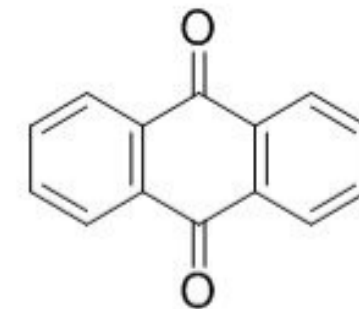




Antraquinona

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO DOS TEORES DE ANTRAQUINONA EM ERVA-MATE

Equipe de Pesquisadores

Dr^a Alice Teresa Valduga

Dr. Edy Sousa de Brito

Dr. Gustavo Saavedra

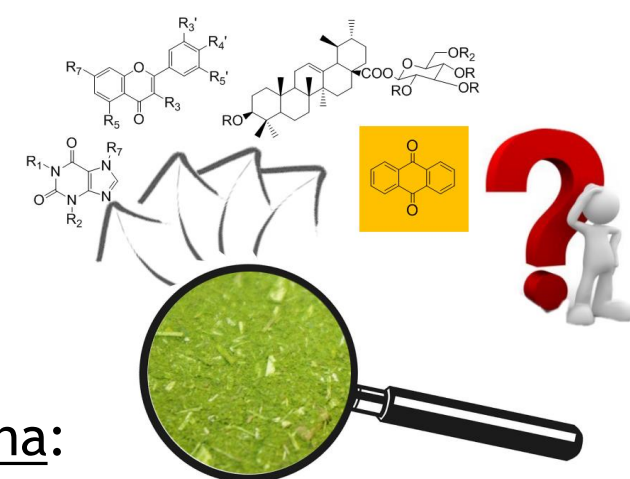
Dr. Rogério Marcos Dallago

Doutorando Itamar Luíz Gonçalves

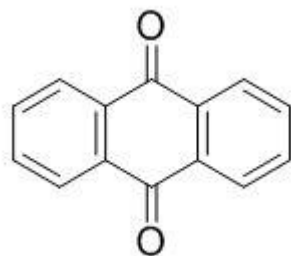
Doutoranda Bruna Maria Saorin Puton

Porto Alegre, 26 de agosto de 2019

Introdução



Aplicações tecnológicas do composto químico antraquinona:



Antraquinona

Agente branqueador na indústria do papel

(HART; RUDIE, 2014)

Repelente de pássaros

(WERNER et al., 2009, WERNER et al., 2011)

Contaminante em esgoto (KOLPIN et al., 2004), embalagens de papel (YANG et al., 2015) e ar atmosférico (LAYSHOCK et al., 2010).

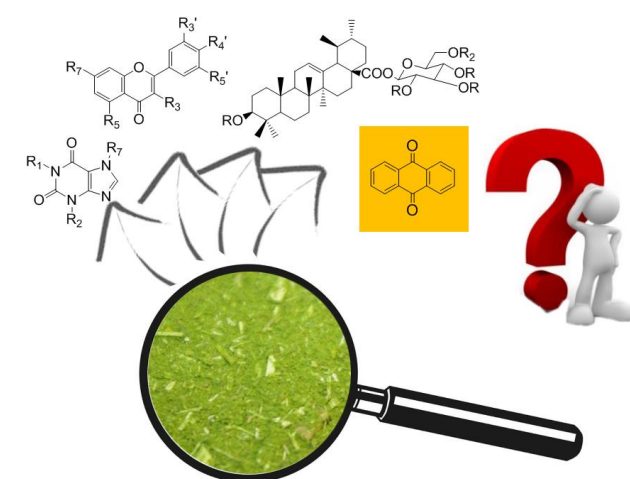
Introdução

Compostos Antracênicos

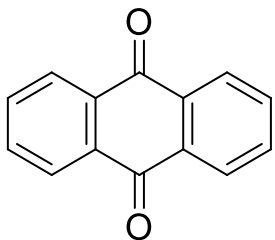
Na literatura são conhecidas aproximadamente 700 estruturas que possuem como núcleo a antraquinona (anthraceno-9,10-diona), identificadas em espécies vegetais na forma livre ou glicosídica.

Essa grande variedade torna difícil relacionar os efeitos das antraquinonas sobre a saúde humana, sendo está associada com diversas propriedades farmacológicas.

