectivamente. Em conclusão, o processo desenvolvido pode ser considerado um método alternativo para extração e separação verde de flavonoides de amostras vegetais.

**Palavras-chave:** Extração de rutina, química verde, CLAE-DAD.

## 1. Introdução

A fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.), é uma planta de ampla distribuição no Cerrado Brasileiro (Silva, 2016). Os seus frutos são explorados para obtenção de bioflavonoides, dos quais se destaca a rutina, que tem valor comercial internacional (Landim e Costa, 2012). A rutina é um pó formado de cristais em forma de agulhas amarelo-pálidas, com várias propriedades farmacológicas já elucidadas, incluindo as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, cardioprotetora e antioxidante (Patel e Patel, 2019; Da Silva Neto *et al.*, 2021).

A extração de rutina a partir de matrizes vegetais é feita com a utilização de solventes orgânicos, como o metanol e etanol, associada a técnicas de aquecimento, força química e mecânica, ultrassom, micro-ondas e infravermelho (Chua, 2013). No entanto, esses métodos de extração são pouco adequados para uso nas indústrias devido ao custo, toxicidade dos solventes e os custos de equipamento e instalações (Barba *et al.*, 2016). A preocupação com as questões ambientais tem levado à busca por metodologias que empreguem o conceito de Química Verde nos diferentes setores das Indústrias. O uso de solventes ecológicos tem sido uma possibilidade para o processo, dessa forma, a água é uma alternativa segura pela falta de inflamabilidade e toxicidade (Gomes *et al.*, 2018).

Estudos tem sido realizados a fim de obter técnicas de extração ecológicas e sustentáveis para otimizar a extração de rutina. Solventes, incluindo líquidos iônicos (ILs) e solventes eutéticos profundos (DEEs), foram sugeridos como solventes sustentáveis e seguros para a extração de compostos bioativos (Nam *et al.*, 2015). Mais recentemente, Kim & Lim (2019) observaram altos rendimentos de extração de rutina das partes aéreas de *Fagopyrum esculentum* Moench usando água como solvente por meio do processo SWE (extração de água subcrítica). Assim como Huang *et al.* (2017) que sugeriram o uso de solventes eutéticos naturais profundos (NADES) como alternativa para a extração de metabólitos por terem apresentado baixa toxicidade e favorável biodegradabilidade no processo para obtenção de rutina em trigo sarraceno (*Fagopyrum tataricum* Gaerth).

O número de relatos sobre o uso desses solventes nos processos de extração de compostos, como a rutina, ainda é escasso. No entanto, as tendências atuais para o processo de extração têm se concentrado no uso de tecnologias inovadoras que permitem otimizar a recuperação de compostos bioativos e melhorar a qualidade dos extratos (Ameer *et al.*, 2017). Diante do exposto, pensando em aperfeiçoar o processo de extração de rutina, o objetivo deste estudo foi desenvolver método sustentável para extração de flavonoides dos frutos de fava-d'anta, com potencial para aplicação como técnica alternativa na extração de rutina de amostras vegetais de interesse industrial.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Material vegetal

Os frutos de fava-d'anta foram coletados antes (com coloração verde-escura) e após a maturação (coloração marrom) na cidade de São João da Lagoa, localizada na região Norte de Minas Gerais (Latitude: 16°46'42"S, Longitude: 44°18'24"O). Após a coleta, os frutos foram encaminhados para a secagem sobre piso de cimento a pleno sol, como realizado pelos extrativistas, até adquirirem coloração escura e peso constante, em seguida, foram desintegrados e acondicionados em sacos plásticos. A umidade dos frutos

foi determinada por meio do Determinador de Umidade Shimadzu MOC63U. O desenvolvimento do método de extração de flavonoides foi conduzido com amostras de frutos imaturos com posterior aplicação aos frutos maduros.

