

Uso de espectroscopia de ultravioleta visível (UV-VIS) para a detecção de quercetina em plantas por meio da formação do complexo quercetina-alumínio

UV-Vis spectroscopy to detection of quercetin in plants by formation of quercetin-aluminum complex

Recebido em: 23/02/2017

Aceito em: 25/05/2017

Fabiele BERNARDI; Keller Paulo NICOLINI; Jaqueline NICOLINI
*Instituto Federal do Paraná – IFPR. Av. Bento Munhoz da Rocha, s/n,
PRT280, Trevo da Codapar, CEP 85555-000. Palmas, PR, Brasil.
E-mail: jaqueline.nicolini@ifpr.edu.br*

ABSTRACT

Nine plant samples were studied from complexation reaction that occurs between aluminum from aluminum chloride (AlCl_3) and quercetin. The reaction shows yellow solution, which was spectroscopically evidenced by the bathochromic shift from 360-370 nm to 420-430 nm. Four samples of petals were investigated: white and magenta azalea, burnt yellow lily and dandelion; three leaf samples: aloe, orange and lime; and two peel samples: orange and lime fruits. Among the analyzed samples, only azalea (*Rhododendron* sp.) white and magenta petals had sufficient quercetin concentration to be detected by UV-Vis spectroscopy and analyzed by quercetin-aluminum complex formation. The interaction between aluminum and quercetin showed a stoichiometry of 2:1, with a binding constant of $3.94 \pm 0.34 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$.

Keywords: Natural products; quercetin; antioxidant effect

RESUMO

Foram estudadas nove amostras de plantas a partir da reação de complexação que ocorre entre alumínio, proveniente do cloreto de alumínio (AlCl_3) e quercetina, presente no material botânico avaliado. A reação é caracterizada pela formação de uma solução amarela, evidenciada espectroscopicamente pelo deslocamento batocrômico da região de 360-370 nm para 420-430 nm. Foram investigadas quatro amostras de pétalas: azaleia branca e magenta, lírio amarelo queimado e dente-de-leão; três amostras de folhas: babosa, laranja e lima; e duas amostras de cascas de frutos: laranja e lima. Dentre as amostras analisadas, apenas as pétalas de azaleia (*Rhododendron* sp.) branca e magenta apresentaram concentração de quercetina suficiente para ser detectada e analisada por espectroscopia de UV-Vis pela formação do complexo quercetina-alumínio. A interação entre o alumínio e a quercetina apresenta estequiometria 2:1, com uma constante de ligação de $3,94 \pm 0,34 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$.

Palavras-chave: Produtos naturais; quercetina; efeito antioxidante.

INTRODUÇÃO

A quercetina, ou 3,5,7,3'-4'-pentahidroxiflavona (Figura 1), é um dos flavonóis mais comuns (1), encontrado em plantas medicinais, frutos, vegetais e folhas (2). Como a quercetina pertence ao grupo dos flavonoides, apresenta capacidade antioxidante (3). Todavia, estudos

recentes têm mostrado que a ação benéfica da quercetina vai além de sua capacidade de capturar radicais livres no metabolismo (4), protegendo o DNA (5,6), apresentando atividade antitumoral e anticarcinogênica (7,8) e anti-inflamatória (9). A quercetina vem sendo introduzida em suplementos vitamínicos e em formulações farmacêuticas (2).

