



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



Avaliação da recuperação de compostos bioativos das folhas do Peixinho da horta (*Stachys byzantina*) extraídos com o uso de solventes eutéticos profundos naturais

*Evaluation of the recovery of bioactive compounds from the leaves of fish from the garden (*Stachys byzantina*) extracted using natural deep eutectic solvents*

Caroliny Fernanda Batista da Silva*, Leila Larisa Medeiros Marques[†],
Pamela da Silva Souza[‡], Stefanie Calisto Casarin[§],
Flávia Aparecida Reitz Cardoso[¶], Paulo Agenor Alves Bueno[‡]

RESUMO

O presente estudo buscou avaliar a recuperação de compostos bioativos das folhas do Peixinho da horta (*Stachys byzantina*) com diferentes solventes. A espécie foi cultivada nos canteiros da UTFPR-CM durante 7 meses, suas folhas então foram colhidas e submetidas a higienização e secagem. Para extração de compostos bioativos foram utilizadas 5 combinações de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) adicionados de águas nas proporções de 10, 25 e 50%, além de água e etanol para fins de comparação. A extração assistida por ultrassom foi avaliada pelas metodologias de Folin-Ciocalteu para compostos fenólicos totais e por AlCl₃ para flavonoides totais. Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Os solventes superaram em até duas vezes o teor de recuperação de fenólicos quando comparado com dados da literatura. As combinações adicionadas de 50% destacaram-se na recuperação dos compostos bioativos, em ambas as análises. Os resultados deste trabalho demonstraram ainda, que os solventes verdes (NADES) são promissores e uma excelente alternativa para substituição dos solventes convencionais.

Palavras-chave: solventes eutéticos, PANC, compostos bioativos, antioxidantes, extração verde

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the recovery of bioactive compounds from the leaves of fish from the garden (*S. byzantina*) with different solvents. The species was cultivated in the UTFPR-CM beds for 7 months, its leaves were then harvested and submitted to cleaning and drying. For the extraction of bioactive compounds, 5 combinations of natural deep eutectic solvents (NADES) were used, added with water in the proportions of 10, 25 and 50%, in addition to water and ethanol for comparison purposes. Ultrasound-assisted extraction was evaluated by Folin-Ciocalteu methodologies for total phenolic compounds and by AlCl₃ for total flavonoids. The results were analyzed using the Tukey test at a significance level of 5%. The solvents surpassed up to twice the phenolic recovery content when compared to literature data. The added combinations of 50% stood out in the recovery of bioactive compounds in both analyses. They also demonstrated that green solvents (NADES) are promising and an excellent alternative to replace conventional solvents.

* Engenharia de alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; caroliny-rp@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; leilamarques@professores.utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; pamsouza2016@hotmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; stefaniec@alunos.utfpr.edu.br

[¶] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; flaviareitz@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; pabueno@professores.utfpr.edu.br



Keywords: eutectics solvents, UFP, bioactive compounds, antioxidants, green extraction

1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos estão presentes em alimentos como frutas, verduras e cereais, e possuem ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo assim, eficazes na proteção contra doenças, tais como doenças cardiovasculares e câncer (VIRGOLIN; SEIXAS; JANZANTTI, 2017). As fontes vegetais contêm numerosos fitoquímicos, metabólitos vegetais, destacando-se os compostos fenólicos, compostos nitrogenados, carotenoides, ácido ascórbico e os tocoferóis (PEREIRA; CARDOSO, 2012), com a diversidade natural de espécies tem-se muito campo para investigação.

A espécie *Stachys byzantina* K. Koch ou *Stachys lanata* L. é uma PANC (Planta alimentícia não convencional) conhecida popularmente como peixinho da horta, orelha de lebre, pulmonária ou lambari, pertence à família Lamiaceae (KINUPP; LORENZI, 2014). Estudos apontam a espécie *S. byzantina* como planta de uso medicinal com potencial antidiabético, antiobesidade, anti-alzheimer, antimicrobiano e potencial antioxidante (ERDEMOGLU et al., 2006; AZEVEDO, 2018).

A extração destes fitoquímicos com uso de solventes orgânicos tradicionais é a técnica tradicional mais empregada para obtenção de extratos bioativos de matrizes vegetais (NACZK; SHAHIDI, 2004). Apesar de possuírem baixo custo, os constituintes dos solventes tradicionais podem apresentar perigo químico aos alimentos. Entretanto, os denominados solventes ecológicos ou solventes eutéticos profundos naturais (NADES), são misturas de compostos que têm um ponto de fusão muito inferior ao de qualquer um de seus componentes individuais, principalmente devido à geração de ligações de hidrogênio intermoleculares (ABBOTT et al., 2003). Os NADES têm atraído muita atenção nos últimos anos como novos meios potenciais para tecnologia verde, destacando-se pelo fato de não serem tóxicos e que podem ser adaptados quanto à polaridade e seletividade para diferentes aplicações, estes solventes, já foram empregados para extração de vários compostos bioativos (BUBALO et al., 2016; ZHU et al., 2020).