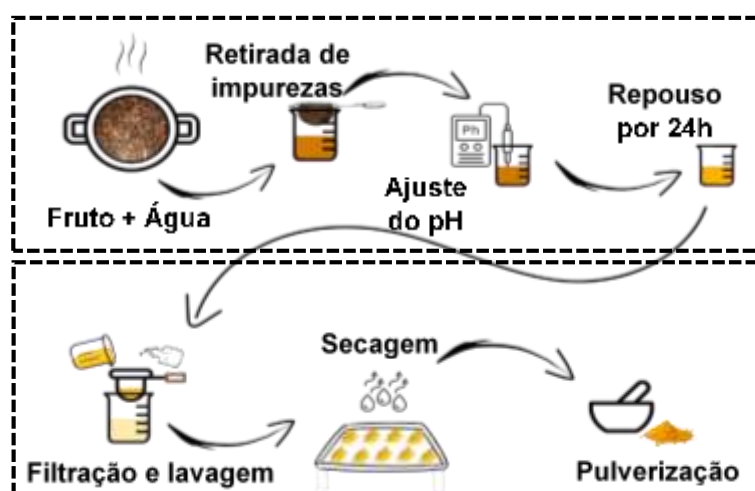
## 2.2 Reagentes

Os solventes acetonitrila (grau HPLC) e álcool metílico (grau HPLC) foram adquiridos da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). O solvente PA ácido fosfórico foi adquirido da Êxodo Científica (Sumaré, Brasil). O padrão de rutina (pureza > 95%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os reagentes comerciais utilizados incluindo borato de sódio foi adquirido da Loja do Cuteleiro (Patos de Minas, Brasil), cloreto de sódio adquirido da Comércio e Indústria de Moagem e Refinação Santa Cecília (Areia Branca, Brasil) e ácido clorídrico (9,5% p/p) da Condisbrás (Belo Horizonte, Brasil).

## 2.3 Extração de flavonoides

### 2.3.1 Desenvolvimento do método de extração de flavonoides

Foram realizados ensaios preliminares a fim de determinar os materiais a serem utilizados durante a extração, com o menor custo, toxicidade e resíduos. O método foi caracterizado pelo uso da água como única fase extratora na qual as etapas foram realizadas. Os frutos imaturos (50 g) secos e triturados foram submetidos a processo de separação à quente (100 °C por 5 min), com o uso de água (375 mL) e adição de borato de sódio. Nessa etapa o pH da solução ficou em torno de  $8,86 \pm 0,17$ . A maior parte das impurezas (resíduos vegetais pouco solúveis em água) foi precipitada a partir da operação de *salting out* usando cloreto de sódio, que em seguida foram removidas da solução por meio de filtração em micro-tela de poliéster. O filtrado foi acidificado com adição de ácido clorídrico comercial (pH:  $1,52 \pm 0,02$ ) e mantido em repouso por 24 h para precipitação dos flavonoides. Após esse período, o precipitado formado foi lavado com água destilada (500 mL), filtrado em tecido de algodão percal 400 fios e submetido à secagem em temperatura ambiente em estrutura artesanal confeccionada com tecido nylon. Por fim o extrato enriquecido de flavonoides foi pulverizado. A figura 1 descreve o processo geral de extração.



**Figura 1.** Esquema representativo das etapas do processo de obtenção de extrato enriquecido de flavonoides de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth.

### 2.3.2 Otimização do método

Após definição dessas etapas, foram realizadas sucessivas extrações, com variação dos componentes utilizados na técnica (borato de sódio e cloreto de sódio), a fim de estabelecer as melhores condições para o método. Para isso, foi conduzido experimento em esquema fatorial 5x5, com três repetições, sendo avaliadas cinco dosagens de borato de sódio (0, 15, 30, 45 e 60 g) e cinco dosagens de cloreto de sódio comercial (0, 10, 20, 30 e 40 g).

A fim de verificar o efeito das variáveis (níveis de borato de sódio e cloreto de sódio) no rendimento de rutina, recorreu-se à regressão múltipla com o auxílio da função lm. As análises estatísticas foram realizadas no software R *studio* (Team, 2015). Para a seleção do modelo de regressão, adotou-se como critérios para a verificação da qualidade de ajuste o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  aj), o Critério de Informatividade de Akaike (AIC) e o Critério de Informatividade Bayesiano (BIC). O gráfico de superfície de resposta tridimensional (3D) foi traçado.

Após a determinação da dosagem ideal dos sais utilizados no processo, por meio de análise de regressão, para comparação do rendimento de rutina, foi realizada a extração de flavonoides em frutos imaturos e maduros, com cinco repetições. Foi realizado cálculo de média e desvio-padrão desses resultados.