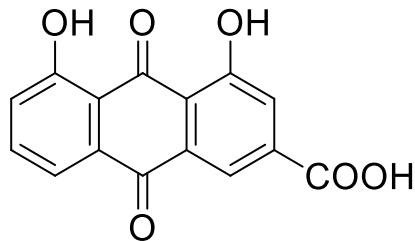
(HUANG et al., 2007)



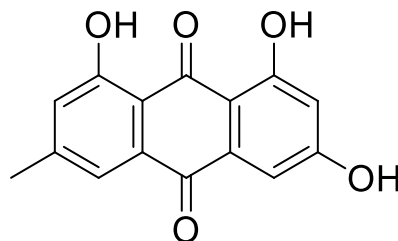
Introdução



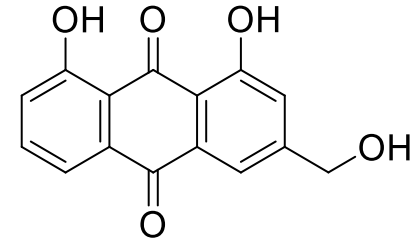
Antraquinona **1**



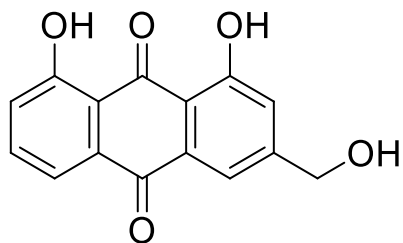
Rhein **2**
(*Rheum rhabarbarum*)



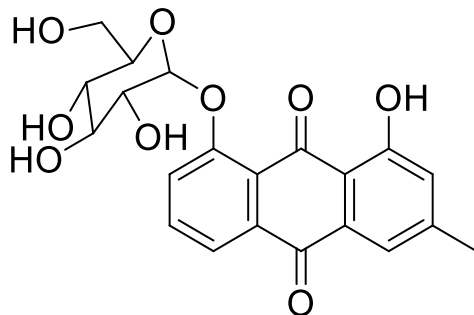
Emodin **3**
(*Cassia obtusifolia*)



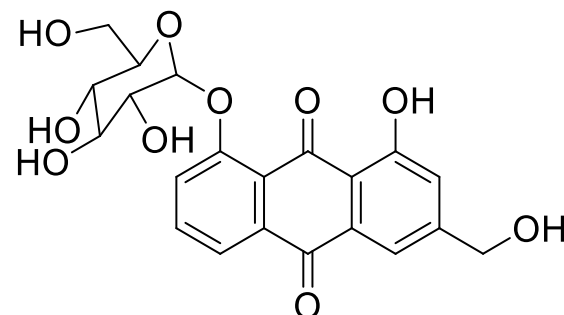
Aloe-emodin **4**
(*Rheum rhabarbarum*)



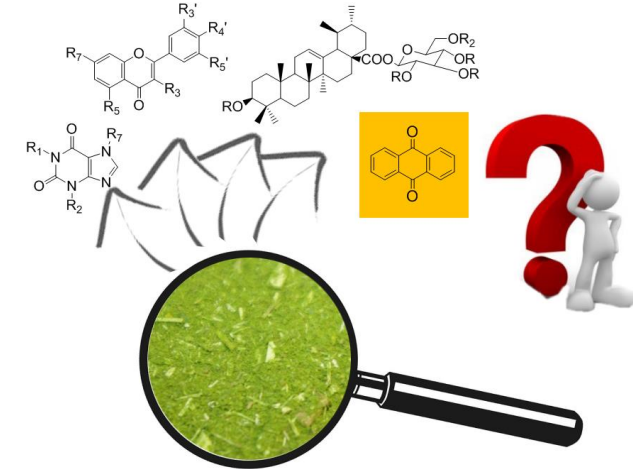
Psyscion **5**
(*Rheum officinale*)



Chrysophanol-8-O-glucoside **6**
(*Rheum rhabarbarum*)



Aloe-emodin-8-O-glycoside **7**
(*Rheum officinale*)



Estrutura geral da antraquinona, e antraquinonas encontradas em diferentes espécies vegetais.⁴

Introdução

Estudos correlacionam altas concentrações de antraquinonas a efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

(KAGEDAL; BIRONAITE; OLLINGER, 1999)

Antraquinonas podem intercalar-se com o DNA, devido a sua estrutura tricíclica.

