

Extração de bioativos da *S. byzantina* por dois métodos extrativos

Extraction of bioactives from *S. byzantina* by two extractive methods

Stefanie Calisto Casarin¹, Flávia Aparecida Reitz Cardoso², Leila Larisa Medeiros Marques³

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo realizar uma comparação de métodos extrativos utilizando uma mesma combinação de Solvente Eutético Profundo Natural (NADE) (composto de ácido láctico+cloreto de colina, na proporção 1:2), diluído (25 e 50%) em água, para extração de bioativos de *Stachys byzantina*. Foram realizados dois delineamentos experimentais fatoriais fracionários (2^{k-1}) para cada método de extração (ultrassom e shaker). Além da combinação fixa de solvente, na extração por shaker, os fatores utilizados foram temperatura (30 e 40°C), rotação (125 e 150 rpm) e no tempo (1 e 2h). Já na extração por ultrassom, os fatores foram temperatura (30 e 40°C) e no tempo (10 e 15min). O objetivo era verificar qual combinação de extração obterá o extrato com maior atividade antioxidante e maior quantidade de compostos fenólicos da *Stachys byzantina*. Foram realizadas análises para verificar atividade antioxidante por duas metodologias (FRAP e ABTS) e análise para quantificar compostos fenólicos dos extratos (fenólicos totais). Os resultados indicaram que a combinação S7 (ácido láctico+cloreto de colina acrescido de 25% de água destilada no tempo de 2h, a 30°C e 150 rpm) foi a mais promissora. Entretanto, os dados encontrados ainda estavam abaixo dos encontrados na literatura. Fazendo-se necessário estudos mais aprofundados com a utilização de outros solventes (NADES) e combinações para conseguir uma otimização do processo de extração.

PALAVRAS-CHAVE: NADE; PANC; *S. byzantina*; Shaker; Ultrassom.

ABSTRACT

The present study aimed to compare extractive methods using the same combination of Natural Deep Eutectic Solvent (NADE) (composed of lactic acid + choline chloride, in a 1:2 ratio), diluted (25 and 50%) in water, for extraction of bioactives from *Stachys byzantina*. Two fractional factorial experimental designs (2^{k-1}) were carried out for each extraction method (ultrasound and shaker). In addition to the fixed solvent combination, in shaker extraction, the factors used were temperature (30°C and 40°C), rotation (125 and 150 rpm), time (1h and 2h); In ultrasound extraction, the factors were temperature (30°C and 40°C) and time (10min and 15min). The objective was to verify which extraction combination would obtain the extract with the greatest antioxidant activity and phenolic compounds from *Stachys byzantina*. Analyzes were carried out to verify antioxidant activity using two methodologies (FRAP and ABTS) and analysis to quantify phenolic compounds in the extracts (total phenolics). The results indicated that the S7 combination (lactic acid + choline chloride plus 25% distilled water over a period of 2 hours, at 30°C and 150 rpm) was the most promising. However, the data found was still below that found in the literature. Further studies are necessary with the use of other solvents (NADES) and combinations to achieve optimization of the extraction process.

KEYWORDS: *S. byzantina*; NADE; PANC; *S. byzantina*; Shaker; Ultrasound.

INTRODUÇÃO

Segundo Andreo e Jorge (2006), o processo de rancidez oxidativa é uma das causas principais de deterioração de alimentos, prejudicando diversos aspectos dos

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. stefanieccasarin@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2850882088918689>.

² Docente do Departamento de Matemática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: flaviareitz@gmail.com. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2663975071704461>.

³ Docente do Departamento de Alimentos e Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: leilamarques@professores.utfpr.edu.br. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5674435305693604>.



alimentos, como surgimento de sabores e odores desagradáveis, alteração de seu valor nutricional e diminuição da segurança nutricional. A partir daí, para proteção da saúde humana e para a economia, nos resta tentar prevenir essa oxidação (Del Ré e Jorge, 2012). Os antioxidantes naturais vêm se apresentando como uma alternativa para minimizar os danos da oxidação e reduzir o impacto nos seres vivos. A partir disso, torna-se importante discutir a forma de extração dos mesmos, e se tratando de alimentos, deve-se prestar atenção se os extratos apresentam toxicidade, como o etanol e metanol, que embora apresentem menor toxicidade que o hexano por exemplo, ainda apresentam algum grau de toxicidade (Galvão *et al.*, 2013). Uma alternativa aos solventes tradicionais utilizados em extrações são os NADES – solventes eutéticos profundos naturais. A proposta dos NADES é ser um solvente orgânico a base de metabólitos vegetais como os açúcares, com baixo impacto ao meio ambiente, alta degradabilidade e toxicidade baixa, sendo assim, podemos propor a utilização desse tipo de solvente, combinado a métodos para a extração de bioativos (Koh, 2023). Além disso, é importante que a planta escolhida apresente potencial antioxidante e compostos fenólicos, como as PANCs (Plantas alimentícias não convencionais). A PANC *Stachys byzantina*, segundo Brites (2022), é originária de regiões mais frias, é uma planta rica em compostos fenólicos e ácidos graxos, além de fibras e proteínas. Sendo assim, o presente estudo busca verificar a melhor combinação de método, temperatura e tempo de dois métodos extrativos distintos para realizar uma extração eficiente com maior aproveitamento de bioativos da *S. byzantina*.