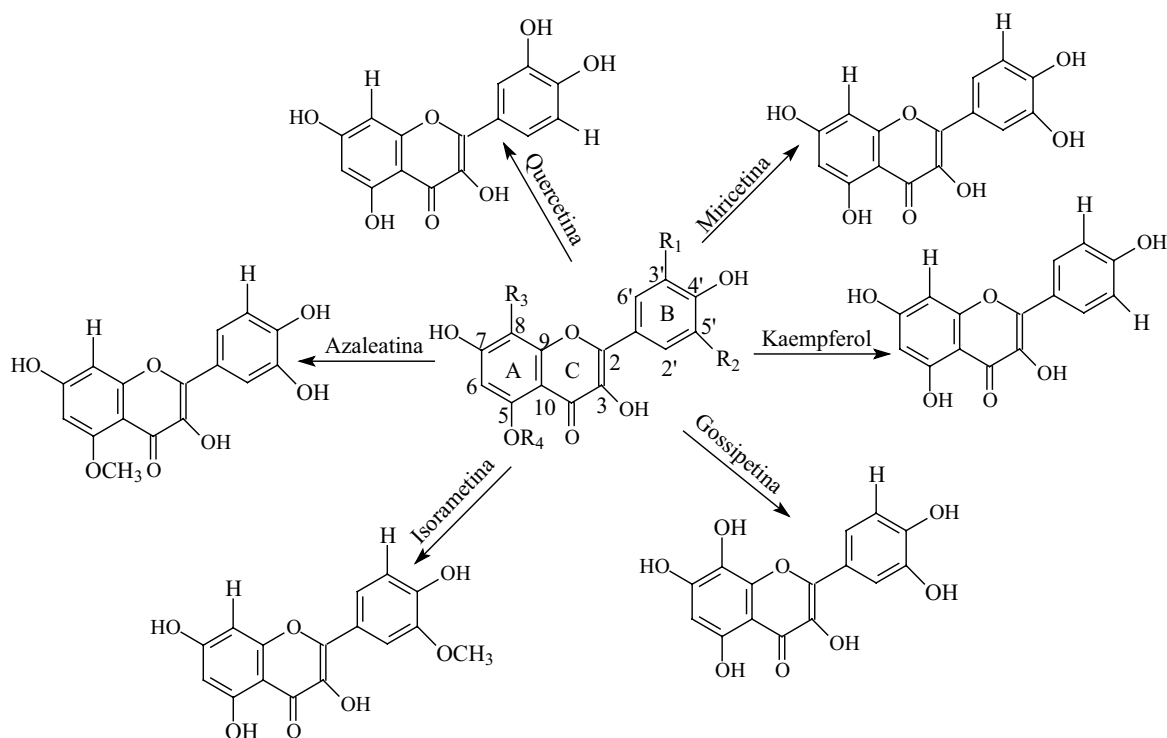


Figura 1. Representação dos flavonóis mais comuns

A quercetina é capaz de formar complexos com íons alumínio (Al^{3+}) (10) e há indícios de que elevadas concentrações de íons alumínio atuem como neurotoxinas, implicando em distúrbios neurológicos como o Alzheimer (11, 12). Sun e cols. (2016) descreveram a preparação de nanopartículas a base de quercetina, reduzindo os efeitos colaterais do Alzheimer (13). A literatura descreve a detecção de quercetina em várias plantas, utilizando diversos métodos e técnicas de análise (14-19), dentre elas a espectroscopia de ultravioleta (16, 20).

Esse trabalho tem como objetivo identificar a presença do flavonoide quercetina em plantas, por meio da formação do complexo quercetina:alumínio, utilizando espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis). As amostras estudadas foram: quatro amostras de pétalas (P): azaleia branca (PAB) (*Rhododendron* sp.), azaleia magenta (PAM) (*Rhododendron* sp.), lírio amarelo quei-

mado (PLA) (*Lilium* sp.) e dente-de-leão amarelo (PDL) (*Taraxacum* sp.); três amostras de folhas (F): babosa (FBB) (*Aloe* sp.), laranja (FLA) (*Citrus* sp.) e lima (FLI) (*Citrus* sp.); e duas amostras de cascas (C) de frutos: laranja (CLA) e lima (CLI). Para compreender a interação que ocorre entre a quercetina e o alumínio, foi determinada a constante de ligação entre a quercetina e íons Al^{3+} por meio de ajuste não linear.

MATERIAL E MÉTODO

Reagentes, extração da quercetina e curva de calibração.

Foram utilizados os reagentes quercetina (Quercegen, 98,0%), cloreto de alumínio hexa-hidratado ($AlCl_3 \cdot 6 H_2O$, Neon, 97,0%), ácido acético, metanol (Vetec, \geq

99,0%) e ácido clorídrico (Vetec, 37,0%). Todos os reagentes e solventes foram utilizados sem purificação prévia. Foi pulverizado 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) de cada amostra, transferido para um erlenmeyer, com adição de 25 mL de solução metanólica acidulada (MeOH, 1% HCl), mantida à temperatura de 85 ± 5 °C durante 5 horas (21). Os extratos obtidos foram filtrados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, e o volume foi completado com metanol. Em seguida, uma alíquota de 2 mL de cada extrato foi transferida para uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, e diluída para 3 mL ($13,33$ g L⁻¹) com metanol:ácido acético:AlCl₃. Para o preparo dessa solução foi utilizado 0,02 g de cloreto de alumínio (2000 mg L⁻¹; $8,28 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) dissolvido em 20 mL de solução de metanol:ácido acético (MeOH:AA 1:19 v/v) (22).