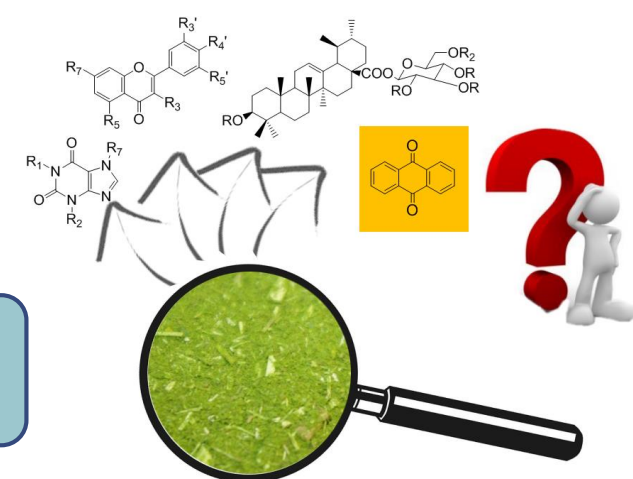
(YANG et al., 2011)

Formação de tumores intestinais em ratos após a exposição à *Aloe vera* foram relacionados a antraquinonas convertidas em componentes mutagênicos no intestino.

(NTP, 2011)

Plantas que possuam presença de antraquinonas tornam-se alvo de estudos de toxicidade.

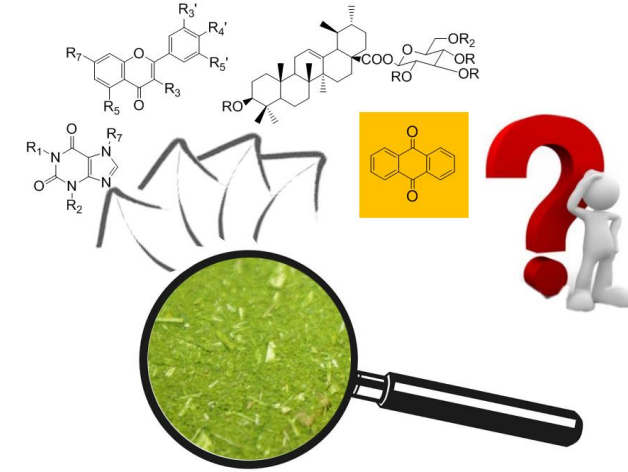
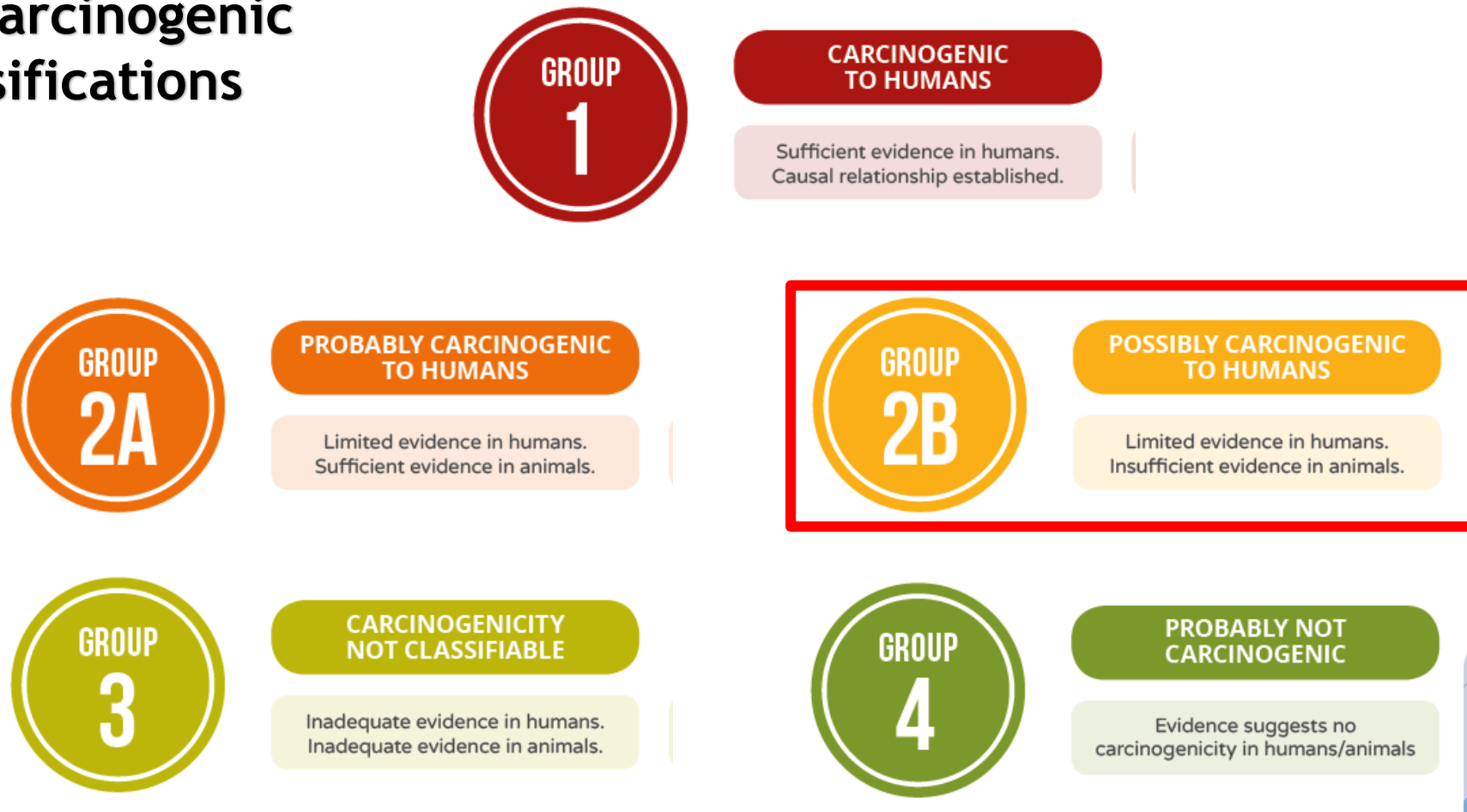
(DUNNICK; NYSKA, 2013)