### 2.4 Preparo de extrato metanólico de fava-d'anta

O preparo do extrato metanólico foi realizado conforme Costa *et al.* (2022) com modificações. Os frutos (imaturos e maduros) foram moídos em moinho analítico de facas e transferidos (0,05 g) para tubo cônico tipo Falcon com capacidade para 15 mL e acrescidos de metanol (5 mL, 80% v/v). O sistema foi deixado em repouso por 24h ao abrigo da luz, sendo o extrato recolhido e utilizado nas análises.

### 2.5 Preparo das soluções para análise cromatográfica

A solução padrão de rutina e as soluções dos extratos enriquecidos foram preparadas em metanol.

### 2.6 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em HPLC-DAD Shimadzu, modelo Prominence (Kyoto, Japão). O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L e a eluição em gradiente. Os cromatogramas foram registrados de 190 a 450 nm, e a integração para quantificação de rutina a 350 nm. Os cromatogramas foram integrados com software cromatográfico de solução LC. As condições cromatográficas podem ser vistas na tabela 1.

**Tabela 1.** Condições cromatográficas utilizadas nas análises

<b>Parâmetro</b>			
Comprimento de onda ( $\lambda$ )	190 a 450 nm		
Coluna cromatográfica	Shim-pack VP-ODS (C18) (250 x 4.6 mm I.D., 5 $\mu$ m)		
Composição da fase móvel em modo gradiente	Acetonitrila 100% (v/v) (A)		
	Água acidificada com ácido fosfórico 0,5% (v/v) (B)		
	Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
	0	20	80
	10	30	70
	25	22	78
	30	20	80
	45	20	80
Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	0,90		
Temperatura da coluna (°C)	30		

Foi determinada equação de regressão (curva de calibração) para a quantificação da rutina, a partir da injeção do padrão, em faixa linear de concentração (40, 200, 600, 1200 e 1800 mg L<sup>-1</sup>) nos extratos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Equação de regressão obtida a partir da análise do padrão de rutina (pureza > 95%, Sigma-Aldrich), em faixa linear de concentração (mg L<sup>-1</sup>) por CLAE -DAD

Padrão	Faixa de Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Equação	R <sup>2</sup>
Rutina	40 a 1800	Y= 33720x - 627962	0,99

Nota: \* Y = Área absoluta do pico; X = Concentração do composto no extrato (mg L<sup>-1</sup>)

### 3. Resultados e discussão

A umidade média dos frutos imaturos e maduros da fava d'anta foi de  $8,56 \pm 0,41$  e  $8,03\% \pm 0,20$ , respectivamente. De acordo com Pinto e Bertolucci (2002), a umidade ideal para o armazenamento de frutos de plantas medicinais e aromáticas é de 8 a 15%, o que está adequado. Ainda segundo esses autores, no caso das plantas medicinais, umidade acima de 20% pode favorecer atividade enzimática, podendo comprometer a qualidade da droga vegetal.

O rendimento da extração dos flavonoides dos frutos imaturos de fava-d'anta foi otimizado com base nas doses dos sais utilizados durante o processo. Os resultados do experimento de otimização são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Rendimento da extração de rutina, a partir de frutos imaturos de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.), em função das doses de borato de sódio e cloreto de sódio

Borato de sódio (g)	Cloreto de Sódio (g)	Rendimento do extrato enriquecido (%)	Teor de rutina (%)
		Média ± Desv. Padrão	Média ± Desv. Padrão
0	0	4,39 ± 0,84	52,60 ± 12,99
0	10	3,82 ± 0,40	52,95 ± 14,39
0	20	3,75 ± 0,27	53,36 ± 3,48
0	30	2,60 ± 0,64	49,21 ± 23,67
0	40	3,38 ± 0,81	45,16 ± 15,44
15	0	17,16 ± 4,44	51,34 ± 7,81
15	10	16,06 ± 5,20	48,73 ± 15,15
15	20	14,53 ± 1,50	45,55 ± 23,99
15	30	15,27 ± 1,59	44,89 ± 15,25
15	40	13,15 ± 0,78	69,80 ± 10,23
30	0	16,86 ± 6,35	49,80 ± 23,56
30	10	15,58 ± 6,00	40,59 ± 25,40
30	20	15,96 ± 6,81	40,18 ± 22,52
30	30	14,52 ± 7,91	60,52 ± 5,72
30	40	14,06 ± 4,49	55,43 ± 15,75
<b>45</b>	<b>0</b>	<b>17,13 ± 9,03</b>	<b>62,17 ± 10,58</b>
45	10	15,35 ± 8,90	64,19 ± 4,19
45	20	15,40 ± 8,81	66,25 ± 7,91
45	30	17,68 ± 5,97	32,38 ± 6,99
45	40	16,03 ± 4,24	60,72 ± 5,96
60	0	12,04 ± 5,02	60,55 ± 9,67
60	10	12,51 ± 8,95	62,04 ± 27,78
60	20	11,07 ± 5,39	57,57 ± 7,15
60	30	15,39 ± 2,87	79,51 ± 12,53
60	40	13,93 ± 1,91	50,45 ± 24,22