Para a determinação da concentração de quercetina nas amostras, foram construídas duas curvas de calibração utilizando como técnica de análise a espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis). Os espectros foram adquiridos em um espectrofotômetro PerkinElmer, Lambda 365, entre 350 e 550 nm. Foram preparadas duas soluções:

Solução A: Solução de AlCl₃, concentração de $8,28 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (2000 mg L⁻¹) dissolvido em MeOH:AA (1:19), contendo quercetina, concentração de $4,94 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (100 mg L⁻¹).

Solução B: Solução de AlCl₃ de $8,28 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (2000 mg L⁻¹) dissolvido em MeOH:AA (1:19), na ausência de quercetina.

As curvas de calibração foram geradas com adições crescentes da *Solução A* à *Solução B*. O método avaliou a concentração de quercetina entre as concentrações de $4,94 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ ($9,99 \times 10^{-2}$ mg L⁻¹) e $2,62 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (5,30 mg L⁻¹). As curvas de calibração foram plotadas apenas para as amostras que continham quercetina (PAB e PAM), e apresentaram coeficientes de correlação (R²) de 0,99 ($\pm 0,069$) para PAB e 0,99 ($\pm 0,072$) para PAM. Ambas as curvas de calibração foram plotadas com 31 pontos. Durante a obtenção das curvas de calibração os frascos e a cubeta de quartzo permaneceram hermeticamente fechados com tampas de borracha para evitar a evaporação do solvente, a 25 °C. A curva de calibração para a amostra PAB foi plotada em 422,0 nm e para a amostra PAM em 430,0 nm.

Determinação da constante de ligação e da estequiometria do complexo formado.

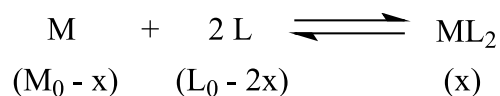
Solução estoque: Para determinar a constante de ligação foram preparados 5 mL de solução estoque de quercetina ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) em metanol.

Solução 1: Para o preparo da solução de quercetina 4×10^{-5} mol L⁻¹, foi transferida uma alíquota de 40 µL da solução estoque para um balão volumétrico de 10 mL, contendo NaCl para ajustar a força iônica do meio ($I = 0,1$ mol L⁻¹), completando o volume com metanol.

Solução 2: A solução de AlCl₃ foi preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em um balão volumétrico de 5 mL de AlCl₃ a partir da *Solução 1*.

Em seguida, 2 mL da *Solução 1* foram adicionados em uma cubeta de quartzo hermeticamente fechada com tampa de borracha para evitar a evaporação do solvente, a 25 °C. Com o auxílio de uma micropipeta, a *Solução 2* foi adicionada gradativamente à cubeta contendo a *Solução 1*, para obtenção dos espectros. Os dados espectrais foram coletados e analisados de acordo com as Equações 1 e 2, descritas por Castro e Blanco (2004) (23), que se referem à estequiometria 2:1, sendo:

Equação 1.



Onde M é a concentração do AlCl₃; L a concentração de quercetina e ML_2 a concentração do complexo formado. M_0 representa a concentração molar de AlCl₃ no início do experimento, L_0 concentração molar de quercetina no início do experimento e x representa a concentração molar do complexo quercetina:alumínio formado.

A constante de ligação (k) foi calculada a partir da Equação 2.

Equação 2.

$$\frac{A_e}{l \cdot M_0} = \varepsilon_C + \frac{2(\varepsilon_L - \varepsilon_C)}{(4k)^{1/3}} \cdot \frac{1}{(M_0)^{2/3}}$$

Onde: ε_L é a absorvidade molar do ligante; ε_C a absorvidade molar do metal; l a distância do caminho óptico (1 cm); e A_e a absorvância coletada no comprimento de onda máximo. A constante de ligação foi calculada a partir do ajuste não linear dos dados, tendo A_e no eixo y versus M_0 no eixo x.