Introdução

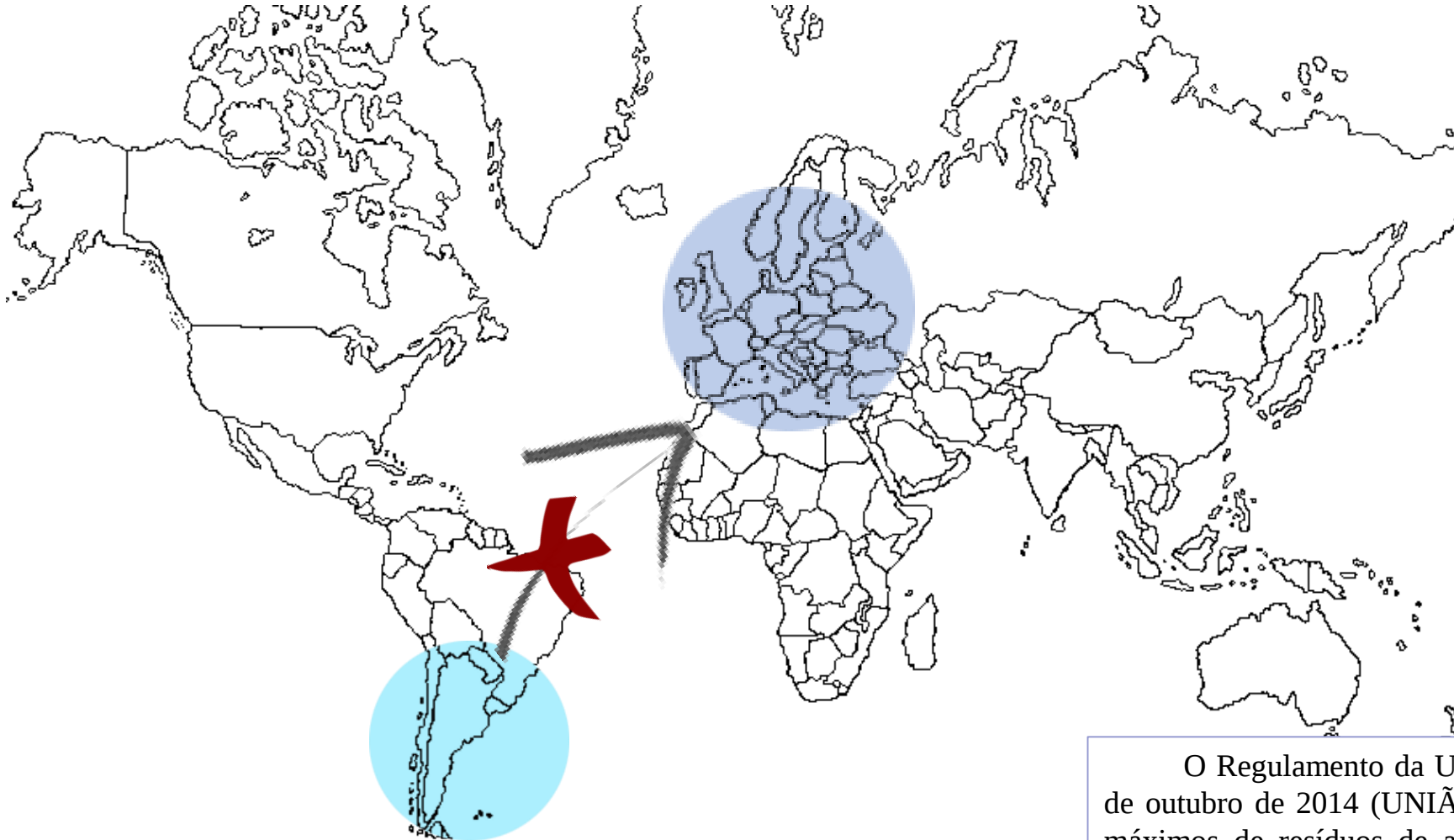
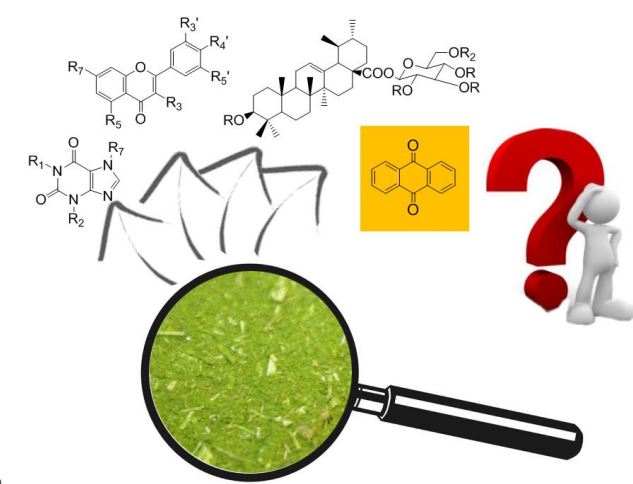
Aspectos Toxicológicos