Aplicando a análise de regressão múltipla aos dados experimentais, a variável de resposta e as variáveis de teste foram exibidas pela seguinte equação:  $Z_i = 1,3222^* - 0,0075nsx_i + 0,1652^{**}y_i - 0,0019^{**}y_i^2$ , onde  $Z_i$  corresponde ao rendimento de rutina,  $x$  ao efeito linear da dose de cloreto de sódio,  $y$  ao efeito linear da dose de borato de sódio e  $y^2$  ao efeito quadrático da dose de borato de sódio. Como mostrado na Tabela 4, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi calculado em 0,3084, sugerindo que 30,84% da variação de rendimento foi atribuída aos fatores analisados. Os dados mostraram que o modelo foi estatisticamente aceitável no nível  $P < 0,01$ . A equação do modelo foi qualificada para prever o rendimento

de rotina dentro da faixa de variáveis experimentais. No entanto, a análise mostrou que apenas a variável dose de borato de sódio influenciou estatisticamente o rendimento de rotina, o que reduz custos.

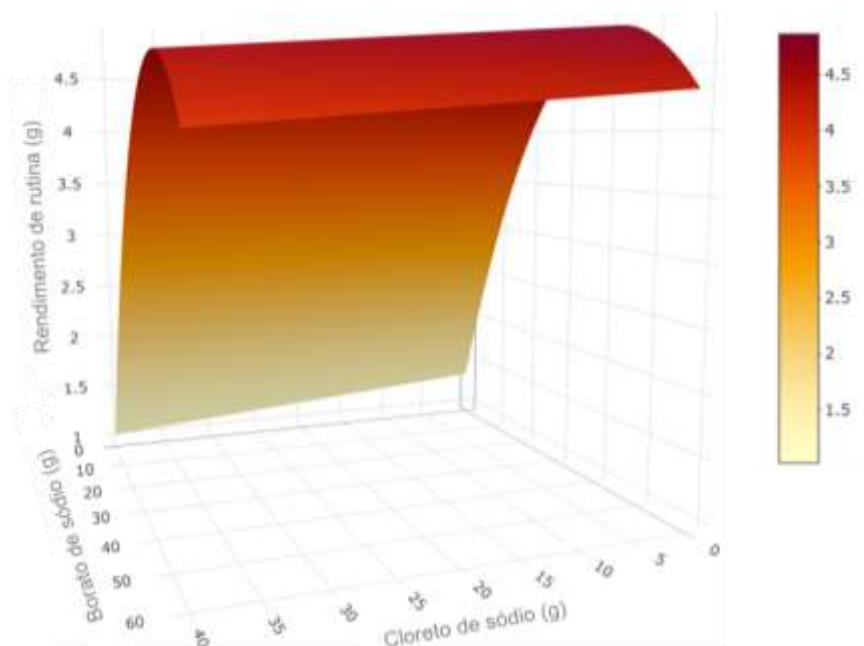
**Tabela 4.** Análise de regressão para rendimento de rutina em frutos de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.)

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Tratamento	24	7,2636 <sup>ns</sup>
Regressão	3	41,1964 <sup>**</sup>
Desv. Regressão	21	2,4161 <sup>ns</sup>
Resíduo	50	4,5283
R <sup>2</sup>		0,3084

Nota: ns= Não significativo; \*\*= Significativo a 0,01.