Para a determinação da estequiometria do complexo formado, foi utilizado o método de Job (método das variações contínuas). Para isso, foram preparadas solu-

ções equimolares de AlCl_3 e quercetina em metanol ($4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), contendo NaCl ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para manter constante a força iônica do meio. Em seguida, a partir dos comprimentos de onda máximos (λ_{max}) em 429,3 nm foram plotadas as intensidades de absorção máximas de cada mistura *versus* as frações molares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da solução MeOH:AA:AlCl_3 confirma a presença de quercetina pelo deslocamento da banda de absorção principal da quercetina, entre 360-370 nm para maiores comprimentos de onda, entre 420-430 nm (deslocamento batocrômico). Os testes foram realizados para as amostras: PAB, PAM, PLA, PDL, FBB, FLA, FLI, CLA e CLI e o batocromismo foi observado apenas para as amostras PAB e PAM, indicando a presença de quercetina quantificável por este método apenas para estas duas amostras. Os deslocamentos batocrômicos foram de 57 nm para PAB (de 365,0 nm para 422,0 nm) e de 61 nm para PAM (de 369,0 nm para 430,0 nm). O deslocamento batocrômico ocorre devido ao cátion alumínio formar complexos estáveis com flavonoides em methanol, provocando alteração na região da banda absorção do anel B da quercetina (24, 25). As concentrações de quercetina, para cada grama de pétalas, foram de $0,163 \text{ mg g}^{-1}$ ($2,20 \text{ mg L}^{-1}$; $1,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) para PAB e $1,95 \text{ mg g}^{-1}$ ($5,20 \text{ mg L}^{-1}$; $2,57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) para PAM. Cao e cols. (18) determinaram a concentração de $5,13 \text{ mg L}^{-1}$ de quercetina em *Rhododendron dauricum* L. e Liu e cols. (19) identificaram a presença de oito diferentes tipos de quercetina glicosilada em dez espécies de *Rhododendron* contendo concentrações de quercetina por grama de amostra entre $3,8 \text{ mg g}^{-1}$ e 844 mg g^{-1} .

Esse comportamento pode ser observado devido à formação de um complexo entre a quercetina e os íons Al^{3+} . Uma investigação acerca da estequiometria entre íons Al^{3+} e quercetina foi realizada, baseada no Método de Job (método das variações contínuas).

O experimento foi realizado plotando o espectro de UV-Vis de quercetina em metanol na presença e na ausência de íons Al^{3+} , utilizando NaCl para manter a força iônica do meio constante ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Os dados coletados indicaram que a quercetina exibe uma forte banda máxima de absorção em 371,6 nm. A adição de íons Al^{3+} à solução provocou o decréscimo da banda de absorção em 371,6 nm, com formação de nova banda de absorção em 429,3 nm (Figura 2). Os dados coletados

em 429,3 nm geraram o gráfico de Job que indicou a razão molar de 0,68, definindo a razão estequiométrica do complexo Que:Al formado de 2:1 (Figura 2, *projeção interna*), conforme também descrito por Cornard e Merlin (2002) (10).

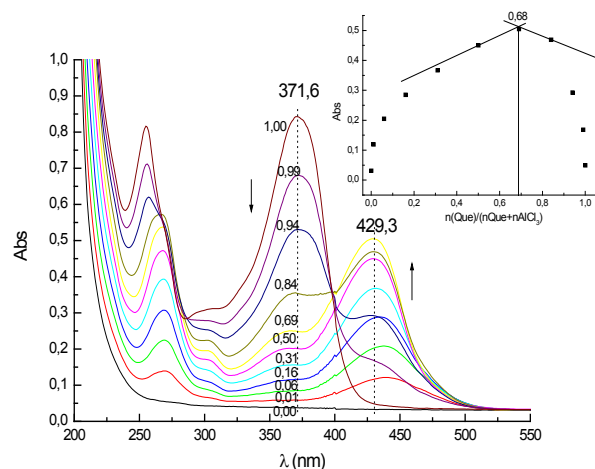


Figura 2. Espectros de UV-Vis da quercetina em metanol na presença e na ausência de íons Al^{3+} . As razões molares entre Que/ Al^{3+} são indicadas em cada espectro. Projeção interna: Gráfico de Job entre a quercetina (Que) e Al^{3+} (AlCl_3) em 429,3 nm.

Para a determinação da constante de ligação, a concentração de quercetina foi mantida constante, $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração máxima de Al^{3+} adicionada ao final do experimento $4,59 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, o que implica em uma concentração de 11,49 vezes maior de Al^{3+} em relação à concentração de quercetina (Figura 3). A adição de Al^{3+} provocou um decréscimo da banda de absorção em 371,6 nm e o surgimento de uma nova banda de absorção em 429,3 nm, com presença de ponto isobéstico em 392,8 nm, que foi nítido até que a concentração fosse equimolar entre quercetina e Al^{3+} . Quando a concentração de Al^{3+} passou a ser 2,27 vezes maior que a concentração de quercetina, começou a surgir um ponto isobéstico em 434,0 nm e o aparecimento de uma terceira banda de absorção, em 448,4 nm (Figura 3).