IARC carcinogenic classifications



Introdução

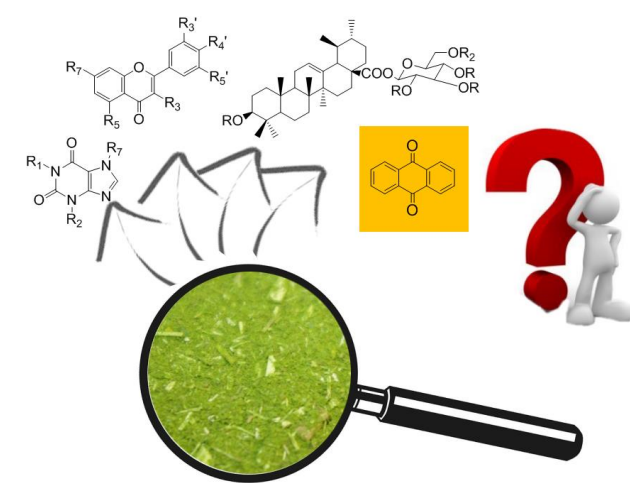
Antraquinona no mundo: aspectos legais



O Regulamento da União Europeia (UE) nº 1146/2014, de 23 de outubro de 2014 (UNIÃO EUROPEIA, 2014), define os limites máximos de resíduos de antraquinona e de outras substâncias no interior e na superfície de determinados produtos, como chás, infusões e mate o limite máximo de antraquinona de 0,02 mg/kg.

Identificação do objeto

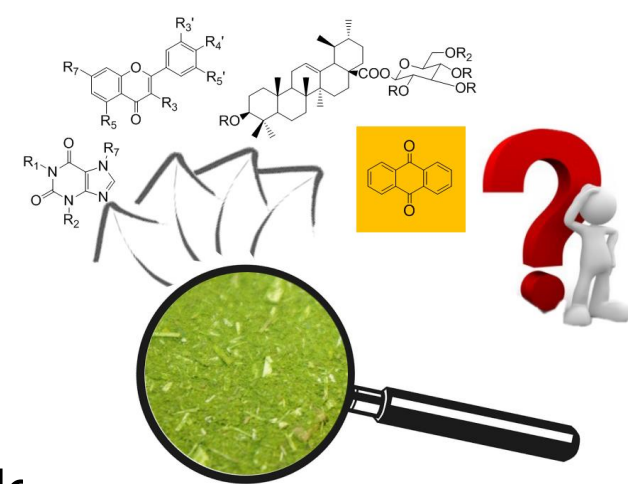
Desenvolvimento e adequação de tecnologia para a identificação das origens de antraquinona na erva-mate, através do rastreamento da procedência em amostras, e sua correlação com os respectivos teores do composto.