O rendimento de rutina pode ser previsto a partir do gráfico de superfície de resposta 3D (Figura 2), que revelou a sensibilidade do valor da resposta em relação à mudança na variável. O rendimento aumentou à medida que a dose de borato de sódio aumentou, tendo diminuído com a elevação da dose de cloreto de sódio. Verifica-se, para o rendimento de rutina, que o maior resultado (106,5 mg/g) foi obtido com a utilização de 45 g de borato de sódio combinado com 0 g de cloreto de sódio, sendo possível obter 17,13 % ± 9,03 de extrato concentrado de flavonoides, com rendimento de 62,17 % ± 10,58 de rutina a partir de frutos imaturos de fava d'anta.

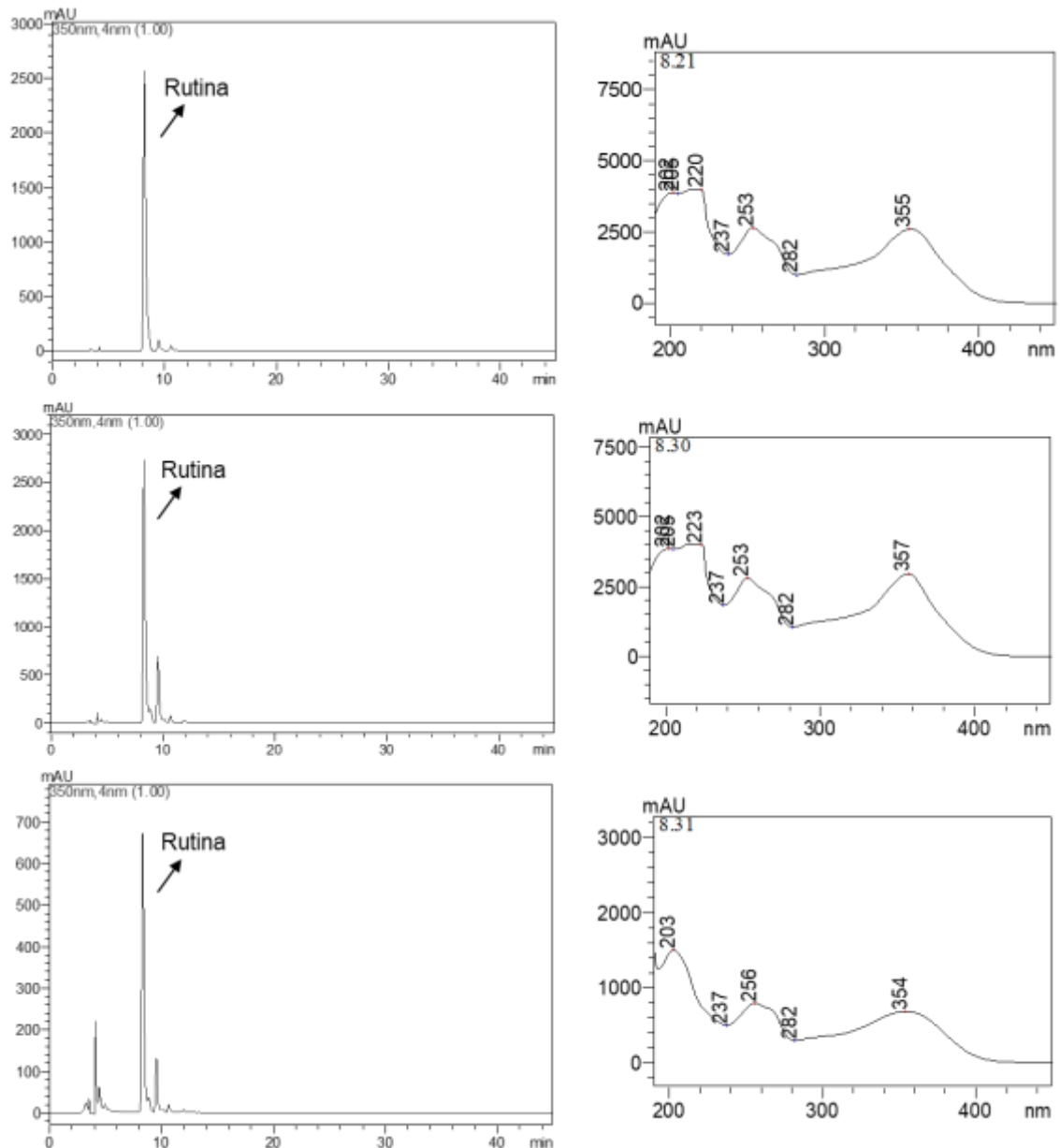
O uso de borato de sódio aumenta o pH da solução ( $8,86 \pm 0,17$ ) que, associado ao aquecimento, possibilita a solubilização da rutina no meio, visto que essa substância apresenta baixa solubilidade em água (0,13 g/L). Apesar do uso do cloreto de sódio auxiliar no processo de precipitação de impurezas por meio de operação de *salting out*, não foi observada diferença com o uso do mesmo neste trabalho.