A partir da Equação 2 (23), descrita para estequiometria 2:1, foi possível obter uma constante de ligação de $3,94 \pm 0,34 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ ($\chi^2 = 2,72 \times 10^{-2}$), a partir de um ajuste não linear (Figura 4). O ajuste foi realizado para as absorbâncias em 371,6 nm (A_e), região que indica o desaparecimento da quercetina livre; em 429,3 nm (A_e) e em 448,4 nm (A_e), regiões que indicam com-

plexação entre quercetina e alumínio. A constante que apresentou o melhor ajuste a partir da Equação 2, com menor χ^2 , foi obtida em $\lambda_c = 429,3$ nm (Figura 4).

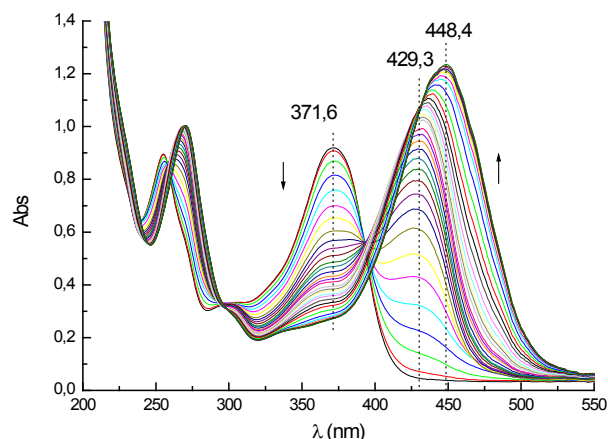


Figura 3. Espectros de UV-Vis de quercetina e cloreto de alumínio (Que:Al) em metanol, a 25 °C, após adições crescentes de AlCl_3 , sendo a concentração de quercetina constante, 4×10^{-5} mol L^{-1} .

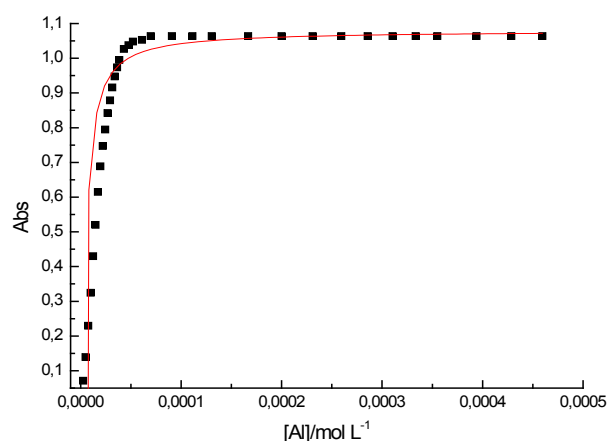


Figura 4. Variação da absorbância em 429,3 nm pela adição de íons Al^{3+} à solução contendo quercetina. A concentração de quercetina se manteve constante (4×10^{-5} mol L^{-1}) e a concentração de Al^{3+} máxima foi de $4,59 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} .

Simões (2001) descreveu o potencial efeito inibidor sobre a peroxidação microsomal de lipídeos (atividade antioxidante) que a quercetina e outros flavonoides apresentam (26). No entanto, as plantas do gênero *Rhododendron* apresentam efeito toxicológico devido à presença de diterpenos derivados do andromedano, de ação cardiotoxicidade, presentes em todas as partes da planta (26). Isso impede o uso da planta para chás, por exemplo, mas ela mostra ser um removedor natural de íons Al^{3+} de águas e solos, podendo ser chamado de um “adsorvente verde”. Esse estudo indicou que PAB e PAM podem remover 0,18 mg de Al^{3+} para cada mg de quercetina, contida em extratos sólidos. Em amostras líquidas, a PAB pode remover 2,41 mg e a PAM 0,48 mg de íons Al^{3+} para cada mg de quercetina.