PREPARO DAS AMOSTRAS

O plantio e colheita das *Stachys byzantina* ocorreram na horta da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Campo Mourão - Paraná. As folhas da planta então foram higienizadas e levadas à estufa de circulação de ar forçado (Cienlab) a 45°C, até atingirem peso constante, então trituradas, identificadas e armazenadas para uso posterior.

PREPARO DOS SOLVENTES

Para as extrações, foram utilizadas duas diluições do NADE a base de cloreto de colina e ácido láctico na proporção 1:2, preparado segundo Bubalo *et al.*, (2016) e otimizados segundo Zhu *et al.*, (2020). O solvente foi separado em duas partes onde ambas foram diluídas com 25 e 50% de água destilada. Em um béquer de 1000 mL foram colocadas 2 partes de ácido láctico para 1 de cloreto de colina e levado a 80°C em agitador magnético (Lutech), com agitação de 50 rpm até que se tornasse um líquido límpido sem sólidos visíveis. Depois que o solvente atingiu temperatura ambiente, realizou-se a diluição.

DELINEAMENTO ESTATÍSTICO FATORIAL

A fim de determinar as melhores condições para as extrações, o experimento foi planejado em dois delineamentos estatísticos fatoriais fracionários (2^{k-1}). Para a extração com o método shaker, o esquema fatorial foi constituído de quatro fatores: temperatura (30 e 40°C), rotação (125 e 150 rpm) e tempo (1 e 2h) e o solvente a base de ácido láctico e cloreto de colina diluídos com 25 e 50% em água destilada. O delineamento resultou em 8 experimentos a serem feitos. Para o ultrassom, um esquema fatorial foi constituído de

três fatores: temperatura (30 e 40°C), tempo (10 e 15min) e os mesmos solventes da extração anterior. O delineamento resultou em 4 experimentos a serem feitos.

AS EXTRAÇÕES

Então as extrações foram realizadas pelos métodos shaker inspirado no trabalho de Khanavi *et al.* (2009) e ultrassom baseado no trabalho de Silva (2021), para que houvesse comparativo entre dois métodos. Realizou-se um delineamento estratégico a fim de definir quantas extrações seriam feitas. A descrição das variáveis utilizadas nas extrações estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1: Combinações utilizadas de dois métodos de extração de bioativos da *Stachys byzantina*.

Método	Código da combinação utilizada	Solvente	Tempo (min)	Rotação (rpm)	Temperatura (°C)
Ultrassom	U1	25%	10	-	40
	U2	25%	15	-	30
	U3	50%	10	-	40
	U4	50%	15	-	30
Shaker	S1	25%	120	125	40
	S2	25%	60	125	30
	S3	25%	60	150	40
	S4	50%	60	150	30
	S5	50%	120	125	40
	S6	50%	120	150	30
	S7	25%	120	150	30
	S8	50%	60	125	40

Fonte: Autoria própria (2023).

Para a extração com ultrassom, foram pesadas cerca de 0,314g de amostra seca (média do peso das amostras) em tubo de falcon, adicionados 2,5 mL de solvente e levado para o ultrassom nos seus respectivos tempos (indicado na Tabela 1). Após retirado do ultrassom, a amostra foi levada para a centrifugação por 5 min. Ao fim do tempo, retirou-se o extrato e repetiu-se o processo uma segunda vez com a mesma amostra. Após a segunda vez, o resíduo da planta foi descartado e os extratos foram recolhidos em béqueres e reservados. Para a extração com shaker, foram pesadas cerca de 0,628g de amostra seca em erlenmeyer de 250mL, adicionados 10 mL de solvente e levado ao shaker por seus respectivos tempos, temperaturas e agitação. Ao fim do tempo, os extratos foram recolhidos em béqueres e reservados para posterior análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