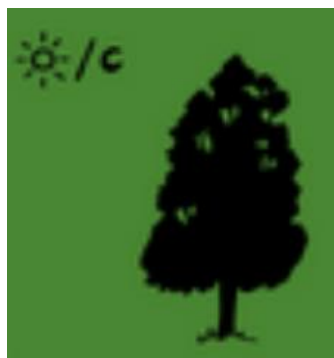
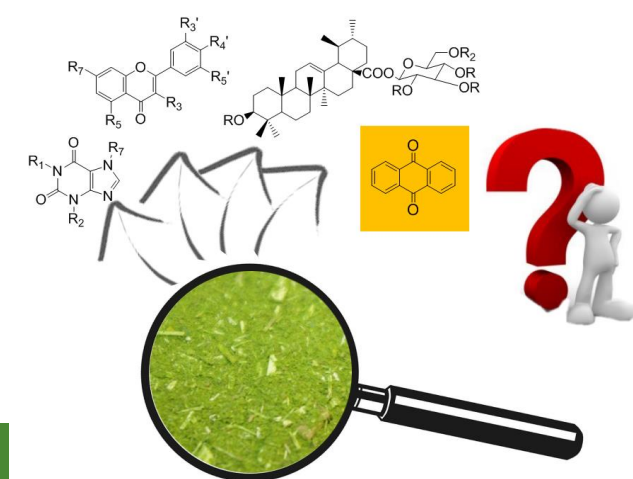
Justificativa da proposição

Recentemente, foram identificados teores alterados de antraquinona em amostras de erva-mate.

Até o momento não foram identificadas as possíveis causas, entretanto visando garantir segurança alimentar a indústria necessita de um plano de estudo para identificar fatores associados ao problema, e buscar orientações, relacionadas à conduta mais adequada a ser adotada no cultivo, manejo e processamento de erva-mate.



Antraquinona?



Maturação (etapa adicional)

Degradação dos pigmentos vegetais



6 – 12 meses

Metodologia

► Obtenção das amostras

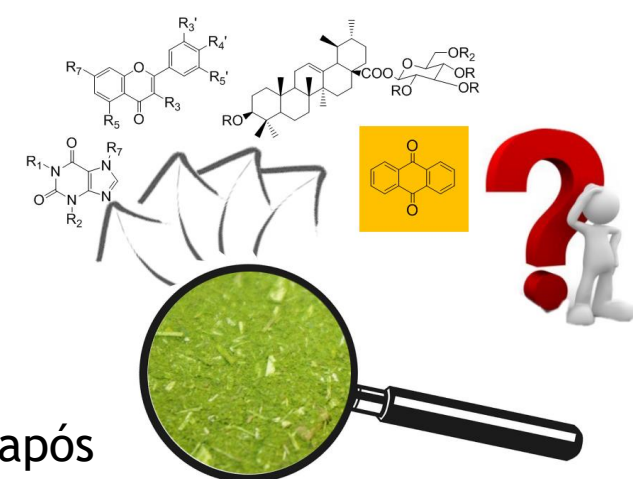
Serão analisados os níveis de antraquinona em folhas de erva-mate *in natura*, após determinadas etapas do processamento, e durante a vida de prateleira do produto destinado ao consumidor.

Estas amostras serão obtidas no momento em que a matéria prima é entregue à indústria, e em diferentes etapas de seu processamento.

O mesmo procedimento será realizado para análise de amostras originárias de diferentes locais.

Todas as amostras serão coletadas em triplicata, e os resultados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

As amostras serão por nós analisadas no convenio URI/Laboratório da EMBRAPA Agroindústria Tropical Fortaleza.



Metodologia

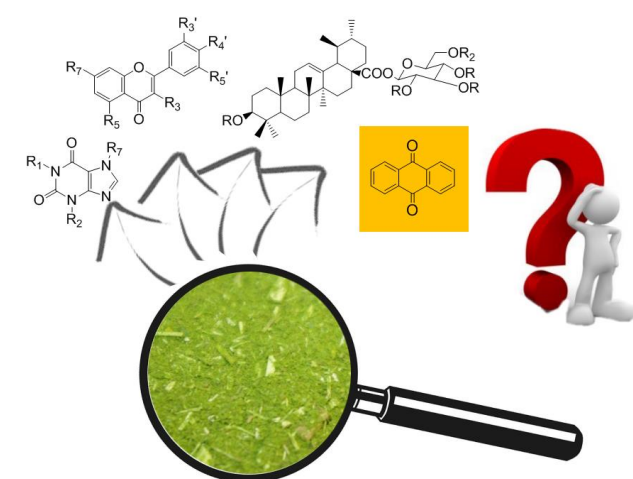
► Extração

► Extração em Refluxo (ER)

Para a extração utilizada será a extração em refluxo, com base no método documentado na literatura (JIANG et al, 2019).

► Extração com líquido pressurizado (ELP)

O procedimento a ser utilizado foi baseado em Wang et al (2016).