**Figura 2.** Superfície de resposta para rendimento de rutina (g) em função de doses de borato de sódio e cloreto de sódio aplicados no processo de extração de flavonoides em 50 g de frutos imaturos de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.).

### 3.1. Análise cromatográfica de extratos metanólicos dos frutos de fava-d'anta

As análises em CLAE indicaram que o perfil cromatográfico das amostras dos frutos imaturos e maduros apresentaram padrão similar, sendo os picos de maior intensidade correspondente à rutina (TR: 8,30 min) (Figura 3).



**Figura 3.** Cromatogramas e espectros de absorção na região do ultravioleta (350 nm) do padrão de rutina (A) e dos extratos metanólicos de frutos imaturos (B) e maduros (C) de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.) analisados por CLAE-DAD.

Foi observado maior teor médio de rutina nos frutos imaturos ( $17,65\% \pm 6,13$ ) comparado aos frutos coletados maduros ( $8,30\% \pm 2,47$ ) (Tabela 5). Esse resultado confirma o apresentado por Vieira (2018) que relatou que o teor de rutina tende a reduzir a partir do momento em que os frutos de fava d'anta ficam maduros. O teor de rutina dos frutos imaturos apresentado se assemelha aos encontrados por Costa *et al.* (2022) que obtiveram 13,8% e Leite *et al.* (2020) que relataram 12,81% de rutina em processo de extração

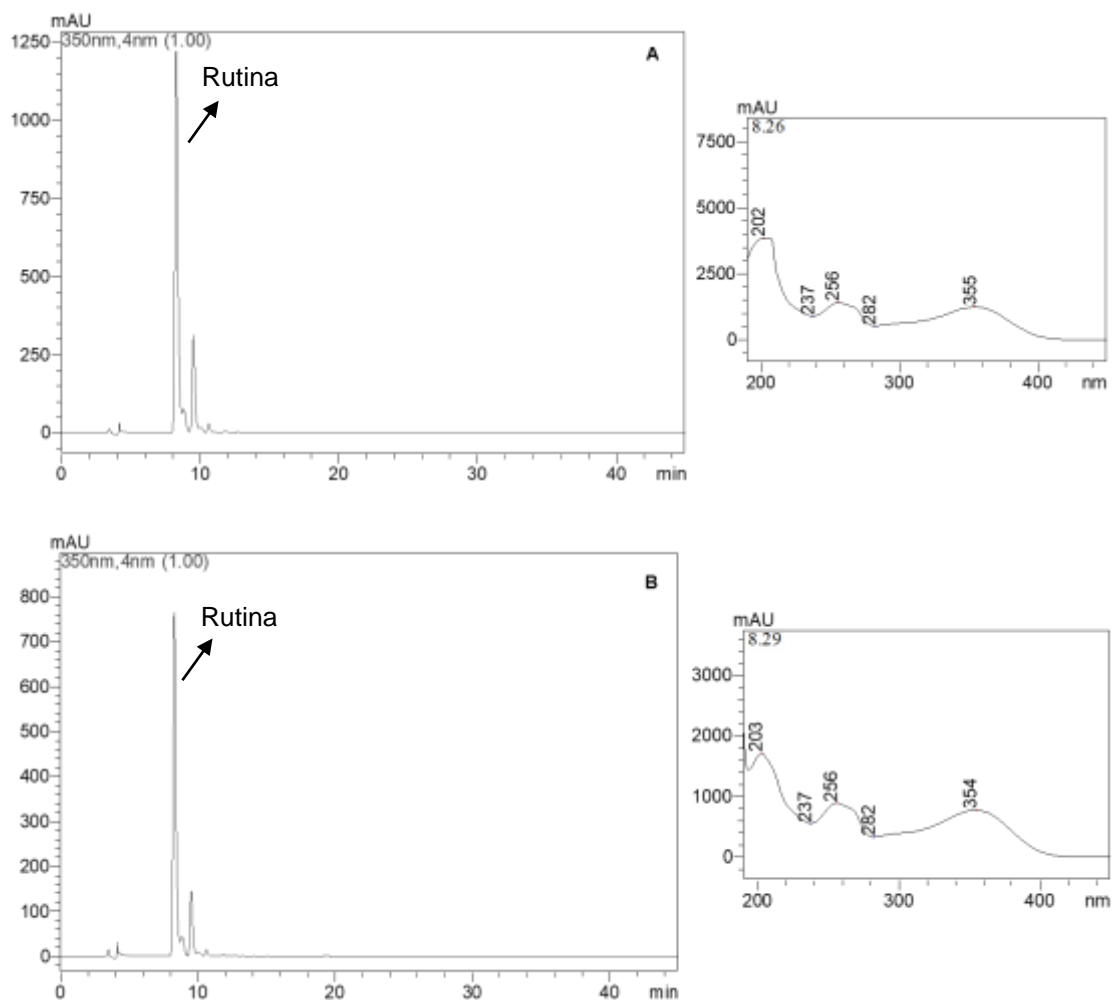
com metanol. Embora os solventes orgânicos convencionais, como o metanol, sejam amplamente utilizados para extração de metabólitos secundários, seu uso pode causar problemas potenciais de poluição ambiental e risco à saúde (Mojzer *et al.*, 2016).