Os compostos bioativos das folhas da *S. byzantina* já foram alvo de investigação em estudos que empregaram solventes convencionais na extração (ERDEMOGLU et al., 2006; AZEVEDO, 2018). Portanto, o presente estudo busca avaliar o potencial de recuperação de compostos bioativos obtidos por via dos solventes convencionais em comparação com os solventes eutéticos profundos naturais.

2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

2.1 Cultivo, colheita e tratamento da amostra

O cultivo das mudas de *Stachys byzantina* foi realizado na horta da Universidade de Tecnológica Federal do Paraná, no município de Campo Mourão, Paraná (-24.061773644682166, -52.385236560389735), seguindo as boas práticas de adubação orgânica, que utiliza elementos obtidos de compostagem, adubação verde e em solos muito degradados sugere o uso de complementação química em baixíssima concentração (PRIMAVESI, 1999). A colheita ocorreu no mês de abril de 2021, totalizando 8 meses de cultivo. Assim, foram coletados 1,7 kg de folhas saudáveis in natura de *Stachys byzantina* de diversas partes da planta.

Após a colheita as folhas da *S. byzantina* foram higienizadas em água corrente e levadas para secagem em estufa de circulação forçada (Cienlab), em condições de operação de 45°C por um período de 8 h, até atingir umidade entre 11-12%. Na sequência a amostra seca foi triturada em processador (Walita), e por fim, armazenadas em freezer a temperatura de -18°C.

2.2 Preparo solventes eutéticos



As combinações e proporções de doadores e aceitadores de ligação de hidrogênio empregados no preparo dos solventes eutéticos foram otimizadas a partir do trabalho de Zhu et al. (2020). Assim, as proporções molares, foram corrigidas de acordo com a relação da razão mássica para uma mistura binária (ω), onde $\omega_1 + \omega_2 = 1$ Eq. (1). As denominações de cada combinação, a razão molar e mássica, assim como o somatório estão dispostos na Tabela 1.

$$\omega_1 = \frac{x_1 \cdot M_1}{x_1 \cdot M_1 + x_2 \cdot M_2}$$

x_1 e x_2 = porcentagem elemento 1 e 2, respectivamente; M_1 e M_2 = massa molar elemento 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Combinações, razão molar e mássica para o preparo dos solventes eutéticos

Nome	Combinações		Razão Molar	Razão mássica Aceitador	Razão mássica Doador	Soma
	Aceitador	Doador				
CIC-Ala	Cloreto de colina	Ácido láctico	1:3	0,3407	0,6593	1
CIC-Ale	Cloreto de colina	Ácido levulínico	1:2	0,3755	0,6245	1
CIC-Gli	Cloreto de colina	Glicerol	1:3	0,3357	0,6643	1
LP-Ale	L-Prolina	Ácido levulínico	1:2	0,3315	0,6685	1
CIC-Xil	Cloreto de colina	Xilitol	1:1	0,4785	0,5215	1

Fonte: Autoria própria (2021).

Os solventes foram preparados seguindo metodologia proposta por Bubalo et al. (2016). Assim, os reagentes foram pesados na proporção mássica definida e a mistura foi levada para incubadora shaker (Solar), na temperatura de 80°C com agitação a 10 rpm até que se transforme em uma mistura de única fase, caracterizada pela coloração transparente livre de sólidos visíveis. Após preparo, os solventes foram resfriados em temperatura ambiente e receberam adição de água destilada, nas proporções de 10, 25 e 50%. Por fim, foram acondicionados em frascos âmbar, identificados e armazenados em dessecador.

2.3 Método de extração

As amostras foram submetidas a extração em banho ultrassônico (Elma), na temperatura de 50 °C, frequência de 37 Hz, potência de 30% durante o período de 5 minutos. Retirou-se então o solvente (saturado com compostos bioativos) e reservou-se em béquer. A amostra sólida então, seguiu para uma segunda extração repetindo os procedimentos já descritos. O produto das duas extrações, foram homogeneizados e armazenados em freezer (Electrolux) a -18°C.

2.4 Atividade *in vitro*

Para quantificação de fenólicos totais e flavonoides, as curvas de calibrações e as análises empregadas neste estudo foram realizadas em ambiente escuro (dentro de tubos de 10 mL protegidos com papel alumínio e tampa), em triplicata e com precisão de pipetas automáticas. Entre todas as adições, as misturas foram agitadas em vortex (Biomixer). Foram utilizados padrões analíticos específicos, com técnicas descritas por metodologias adaptadas, conforme demonstrado no Quadro 1. As leituras de absorvâncias ocorreram em espectrofotômetro Uv-Vis (Global Analyzer).