Metodologia

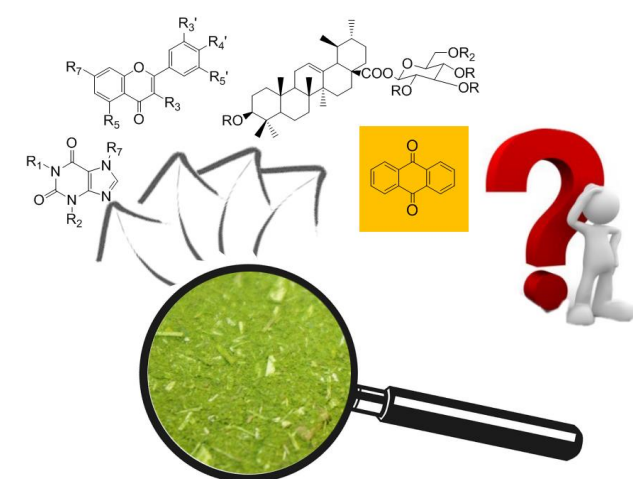
► Identificação das antraquinonas

Para saber quais antraquinonas estão presentes nas amostras será feita uma varredura em LC-MS usando um equipamento de alta resolução (sistema UPLC-QToF). Será utilizada metodologia padrão adotada no LMQPN da Embrapa (LUZ et al, 2018).

► Quantificação por HPLC-UV

As análises cromatográficas de antraquinonas serão realizadas em cromatografo líquido Shimadzu usando um detector DAD, com comprimento de onda fixo em 440 nm (Jiang et al, 2019).

Será preparada uma solução estoque em metanol, contendo os padrões de antraquinonas identificadas previamente para preparação das curvas de calibração.



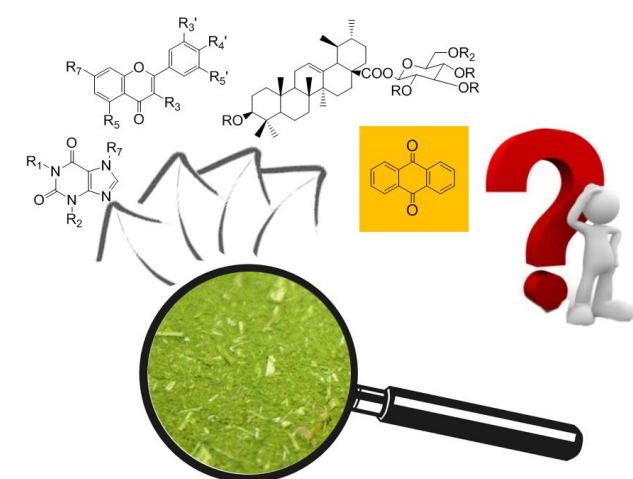
Metodologia

► Validação do Procedimento Analítico

A linearidade será avaliada através da análise de uma série de concentrações de solução padrão mista.

A repetibilidade do método será avaliada a partir de seis repetições da mesma amostra. A recuperação será determinada pelo método de adição de padrão.

Padrões, incluindo baixa e alta concentração serão adicionados a certa quantidade de erva-mate em pó. As amostras serão extraídas e analisadas com o método proposto.



Metodologia

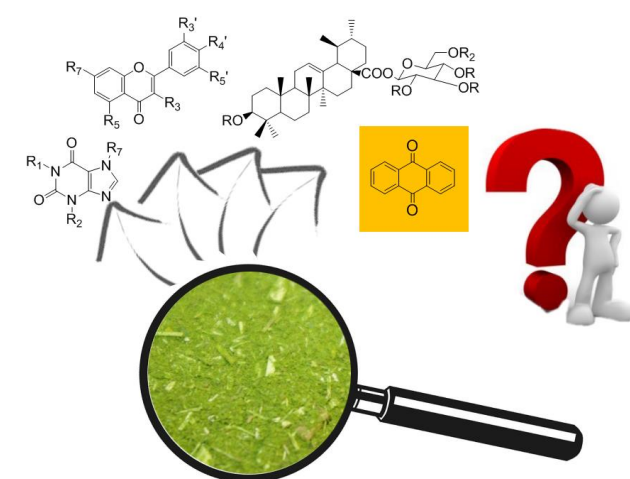
► Análise dos dados

Valores médios de antraquinona encontrados nas amostras, em instantes anteriores e posteriores à determinadas etapas do processamento, serão comparadas pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey adotando 5% como intervalo de confiança.

A comparação de médias será efetuada no software GrapPad Prism 6.0. Técnicas de análise multivariada serão empregadas para avaliar correlação entre localização geográfica em que as amostras forem obtidas e teores de antraquinonas.

