

EXTRATOS DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.) OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO USANDO CO₂ SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA COMO SOLVENTES

T. T. GARMUS¹, L.C. PAVIANI¹, C.L. QUEIROGA² e F.A. CABRAL¹

¹ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Engenharia de Alimentos

² Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)

E-mail para contato: cabral@fea.unicamp.br

RESUMO – Esse trabalho objetivou, através da combinação de processos de extração, a obtenção de extratos naturais a partir de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). Extratos foram obtidos por extração sequencial em leito fixo a 60 °C e 400 bar, primeiro através de extração com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), seguida por extração com etanol e por último, extração com água. Todos os extratos foram avaliados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais. Para efeito de comparação, mais dois tipos de extratos etanólicos e aquosos foram obtidos: 1) Extratos em etapa única a partir das folhas, com etanol e com água em leito fixo a 60 °C e 400 bar sem prévia extração com scCO₂ e 2) Extratos convencionais utilizando um sistema a baixa pressão e 60 °C. A análise dos resultados mostrou que o caráter do solvente empregado influenciou significativamente no processo de obtenção dos extratos, pois o rendimento apresentou tendência de aumento com o aumento da polaridade do solvente. Os resultados apontaram a extração sequencial como a mais eficiente quanto ao rendimento global e rendimento de fenóis e a extração etanólica (1 etapa) em leito fixo com as maiores concentrações de fenóis e flavonoides totais e com o melhor rendimento de flavonoides.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Lippia sidoides* Cham., conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta aromática encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Devido seu uso na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano, o alecrim-pimenta destaca-se como uma espécie que teve o cultivo ampliado em vários estados brasileiros, pela inclusão em programas de fitoterapia (MATOS e OLIVEIRA, 1998; COSTA et al., 2002), estando inclusive listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, a RENISUS (CARVALHO-JUNIOR et al., 2011).

Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, sendo o timol e o carvacrol os principais constituintes, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida (ALMEIDA et al., 2010). Vários trabalhos têm demonstrado propriedades biológicas do óleo essencial de *L. sidoides* tais como: ação antifúngica,

antimicrobiana, contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que causam infecções na pele e na garganta (SILVA et al., 2010; VERAS et al., 2012), *Streptococcus mutans* responsável pela cárie dentária (BOTELHO et al., 2007), *Corynebacterium xerosis* que causa mau cheiro nas axilas e nos pés (LACOSTE et al., 1996), *Candida albicans*, espécie encontrada nas aftas e corrimento vaginal (BOTELHO et al., 2007), *Trichophytum rubrum* e *T. interdigitale* que causam micoses na pele, ação moluscida contra o caramujo hospedeiro da esquistossomose *Biomphalaria glabra* (BEZERRA et al., 1980 citado por MATOS e OLIVEIRA, 1998), e ação larvicida contra o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004).

Os benefícios atribuídos a *Lippia sidoides* são devido à presença de metabólitos secundários presentes em suas folhas, que inclui os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são considerados antioxidantes naturais e representam um importante grupo de compostos bioativos em alimentos. Estes compostos estão presentes em todos os alimentos vegetais, mas o seu tipo e os níveis variam enormemente dependendo da planta, fatores genéticos e condições ambientais (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Nos últimos anos, trabalhos sobre a extração de compostos fenólicos de produtos naturais têm atraído um interesse especial. A extração é um passo muito importante no isolamento, identificação e utilização desses compostos e não existe um único método de extração padrão. Extração com solvente orgânico e extração com fluido supercrítico são as técnicas mais comuns utilizadas para o isolamento de polifenóis (IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

O fluido supercrítico mais usado para extrações de produtos naturais para alimentos ou fármacos é o dióxido de carbono (CO_2). Os processos de extração que empregam o dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) como substituto de alguns solventes orgânicos e do vapor d'água (hidrodestilação ou arraste a vapor) apresentam-se como uma das opções de destaque para obter extratos naturais contendo substâncias bioativas (antioxidantes, óleos essenciais, carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros). Dentre as vantagens do uso do dióxido de carbono supercrítico em processos de extração tem-se que ele é barato, atóxico, não inflamável, inerte e tem boa capacidade de extração devido sua penetrabilidade (RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN, 2002; MUKHOPADHYAY, 2000).

Este trabalho teve como objetivo principal, empregar a extração sequencial em leito fixo para se obter o máximo rendimento de extração e extratos mais concentrados em compostos fenólicos (fenóis e flavonoides) e confrontar os resultados com os obtidos por extração etanólica e aquosa em etapa única (convencional e em leito fixo).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) foram coletadas no campo de cultivo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP) e secas em estufa com circulação forçada a 42 °C por 3 dias. Em seguida as folhas desidratadas foram trituradas em moinho de facas (modelo MA-340, Marconi, Brasil), utilizando uma peneira de mesh 20 acoplada ao equipamento, acondicionadas em sacos plásticos e

estocadas em freezer doméstico a $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As folhas de *L. sidoides* foram submetidas a processos de extração em extrator de leito fixo (alta pressão) em três etapas, usando três solventes distintos. A primeira com dióxido de carbono supercrítico, a segunda e terceira etapas, com etanol e água, respectivamente.