**Tabela 5.** Teor médio de rutina dos frutos imaturos e maduros de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.) coletados em São João da Lagoa - MG

Fruto	Teor de rutina (%) Média ± Desv. Padrão
Imaturo	17,65 ± 6,13
Maduro (seco)	8,30 ± 2,47

### 3.2. Análise cromatográfica dos extratos enriquecidos obtidos a partir dos frutos de fava-d'anta

As análises em CLAE indicaram que o perfil cromatográfico dos extratos enriquecidos, dos de frutos imaturos e maduros, seguiu o mesmo padrão das amostras dos frutos, sendo os picos de maior intensidade correspondente à rutina (TR: 8,29 min) (Figura 4).



**Figura 4.** Cromatogramas e espectros de absorção na região do ultravioleta (350 nm) dos extratos enriquecidos obtidos a partir de frutos imaturos (A) e maduros (B) analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

Quando submetidos ao processo de extração desenvolvido no presente trabalho, observou-se variação no rendimento de rutina nos extratos dos frutos imaturos ( $39,55\% \pm 13,82$ ) e maduros ( $20,40\% \pm 6,04$ ) (Tabela 6). Conforme mencionado, o teor de rutina presente nos frutos da fava-d'anta é influenciado pelo estágio em que se encontra o fruto. Além disso, outros fatores podem afetar o perfil dos metabólitos secundários presentes nas plantas como solo, sazonalidade, precipitação, radiação, período fenológico e, ainda, características genéticas da planta (Da Silva Neto, 2021).

**Tabela 6.** Rendimento do extrato enriquecido e de rutina obtidos a partir de frutos imaturos e maduros (secos) de fava-d'anta (*D. mollis* Benth.)

	Rendimento do extrato enriquecido (%) Média $\pm$ Desv. Padrão	Teor de rutina no extrato concentrado (%) Média $\pm$ Desv. Padrão
Frutos imaturos	16,47 $\pm$ 1,91	39,55 $\pm$ 13,82
Frutos maduros	11,14 $\pm$ 1,41	20,40 $\pm$ 6,04

O rendimento do extrato enriquecido obtido nesse estudo foi semelhante ao relatado por Leite *et al.* (2020) que obteve rendimento médio de  $13,14\% \pm 2,51$ , em processo de extração utilizando água como solvente. O rendimento de rutina obtida no processo também foi semelhante ao de Leite *et al.* (2020), que apresentou  $8,3\%$ . Os frutos imaturos apresentaram maior capacidade de recuperação da rutina quando comparados aos maduros, submetidos ao processo de extração desenvolvido. Esse resultado corrobora com Costa *et al.* (2022), que sugere a coleta de frutos imaturos para garantir maior rendimento de rutina nos frutos de fava d'anta e tem sido a recomendação usual das indústrias ao longo de décadas. No entanto, com a utilização de frutos maduros, pode-se aproveitar as sementes para obtenção de galactomanana, utilizada em formulações de alimentos, fármacos e cosméticos (Souza, 2021), ampliando possibilidades de uso dos frutos.