ATIVIDADE *IN VITRO*

Realizou-se análises *in vitro* para verificar atividade antioxidante dos extratos pelos métodos FRAP e ABTS e análises para quantificação de compostos fenólicos. As análises foram realizadas em ambiente escuro e lidas em espectrofotômetro Uv Vis (Global Analyzer). As técnicas aplicadas, padrões e seus respectivos autores estarão dispostos na Tabela 2.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados foram obtidos através das análises acima e por meio das curvas de



calibração anteriormente citadas. Para polifenóis, tem-se a análise de fenólicos totais com $y = 0,00427x + 0,29$ (equação da reta) e $R^2 = 0,987$, utilizando o padrão ácido gálico. Já para a atividade antioxidante, o método FRAP com $y = 0,000797x + 0,00885$ e $R^2 = 0,965$, e método ABTS com $y = -0,000749x + 0,483$ e $R^2 = 0,994$ utilizando o padrão trolox.

Tabela 2 - Análises aplicadas nas amostras, técnicas de preparo das curvas de calibração e concentração para análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos.

Análise	Padrão e marca	Concentração da curva	Técnica aplicada	Referência
Fenólicos totais	Ácido gálico (Sigma)	1500 mg.L ⁻¹	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.	Singleton (1999);
FRAP	TPTZ (Sigma)	1500 µmol.L ⁻¹	60 µL de amostra + 240 µL de água destilada + 1500 µL de reagente FRAP. Incubar por 30 min a 37°C em banho maria. Leitura em 595 nm.	Rufino <i>et al.</i> (2006);
ABTS	ABTS+ (Sigma)	1500 µmol.L ⁻¹	30 µL de cada amostra + 3,0 mL de solução do radical ABTS+. Leitura após 6 min em 734 nm.	Embrapa (2007).

Fonte: Autoria própria (2023).

Com base nos valores encontrados e segundo a Tabela 3 em relação ao ABTS obtido via shaker, maiores valores foram obtidos para as amostras S2 (0,737±0,007µmol ET.g⁻¹), S5 (0,762±0,038µmol ET.g⁻¹) e S6 (0,735±0,074µmol ET.g⁻¹), com mesma média significativa também com as amostras S1, S3 e S4, que por sua vez possuem a mesma média com as amostras S7 e S8. Fenólicos apresentaram maiores valores de extração na amostra S3 (0,486±0,060EAG.g⁻¹), com a mesma média significativa com S2, S7 e S8. Menores valores foram observados nas amostras S1, S4, S5 e S6. A quantificação de antioxidantes pelo método de FRAP foi maior na amostra S7.

Tabela 3 - Resultados das análises de FRAP, ABTS e fenólicos totais realizados dos extratos obtidos a partir de shaker e ultrassom.

Tratamentos	Fenólicos totais(mg EAG.g ⁻¹)	ABTS (µmol ET.g ⁻¹)*	FRAP(µmol ET.g ⁻¹)
U1	0,308 ^{ab} ±0,002	0,422 ^{cd} ±0,017	0,408 ^{ab} ±0,073
U2	0,415 ^{ab} ±0,029	0,352 ^{ef} ±0,008	0,610 ^a ±0,001
U3	0,377 ^{ab} ±0,013	0,307 ^{ef} ±0,032	0,465 ^{ab} ±0,086
U4	0,401 ^{ab} ±0,029	0,255 ^f ±0,011	0,388 ^{ab} ±0,033
S1	0,269 ^{ab} ±0,091	0,709 ^a ±0,014	0,429 ^{bc} ±0,044
S2	0,408 ^{ab} ±0,057	0,737 ^a ±0,007	0,534 ^{ab} ±0,023
S3	0,486 ^a ±0,060	0,676 ^{ab} ±0,032	0,332 ^b ±0,009
S4	0,256 ^b ±0,061	0,646 ^{ab} ±0,010	0,319 ^b ±0,052
S5	0,216 ^{ab} ±0,051	0,762 ^a ±0,038	0,465 ^{ab} ±0,051
S6	0,267 ^{ab} ±0,056	0,735 ^a ±0,074	0,441 ^{ab} ±0,004
S7	0,345 ^{ab} ±0,069	0,551 ^{bc} ±0,018	0,604 ^a ±0,045
S8	0,343 ^{ab} ±0,025	0,559 ^{bc} ±0,019	0,349 ^b ±0,008

*µmol ET.g⁻¹:micromol equivalentes de trolox por grama de amostra seca;

**mg EAG.g⁻¹:miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca.

**Sobrescritos iguais na mesma coluna, para a mesma variável resposta, indicam médias sem diferença estatisticamente significativa com 5% no Teste de Tukey.