CONCLUSÃO

Foi possível identificar a presença de quercetina em azaleia branca e azaleia magenta por meio da formação do complexo quercetina:alumínio, utilizando espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis). A estequiometria entre alumínio e quercetina foi 2:1 com uma constante de ligação de $3,94 \pm 0,34 \times 10^3$ mol L^{-1} , a partir de ajuste não linear. Estudos que viabilizem o uso desta técnica no monitoramento de quercetina em plantas por meio do complexo alumínio-quercetina se mostram promissores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Federal do Paraná (IFPR), ao Programa Institucional de Apoio à Pesquisa (PIAP/IFPR – Edital 011/2016) pelo suporte financeiro e ao PIBIC/IFPR pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

1. Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analyses. 3th ed.: Chapman & Hall: London. 1998, cap. 2.
2. Dmitrienko S, Kudrinskaya V, Apyari V. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J. Anal. Chem.*, 2012; 67(4): 299-311. DOI: 10.1134/S106193481204003X.
3. Hollman PC, Gaag MV, Mengelers MJ, Van Trijp JM, De Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Bio. Med.*, 1996; 21(5): 703-707. DOI: 10.1016/0891-5849(96)00129-3.
4. Oliveira MR, Nabavi SM, Braidy N, Setzer WN, Ahmed T, Nabavi SF. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnol. Adv.*, 2016; 34(5): 532-549. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.014.
5. Solimani R. The flavonols quercetin, rutin and morin in DNA solution: UV-vis dichroic (and mid-infrared) analysis explain the possible association between the biopolymer and a nucleophilic vegetable-dye. *Bio. Chim. Biophys. Acta*, 1997; 1336(2): 281-294. DOI: 10.1016/S0304-4165(97)00038-X.
6. Das A, Majumder D, Saha C. Correlation of binding efficiencies of DNA to flavonoids and their induced cellular damage. *J. Photochem. Photobiol., B*, 2017; 170(256-262). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.019.
7. Formica J, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.*, 1995; 33(12): 1061-1080. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00077-1.
8. Klimaszewska-Wiśniewska A, Hałas-Wiśniewska M, Izdebska M, Gagat M, Grzanka A, Grzanka D. Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton. *Acta Histochem.*, 2017; 119(2): 99-112. DOI: 10.1016/j.acthis.2016.11.003.
9. Li F, Sun X-Y, Li X-W, Yang T, Qi L-W. Enrichment and separation of quercetin-3-O- β -d-glucuronide from lotus leaves (*Nelumbo nucifera gaertn.*) and evaluation of its anti-inflammatory effect. *J. of Chromatogr. B*, 2017; 1040(186-191). DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.12.017.
10. Cornard J, Merlin J. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al (III). *J. Inorg. Biochem.*, 2002; 92(1): 19-27. DOI: 10.1016/S0162-0134(02)00469-5.
11. Exley C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? *What is the risk of aluminium as a neurotoxin?*, 2014; 14(6): 589-591.
12. Pogue AI, Lukiw WJ. Aluminum, the genetic apparatus of the human CNS and Alzheimer's disease (AD). *Morphol.*, 2016; 100(329): 56-64. DOI: 10.1016/j.morpho.2016.01.001.
13. Sun D, Li N, Zhang W, Zhao Z, Mou Z, Huang D, Liu J, Wang W. Design of PLGA-functionalized quercetin nanoparticles for potential use in Alzheimer's disease. *Colloid Surface B*, 2016; 148: 116-129. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.052.
14. Moreira FPM, Coutinho V, Montanher ABP, Caro MSB, Brighente IMC, Pizzolatti MG, Monache FD. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia*: bioactivity on *Artemia salina*. *Quim. Nova*, 2003; 26(3): 309-311. DOI: 10.1590/S0100-40422003000300004.
15. Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: Influence of sample pretreatment on composition. *Talanta*, 2015; 144(-): 349-355. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.05.054.
16. Nickavar B, Amin G, Mehregan N. Quercetine, a Major Flavonol Aglycon from *Tanacetum balsamita* L. *Iran J. Pharm. Res.*, 2010; 249-250.
17. Lombard KA, Geoffriau E, Peffley E. Flavonoid quantification in onion by spectrophotometric and high performance liquid chromatography analysis. *Hortscience*, 2002; 37(4): 682-685.
18. Cao Y, Lou C, Fang Y, Ye J. Determination of active ingredients of *Rhododendron dauricum* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 2002; 943(1): 153-157. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01434-0.
19. Liu L, Zhang L-Y, Wang S-L, Niu X-Y. Analysis of anthocyanins and flavonols in petals of 10 *Rhododendron* species from the Sygera Mountains in Southeast Tibet. *Plant Physiol. Bioch.*, 2016; 104: 250-256. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.03.036.
20. Silva LAL, Pezzini BR, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) leaves. *Phcog. Mag.*, 2015; 11(41): 96. DOI: 10.4103/0973-1296.149721.
21. Kurzawa M. Determination of quercetin and rutin in selected herbs and pharmaceutical preparations. *Anal. Lett.*, 2010; 43(6): 993-1002. DOI: 10.1080/00032710903491070.