3 RESULTADOS

Os resultados foram obtidos por meio das curvas de calibração descritas, assim, pelas seguintes equações da reta $y = 0,0525x + 0,0314$ com $R^2 = 0,992$ para o padrão ácido gálico (AG) e $y = 0,137x + 0,0516$ com $R^2 = 0,998$ para o padrão quercetina (Q). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico



por grama de amostra seca (mg EAG/g) e miligramas equivalentes de quercetina por grama de amostra seca (mg EQ/g), respectivamente. As concentrações obtidas tais como as médias e seus respectivos desvios podem ser observados na Tabela 2.

Quadro 1 – Padrão, concentração e técnica das análises *in vitro* para análise de fenólicos totais e flavonoides utilizados neste trabalho

	Padrão e concentração	Técnica aplicada	Referências
Fenólicos totais	Ácido gálico (Sigma) - 1500 mg/L	30 µL de cada amostra + 2370 µL de água destilada + 150 µL de folin-ciocalteu (5 min) + 450 µL de Na ₂ CO ₃ 15%. Leitura após 2 h em 765 nm.	Adaptado - (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELARAVENTÓS, 1999).
Flavonoides	Quercetina (Sigma) - 1000 mg/L	250 µL de cada amostra + 1000 µL de água destilada + 75 µL de NaNO ₂ (5 min) + 75 µL de AlCl ₃ 10% (5 min) + 500 µL de NaOH 1 mol/L. Leitura imediata em 510 nm.	Adaptado - (ZHISHEN, MENGCHENG E JIANMING, 1999).

Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 2 - Médias e desvios-padrões para a extração de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de *Stachys byzantina*

Solventes	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EQ/g)
Água	0,380 ^{efg} ±0,005	0,030 ^d ±0,016
Etanol	0,530 ^{bcd} ±0,030	0,759 ^{abc} ±0,504
CIC-ALa-10%	0,609 ^{abcd} ±0,022	0,676 ^{abcd} ±0,071
CIC-ALa-25%	0,486 ^{cdef} ±0,029	0,498 ^{abcd} ±0,036
CIC-ALa-50%	0,657 ^{abc} ±0,023	0,736 ^{abcd} ±0,029
CIC-ALe-10%	0,493 ^{cdef} ±0,044	0,534 ^{abcd} ±0,080
CIC-ALe-25%	0,435 ^{def} ±0,003	0,604 ^{abcd} ±0,031
CIC-ALe-50%	0,766^a±0,057	1,162^a±0,159
CIC-Gli-10%	0,293 ^{fg} ±0,037	0,229 ^{bcd} ±0,028
CIC-Gli-25%	0,355 ^{efg} ±0,027	0,101 ^{cd} ±0,034
CIC-Gli-50%	0,446 ^{def} ±0,005	0,445 ^{abcd} ±0,097
LP-ALe-10%	0,660 ^{abc} ±0,005	0,456 ^{abcd} ±0,072
LP-ALe-25%	0,740 ^{ab} ±0,011	0,762 ^{abc} ±0,024
LP-ALe-50%	0,811^a±0,032	0,898^{ab}±0,086
CIC-Xil-10%	0,618 ^{abcd} ±0,122	0,126 ^{cd} ±0,014
CIC-Xil-25%	0,199 ^g ±0,025	0,147 ^{cd} ±0,022
CIC-Xil-50%	0,308 ^{fg} ±0,022	0,380 ^{bcd} ±0,002

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Fonte: Autoria própria (2021).

Analisando-se na Tabela 2 para as médias de recuperação de fenólicos totais, é possível observar que o maior teor é obtido pelas combinações LP-Ale-50% (0,811±0,032 mg EAG/g peso) e CIC-Ale-50% (0,766±0,057 mg EAG/g peso), respectivamente, e o menor teor de recuperação, se deu na combinação CIC-