► Visita à produtores e indústrias

Mediante a detecção de níveis alterados de antraquinona, produtores/indústria serão contatados, para responderem um questionário relacionado ao cultivo, manejo ou processamento. Esta medida tem por finalidade reorientar coletas consecutivas de amostras.



Orçamento

Quadro 1 - Orçamento detalhado das despesas.

Despesas diversas	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Deslocamento (Xap-For)	12 viagens	1.200,00	14.400,00
Estadia para coleta/viagens Fortaleza	130 diárias	180,00	23.400,00
Alimentação	130	50,00	6.500,00
Deslocamento para coletas	6.200 km	1,70	10.540,00
Padrões	6		16.140,00
Consumíveis para cromatografia (filtros, vials e solventes)	diversos		12.000,00
Serviço de terceiro PJ (manutenção UPLC)	-		17.000,00
Impressora	1	1.600,00	1.600,00
Computador	1	3.560,00	3.560,00
Software	3	1.200,00	3.600,00
Total			108.740,00

Cronograma

Quadro 2 - Cronograma de execução das atividades propostas.

Ano	2019	2020	2021		2022		2023		
Semestre	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Planejamento	x								
Discussões e indicadores de metodologias de análise		x	x						
Metaboloma da erva-mate			x	x					
Coleta de amostras		x	x						
Teste piloto		x	x	x					
Pré-preparo de amostras		x	x						
Elaboração dos extratos		x	x						
Validação da metodologia				x	x	x			
Análises de teores de antraquinonas				x	x	x			
Tratamento estatístico						x	x		
Discussão de resultados						x	x	x	
Elaboração de relatórios							x	x	x

Referências

- ▶ DUNNICK, J.K.; NYSKA, A. The toxicity and pathology of selected dietary herbal medicines. **Toxicologic Pathology**, v. 41, p. 374-386, 2013.
- ▶ HART, P.W.; RUDIE, A.W. Anthraquinone-A review of the rise and fall of a pulping catalyst. **Review Process: Informally Refereed (Peer-Reviewed)**, 2014.
- ▶ HUANG, G. et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 5, 2007.
- ▶ JIANG, L. et al. New vortex-synchronized matrix solid-phase dispersion method for simultaneous determination of four anthraquinones in cassiae semen. **Molecules**, v. 24, p. 1312, 2019.
- ▶ KAGEDAL, K.; BIRONAITE, D.; OLLINGER, K. Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. **Free Radical Research**, v. 31, n. 5, p. 419-428, 1999.
- ▶ KOLPIN, D.W. et al. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment**, v. 328, n. 1, p. 119-130, 2004.
- ▶ LAYSHOCK, J.A.; WILSON, G.; ANDERSON, K.A. Ketone and quinone-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue, sediment, urban dust, and diesel particulate matrices. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2450-2460, 2010.
- ▶ LUZ, L.R. et al. Metabolomic profile of *Schinopsis brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for identification of biomarkers and evaluation of its cytotoxic potential. **Journal of Chromatography B**, v. 1099, p. 97-109, 2018.
- ▶ NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of anthraquinone (CAS No. 84-65-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Studies). **National Toxicology Program technical report series**, v. 494, n. 1, 2005.
- ▶ UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (UE) nº 1146/2014**, de 23 de outubro de 2014, altera os anexos II, III, IV e V do Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos de resíduos de antraquinona, benfluralina, bentazona, bromoxinil, clortalonil, famoxadona, imazamox, brometo de metilo, propanil e ácido sulfúrico no interior e à superfície de determinados produtos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 29 de outubro de 2014.
- ▶ WANG, N. et al. Investigation of six bioactive anthraquinones in slimming tea by accelerated solvent extraction and high performance capillary electrophoresis with diode-array detection. **Food Chemistry**, v. 199, p. 1-7, 2016.
- ▶ WERNER, S.J. et al. Threshold concentrations of an anthraquinone-based repellent for Canada geese, red-winged blackbirds, and ring-necked pheasants. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 121, n. 3, p. 190-196, 2009.
- ▶ WERNER, S.J. et al. Anthraquinone-based bird repellent for sunflower crops. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 129, n. 2, p. 162-169, 2011.
- ▶ YANG, K.-R. et al. A HT column GC/MS method for the determination of anthraquinone and its toxic impurities in paper products. **Analytical Methods**, v. 7, n. 15, p. 6060-6065, 2015.
- ▶ YANG, X.M. et al. Evaluation of the potential toxicity of anthraquinone derivatives in Chinese herbal medicines by the resonance light scattering spectrum. **Asian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 3631-3634, 2011.

Obrigada pela Atenção!

Dr^a. Alice Teresa Valduga

valice@uricer.edu.br