



COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Calophyllum brasiliense*, *Mucuna pruriens* E *Piper regnellii*

Renata Menoci Gonçalves¹, Caroline Ortega Terra Lemos², Vitor Augusto dos Santos Garcia³, Lúcio Cardozo Filho⁴, Vladimir Ferreira Cabral⁵

RESUMO: Foram determinadas as atividades antioxidantes dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense*, do farelo desengordurado das sementes de *Mucuna pruriens* e dos extratos das folhas e caules de *Piper regnellii*. Para obtenção dos extratos foram feitas extrações com solvente orgânico executadas via soxhlet com hexano e diclorometano e extrações supercríticas, a qual utilizou CO₂ como solvente à 60 e 40°C para pressões de 244,1 e 250 bar, respectivamente, sendo o farelo considerado o resíduo das extrações. A atividade antioxidante dos extratos e farelo foi avaliada utilizando a metodologia de redução de DPPH (2,2- Difenil – 1 – picril-hidrazila). Os resultados apontam que os extratos obtidos por extração supercrítica apresentam melhor atividade antioxidante que os obtidos pela extração com solvente orgânico, sendo que os extratos da *Piper regnellii* apresentaram atividade antioxidante superior às demais plantas, e eles podem ser utilizados como um aditivo natural em indústrias de alimentos, de cosmético e farmacêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante, DPPH, extrações com solvente orgânico, extrações supercríticas.

1 INTRODUÇÃO

A extração com fluido supercrítico é definida como sendo uma operação unitária, onde são empregados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura (WILLIAMS, 1981). Tal operação tem sido amplamente estudada em diversas áreas do conhecimento, tendo como destaque a sua utilização na extração de compostos de fontes naturais.

As motivações para o desenvolvimento da tecnologia de extração supercrítica residem nos seguintes fatos: (1) um aumento acentuado no custo de energia, o qual elevou os custos das técnicas tradicionais de separação; (2) maior controle e

¹Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá – Paraná. menoci@hotmail.com

²Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. carolaterra@hotmail.com

³Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. vitoraugusto16@hotmail.com

⁴Co-orientador, Professor Doutor do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. cardozo@deq.uem.br

⁵Orientador, Professor Doutor do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. vladimir@deq.uem.br

regulamentação governamental dos solventes industriais comuns, a utilização do CO₂ supercrítico é aceitável ambientalmente e é muito atrativo como alternativa do solvente industrial; (3) legislações de controle de poluição mais severas; e (4) aumento das exigências do desempenho dos processos de separação.

Na região supercrítica o fluido pode ser considerado como um líquido expandido ou como um gás comprimido. Sua densidade é relativamente alta, e conseqüentemente ele tem alto poder de solvatação, sua densidade pode ser facilmente modificada por uma pequena variação na pressão ou temperatura do sistema, o que dá certo grau de seletividade para estes fluídos e também permite um fácil processo de separação soluto solvente. Outra característica importante dos fluidos em estado supercrítico é a relativa baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão que permite altas taxas de extração quando estes fluídos são usados (MEIRELES, 2009).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase in vitro, os antioxidantes em alimentos mostram uma função importante como fator de proteção à saúde. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (SOARES, 2002).

O gênero *Calophyllum* pertencente à família Clusiaceae/Guttiferae têm sido uma rica fonte de substâncias bioativas incluindo cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e biflavonóides (REYES-CHILPA et al., 1997).

A *Mucuna pruriens* conhecida por possuir diversas propriedades medicinais, possui capacidade nutricional comparada à soja, com semelhantes proporções de lipídeos, proteínas, minerais entre outros nutrientes (SIDDHURAJU, BECKER, 2005).

A *Piper regnellii*, conhecida popularmente como pariparoba, pertence à família Piperaceae, apresenta um acúmulo de vários fenilpropanóides e neolignananas dihidrobenzofuranicas incluindo o conocarpano como composto majoritário (BENEVIDES et al., 1999).

Neste contexto, o presente trabalho tem como principal objetivo medir e comparar a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess, do farelo desengordurado das sementes da *Mucuna pruriens* e dos caules e folhas de *Piper regnellii* obtidos por diferentes métodos de extração.