#### 4. Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido método de extração aquoso de flavonoides para frutos de fava-d'anta. O maior rendimento de extração foi possível com o uso de  $45\text{ g}$  de borato de sódio no processo. Observou-se que o processo de extração com água comprometeu o rendimento final de rutina, no entanto tal solvente tem menor custo e segurança de uso, para o meio ambiente e pessoal envolvido na extração, se comparado a solventes orgânicos tradicionalmente usados.

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

#### Referências

- Ameer, K.; Shahbaz, H. M.; Kwon, J.-H., 2017. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 2, p. 295–315.
- Barba, F. J.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Sant'Ana, A. S.; Orlie V., 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 49, n. 96-109.

Costa, K. P.; Ferreira, G. S.; Fonseca, F. S. A. da; Azevedo, A. M.; Figueiredo, L. S. de.; Martins, E. R., 2022. Biometria e coloração de frutos de fava d'anta como indicadores do momento de coleta. *Conjecturas*, v. 22, n. 8, p. 1118-1132.

Chua, L. S., 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, p. 805–817.

Da Silva Neto, I. F.; Lima, R. S.; Santos, I. T. dos; Lima, E. V. M. de; Barbosa, F. E. V., 2021. Variáveis interferentes, composição fitoquímica e atividades biológicas da Fava D'anta: uma revisão de literatura. *Scientia Naturalis*, Rio Branco, v. 3, n. 5, p. 2433-2441.

Gomes, R. N.; Lima, P. S.; Kuriyama, S. N.; Neto, A. A. F., 2018. Desenvolvimento da química verde no cenário industrial brasileiro. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, v. 12, n. 4, p. 80–89.

Huang, Y.; Feng, F.; Jiang, J.; Qiao, Y.; Wu, T.; Voglmeir, J.; Chen, Z. G., 2017. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.*, v. 221, p. 1400-1405.

Kim, D.; Lim, S., 2019. Subcritical water extraction of rutin from the aerial parts of common buckwheat. *J. of Supercritical Fluids*, v. 152, p. 104561.

Landim, L. P.; Costa, J. G. M., 2012. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d'anta) - Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. *Revista Da Biologia*, v. 9, n. 1, p. 6–11.

Leite, D. O. D.; Camilo, C. J.; Nonato, C. de F. A.; de Carvalho, N. K. G.; Salazar, G. J. T.; Craveiro, A. A.; Pereira, R. C.; da Costa, J. G. M., 2020. Evaluation of solvents extractors of rutin from *Dimorphandra Gardneriana* (leguminosae) and in vitro antioxidant tests. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n.4, p. 16802–16818.

Mojzer, E. B.; Hrnčič, M. K.; Škerget, M.; Knez, Z.; Bren, U., 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, v. 21, p. 901-939.

Nam, M. W.; Zhao, J.; Lee, M. S.; Jeong, J. H.; Lee, J., 2015. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 1718–1727.

Patel, K.; Patel, D. K., 2019. The beneficial role of rutin, a naturally occurring flavonoid in health promotion: A systematic review and update. *Bioactive Foods as Dietary Interventions for Arthritis and Inflammatory Diseases*. Allahabad, India, cap. 26, p. 457–479.

Pinto, J. E. B. P.; Bertolucci, S. K. V., 2002. Cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: UFLA/Faepe.

Silva, R. S., 2016. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade. Brasília, DF: MMA, cap. 5, p. 761-769.

Souza, E. F., 2021. Galactomanana de fava-d'anta: caracterização e aplicação. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros.

Team, Rs., 2015. RStudio: integrated development for R. RStudio. Inc., Boston, MA 700.

Vieira, I. T. D., 2018. Monitoramento de flavonoides totais e rutina em frutos de fava-danta (*Dimorphandra mollis* Benth.). Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi desenvolvido processo para obtenção de extrato enriquecido de flavonoides, utilizando apenas água como solvente em todas as etapas.

Devido a simplicidade das etapas, o método proposto mostrou-se viável de ser empregado em instalações de beneficiamento de frutos em cooperativas e associações de agricultores/extrativistas.

Os frutos imaturos apresentaram maior capacidade de recuperação da rutina, quando comparado aos frutos maduros, submetidos ao processo desenvolvido.