Fonte: Autoria própria (2023).

Em relação a fenólicos totais, análise mais focada em polifenóis, o maior valor se deu na amostra S3 (0,486^a±0,060mg EAG.g⁻¹) e o menor valor na amostra S5

($0,216^{ab} \pm 0,051 \text{mg EAG.g}^{-1}$). Já para atividade antioxidante, temos ABTS+ e a amostra S5 com o maior valor ($0,762^a \pm 0,038 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$), e o menor valor na amostra U3 ($0,307^{ef} \pm 0,032 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$). E para FRAP que também mede atividade antioxidante, temos U2 com maior valor ($0,610^a \pm 0,001 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$) e S4 apresentando o menor valor ($0,319^b \pm 0,052 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$). Bahadori *et al.*, (2020) em estudo com a *S. byzantina*, porém extraindo com água destilada e método de infusão em água fervente, encontraram cerca de 58 mg EAG.g^{-1} para fenólicos totais. Para antioxidantes, ainda se tratando do mesmo estudo (Bahadori *et al.*, 2020), foram obtidos cerca de $3,302 \pm 0,015 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$ com o método ABTS e $31,244 \pm 0,025 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$ utilizando o método FRAP. Khanavi *et al.*, (2009), em estudo à família *Stachys*, foi analisado o extrato da *S. byzantina* obtido com shaker e solvente a base de metanol e água (50:50), obtiveram $0,0933 \pm 0,0103 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$ testado por meio do método FRAP foi de $6,383 \pm 0,306 \text{ mg EAG.g}^{-1}$.

CONCLUSÃO

Verificamos conforme os resultados que houve uma variação de valores entre os métodos. Porém, observando os resultados e fazendo uma média, o que apresentou um desempenho mais linear foi a amostra S2. E mesmo que o desempenho desta amostra tenha sido a mais linear, ainda observamos que se encontra longe dos valores encontrados em literatura. Essa diferença entre os valores obtidos e a literatura pode ocorrer devido a diferença de métodos e solventes utilizados, uma vez que em literatura geralmente as pesquisas se dão com solventes tradicionais (água, metanol, etc.) e aqui, utilizamos solventes alternativos. Isso não significa que os solventes eutéticos ou os métodos são ineficientes, apenas que talvez fosse necessário um estudo mais aprofundado, com variações de quantidade de solvente e até troca de misturas dos solventes eutéticos ou modificar variáveis e métodos de extração. A partir dessas modificações, seria possível realizar otimizações para verificar a melhor condição para um aproveitamento maior dos bioativos da *S. byzantina*, uma vez que essa PANC é uma planta promissora.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa e pela oportunidade de desenvolver este projeto; à UTFPR campus Campo Mourão pelo fomento na compra de reagentes e disponibilização dos equipamentos; à minha orientadora Dra. Leila Marques; à Dra. Flávia Reitz pela ajuda na parte estatística; à Julia Rodrigues e Verônica Braga pela ajuda em laboratório e todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ANDREO, D.; JORGE, N. Natural antioxidants: Extraction Techniques. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

BAHADORI, M. B. *et al.* The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*)-profiling phenolic and antioxidant activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 36, p. 101134, 2020.

BRITES, B.F. **Perfil de ácidos graxos do óleo bruto e atividade anticâncer e antimicrobiana das folhas de *Stachys byzantina* K. Koch.** 2022. Dissertação (Programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento na região centro-oeste) - Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2022.

DEL RÉ , P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, abr. 2012 p. 389–399.

GALVÃO, A. C. *et al.* Extração do óleo da polpa do abacate com Metanol e Etanol a diferentes temperaturas. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 35, n. 2 dez. 2013, p. 304-310.

KHANA VI, M. *et al.* Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 6, 2009.

KOH, Q. Q. *et al.* Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): Physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 35, p. 101218, 2023.

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.** Comunicado técnico online - EMBRAPA, Fortaleza, 2007.

RUFINO, M. S. M., *et al.* **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP).** Comunicado técnico online - EMBRAPA, Fortaleza, 2006.

SILVA, C. F. B. **Avaliação in vitro de extratos de peixinho da horta (*Stachys byzantina*) obtidos por meio de solventes eutéticos profundos naturais.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

ZHU, H. *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.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.