2 MÉTODOS

Para a realização do estudo foram utilizadas folhas do *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae/Guttiferae), coletadas na Ilha do Cardoso localizada no Estado de São Paulo, em dezembro de 2010. A exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob o número de registro SP363818, as sementes de *Mucuna Anã* foram obtidas em Novembro de 2010 da empresa Pró Sementes do Estado de São Paulo e as folhas e os caules da *Piper regnellii* foram coletados de espécimes do “Horto Didático de Plantas Medicinais Profa Irenice Silva” no campus da Universidade Estadual de Maringá em Setembro de 2010 e a exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição sob o registro HUM 8392.

O material botânico, com exceção das sementes, foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 40°C por 72 horas. *Calophyllum brasiliense* foi triturada em processador doméstico, as demais plantas foram trituradas em moinho de facas. Todas as amostras foram acondicionadas e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

A extração do óleo por solvente orgânico foi baseada na metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2004), onde as plantas previamente secas e moídas eram embaladas em forma de cartucho em papel filtro e acondicionadas no extrator soxhlet (Satelit), o solvente era aquecido próximo ao seu ponto de ebulição e o sistema mantido em refluxo por 8 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado até peso constante ($\pm 0,01$ g). Os solventes

Anais Eletrônico

VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar

CESUMAR – Centro Universitário de Maringá

Editora CESUMAR

Maringá – Paraná - Brasil

utilizados foram diclorometano e n-hexano (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). Os solventes orgânicos utilizados nas extrações foram escolhidos devido às diferenças de suas polaridades e constantes dielétricas. O hexano é um solvente apolar e o diclorometano é um solvente polar e suas constantes dielétricas são iguais a 1,88 e 8,93, respectivamente.

As extrações supercríticas foram realizadas em uma unidade de escala laboratorial, que consiste basicamente de um cilindro de CO₂, dois banhos termostatizados, uma bomba seringa (ISCO, Modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e a altura do leito é de 26, 1 cm).

A Tabela 1 apresenta as combinações destes parâmetros utilizados em cada um dos experimentos de extração supercrítica (ESC) realizados para cada um dos substratos vegetais.

Tabela 1. Parâmetros de extração utilizados nos experimentos de ESC.

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Vazão (mL/min)
1	244,1	60	0,78112	3
2	250,0	40	0,88022	3

Os tempos de extração foram em torno de 280 minutos. O leito foi alimentado com quantidade variada para cada amostra, a fim de que ficasse preenchido ao menos 1/3 do seu volume total, onde o material vegetal triturado foi acomodado uniformemente na parte inferior do extrator e o restante da célula de extração foi preenchida com esferas de vidro (leito inerte). Dessa maneira, o dióxido de carbono, alimentado na parte superior do extrator, passava inicialmente pelo leito inerte e posteriormente pela matriz vegetal. Na saída do extrator, devido à despressurização, ocorria à separação do extrato do solvente e então a massa extraída era coletada em um recipiente de vidro âmbar.

O método aqui empregado para determinar a atividade antioxidante é baseado na avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH, de coloração púrpura, que se reduz em presença de moléculas antioxidantes formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância e foi proposto por Blois (1958) e Brand-Williams *et al.* (1995).

Os extratos foram diluídos em metanol e os farelos desengordurados foram diluídos e sonicados em água Mili-Q para alcançarem concentrações finais que variaram de 67 à 350 µg/mL.

A cada teste 2850 µL da solução trabalho (solução com o radical) eram adicionados a 150 µL da amostra (volume final de 3,0 ml). Substitui-se o volume das amostras pela mesma quantidade de água destilada, para o controle negativo, e por BHT (Sigma) 0,02% (preparado à solução em etanol p.a.) para o controle positivo. O controle positivo era realizado apenas para verificar se a solução trabalho estava adequada para o experimento. Deixou-se reagir por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e leram-se as absorbâncias a 515 nm.

O cálculo do percentual de atividade antioxidante (AA) foi realizado conforme Equação 1:

$$AA \% = [(1 - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle negativo}] \times 100 \quad (1)$$

Em que AA% é o percentual da atividade antioxidante, Abs.amostra é a absorbância do extrato ou farelo e Abs.controle negativo é a absorbância do controle negativo.