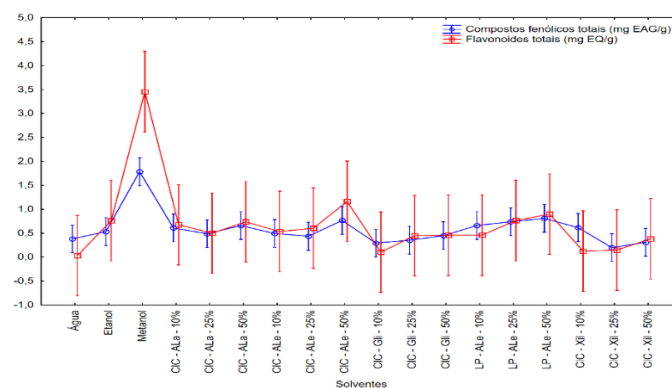


Xil-25% ($0,199 \pm 0,025$ mg EAG/g peso). Azevedo (2018), em seu estudo utilizando como solvente uma mistura de metanol, água e acetona, relataram teores de $0,439$ mg EAG/g peso seco. No presente estudo, apenas seis amostras ficaram abaixo do obtido pelo autor, as demais alcançaram teores iguais ou superiores, comprovando a superioridade dos NADES. Na recuperação de flavonoides, a combinação CIC-Ale-50% destacou-se positivamente com $1,162 \pm 0,159$ mg EQ/g de amostra seca, em contrapartida a água apresentou o pior de recuperação de flavonoides, com $0,030 \pm 0,016$ mg EQ/g de amostra seca. Silva et al., (2017), investigaram a *Melissa officinalis* também pertencente à família Laminaceae e encontraram valores de $0,228$ mg EQ/g de folhas secas. No presente estudo apenas 3 combinações além da água ficaram abaixo dos valores encontrados pelo autor, ressaltando o poder de extração dos NADES.

Na Figura 4 está apresentada a relação de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) e flavonoides totais (mg EQ/g) para cada solvente e combinação de NADES empregados nesse estudo. É demonstrado que sete combinações superaram o poder de extração do etanol e onze combinações superam a água em teores de fenólicos totais. Observou-se ainda, que a adição de água impacta de forma positiva, pois as combinações acrescidas de 50% de água obtiveram teores maiores, quando comparados com a mesma combinação com 10 ou 25% de água para a maioria das amostras, exceto a CIC-Xil que obteve teores maiores com apenas 10% de água. Bubalo et al. (2016) em seu estudo, também concluíram que os maiores teores de recuperação de compostos fenólicos são obtidos com adição de água na proporção de 50%.

Em relação aos flavonoides, foi demonstrado que quatro combinações obtiveram valor superior ou igual ao poder de extração do etanol e todas as combinações superam a água em teores de flavonoides totais. A combinação CIC-Ale-50% destacou-se estatisticamente na recuperação de flavonoides, como demonstrado no maior pico da figura, alcançando teores de $1,162 \pm 0,159$ mg EQ/g. Confirma ainda, que as combinações adicionadas de água na proporção de 50% também são mais eficientes para a recuperação de flavonoides.

Figura 4 – Recuperação de compostos fenólicos totais e flavonoides para cada solvente e combinação de NADE a partir da extração de *S. byzantina*



Fonte: Autoria própria (2021).

4 CONCLUSÃO

As combinações LP-Ale-50% e CIC-Ale-50% destacaram-se nesse estudo na recuperação de compostos fenólicos da *S. byzantina*, alcançando diferença estatística perante os demais. A adição de água afeta positivamente a extração, obtendo-se maiores teores na adição de água na proporção de 50%. Na extração de fenólicos a melhor combinação de NADE, apresentou desempenho até 2 vezes maior em teor de recuperação de fenólicos do que estudos que empregaram solventes convencionais descritos na literatura, e a de flavonoides em até 5



vezes para espécie de mesma família, ressaltando a eficiência da alternativa de substituição de solventes convencionais por solventes verdes (NADES).

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a minha orientadora Dra. Leila Marques, minha parceira de iniciação científica Stefanie Casarin, as técnicas dos laboratórios e todos que de alguma forma contribuíram para realização deste estudo. Em especial, a UTFPR-CM pela oportunidade.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Andrew P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical communications**, n. 1, p. 70-71, 2003.
- AZEVEDO, Thaise Duda. **Propriedades nutricionais, antioxidantes, antimicrobianas e toxicidade preliminar do peixinho da horta (*Stachys byzantina* K. Koch)**. 2018. 89 p. Dissertação (Mestrado em Alimentação e Nutrição) - Programa de pós-graduação em Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.
- BUBALO, Marina Cvjetko et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159-166, 2016.
- ERDEMOGLU, Nurgun et al. Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 20, n. 1, p. 9-13, 2006.
- LORENZI, Harri; KINUPP, Valdely Ferreira. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**. São Paulo: Plantarum, 2014.
- NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- PEREIRA, Renata Junqueira; DAS GRAÇAS CARDOSO, Maria. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.
- SILVA, Nathalia Lucca et al. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (dc) stapf e *Melissa officinalis* obtidos por decocção. **Conexão Ciência**, Formiga-MG, v. 12, n. 1, p. 46-53, 2017.
- VIRGOLIN, Lara Borghi; SEIXAS, Fernanda Rosan Fortunato; JANZANTTI, Natália Soares. Composition, content of bioactive compounds, and antioxidant activity of fruit pulps from the Brazilian Amazon biome. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, p. 933-941, 2017.
- ZHU, Huilan et al. *Morinda citrifolia* L. leaves extracts obtained by traditional and eco-friendly extraction solvents: Relation between phenolic compositions and biological properties by multivariate analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 153, p. 112586, 2020.