Foi construída uma curva para cada extrato e farelo desengordurado, onde no eixo x tinha-se a concentração final de extrato em (µg/mL) e no eixo y os valores da atividade

antioxidante. Na sequência, calculou-se a concentração dos extratos e dos farelos, necessária para reduzir em 50% o DPPH da reação (EC_{50}) através de uma regressão linear das curvas obtidas dos mesmos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a atividade antioxidante dos extratos estão contabilizados na Tabela 2 em termos do valor do EC_{50} .

Tabela 2. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. brasiliense* e *P. regnellii* e do farelo desengordurado de *M. pruriens* usando o método DPPH

Espécie	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	Hexano	Diclorometano	ESC 1(T=60 °C; P=244,1 bar)	ESC 2(T=40 °C; P=250 bar)
<i>Calophyllum brasiliense</i>	242,84	206,58	149,13	131,73
Caule - <i>Piper regnellii</i>	63,01	55,38	58,20	45,66
Folhas - <i>Piper regnellii</i>	68,64	85,41	40,89	46,86
<i>Mucuna pruriens</i>	67,60	57,28	43,01	46,92

Comparando os valores de EC_{50} dos extratos brutos de *C. brasiliense* e *P. regnellii* e o farelo desengordurado de *M. pruriens*, podemos observar que o extrato de *C. brasiliense* destaca-se negativamente, apresentando um valor de EC_{50} muito elevado para todas as técnicas de extração empregadas em relação aos extratos de *P. regnellii* e o farelo desengordurado de *M. pruriens*.

Segundo Reynertson *et al.* (2005), um extrato cujo valor de EC_{50} é menor que 50 $\mu\text{g/mL}$ é considerado muito ativo, e isso pode ser observado tanto para os extratos *Piper regnellii* obtido com hexano e com CO_2 supercrítico à 40 °C e 250 bar quanto para os extratos e farelos desengordurado obtidos pela extração supercrítica da folha de *Piper regnellii* e semente de *Mucuna pruriens*, respectivamente. A maior atividade antioxidante foi observada para o extrato supercrítico das folhas de *Piper regnellii* obtidos à 60 °C e pressão de 244,1 bar. Esses dados nos informam que os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem mais afinidade por solventes apolares, resultando na extração de componentes apolares, sendo assim, podemos concluir que existem outras famílias de substâncias presentes nos extratos de interesse além dos compostos fenólicos (polares) que contribuem para a eliminação de radicais livres, tais como terpenóides, carotenóides, tocoferóis, entre outros que estão influenciando na atividade antioxidante.

Portanto, a atividade antioxidante detectada por sistemas complexos, tais como materiais vegetais, pode ser causada por várias classes de componentes, e também pelo sinergismo e interações entre eles a partir da mistura complexa, resultando em uma atividade antioxidante dependente da composição do extrato.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem inferir que os diferentes métodos de extração e os solventes utilizados interferem nos resultados, sendo que os extratos e

farelos desengordurados obtidos por extração supercrítica obtiveram os melhores resultados do EC₅₀. Podemos ainda verificar que *Piper regnellii* e *Mucuna pruriens* tiveram bons resultados da atividade antioxidante, ao contrário de *Calophyllum brasiliense*. Nesse sentido, devemos direcionar o trabalho para a identificação dos constituintes químicos responsáveis pela atividade.

REFERÊNCIAS

BENEVIDES P. J. C.; SARTORELLI P.; KATO M. J. Phenilpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry** 52, 339-343, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** 181, 1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm., Wiss. u. Technol.* 28, 25-30, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 4. ed. São Paulo: IMESP, 118-119, 2004.

MEIRELES, M. Angela A. **Extracting bioactive compounds for foods product: theory and applications**. CRC press, 2009.

REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M; ESTRADA-MUNIZ, E. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliense* heartwood. **J. Chem. Ecol.** 23, 1901-1911, 1997.

REYNERTSON, K.A; BASILE, M. J. B.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications** 3, 025-035, 2005.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Nutritional and antinutritional composition, in vitro amino acid availability, starch digestibility and predicted glycemic index of differentially processed *Mucuna* beans (*Mucuna pruriens* var. utilis): an under-utilised legume. **Food Chem.** 91, 275-286, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** 15, 71-81, 2002.

WILLIAMS, D. F. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 36, 1769-1788, 1981.