Na primeira etapa da extração sequencial, as condições operacionais de temperatura e pressão selecionadas para a realização do experimento foram $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 400 bar com uma vazão média de scCO_2 de 1,5 L/min (2,475g/min). O CO_2 no estado supercrítico escoou através de um leito fixo contendo aproximadamente 7,0 g de amostra por um tempo médio total de aproximadamente 6 horas. Na segunda etapa, o resíduo proveniente da primeira extração foi submetido a uma nova extração nas mesmas condições operacionais, utilizando como solvente etanol a uma vazão de 0,5 mL/min (0,395 g/min) para um tempo total de processo de 6 horas. A partir do material residual das extrações supercrítica e etanólica foi realizada uma terceira etapa de extração na qual água a 400 bar e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma vazão de 0,5 mL/min (0,5 g/min) escoou pelo mesmo leito de partículas. O tempo médio de extração nesta última etapa foi de aproximadamente 6 horas.

Para comparação foram realizados experimentos em leito fixo (alta pressão) com etanol e com água em etapa única, sem prévia extração com scCO_2 , nas mesmas condições de pressão e temperatura da extração sequencial. Para complementar os resultados foram realizadas extrações convencionais, isto é, a baixa pressão (pressão atmosférica) e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando etanol e água como solventes. Detalhes da unidade de extração e dos procedimentos utilizados para obtenção dos extratos em leito fixo (1 e 3 etapas) e convencionais, conduzidos no Laboratório ExTrAE, UNICAMP, BRASIL, podem ser encontrados em um trabalho prévio descrito por GARMUS et al.,2014.

Como parâmetro comparativo entre os diferentes métodos de extração empregou-se o rendimento global de extração, que expressa a relação percentual entre a massa de extrato seco obtido e a massa matéria-prima (folhas secas de *L. sidoides*). Todos os extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides totais. A determinação de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de SINGLETON et al. (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (EAG/g extrato). Para a quantificação dos flavonoides totais foi empregado o método desenvolvido por ZHISHEN et al. (1999) e os resultados expressos em equivalente de catequina (mg EC/g extrato).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 compara os rendimentos globais obtidos por diferentes métodos de extração para folhas de *L. sidoides*. As médias dos rendimentos foram submetidas ao Teste de Tukey a um nível de significância de 5,0 %.

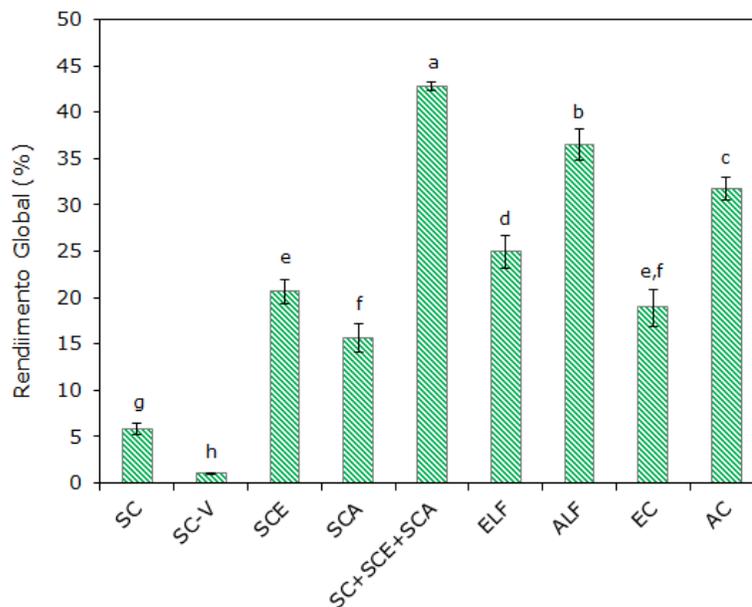


Figura 1 – Rendimento dos extratos (secos) das folhas de alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC), aquoso convencional (AC) e rendimento acumulado (SC+SCE+SCA). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

As extrações utilizando $scCO_2$, etanol e água apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao rendimento global, o que indica a influência do caráter do solvente empregado. O rendimento de extração apresentou a tendência de aumento com a polaridade do solvente. Logo, as extrações aquosas se destacaram sobre as demais, resultando em rendimentos globais superiores às outras extrações realizadas nas mesmas condições.

Um dos menores rendimentos foi obtido na extração supercrítica (SC), o que está relacionado ao menor teor de substâncias apolares, pelo fato da extração com $scCO_2$ estar restrita à extração de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade.

As extrações em etapa única com maior rendimento foram em primeiro lugar a extração aquosa em leito fixo (ALF), seguida da extração aquosa convencional (AC). Depois vieram as extrações etanólicas ($ELF > EC = SCE$) e, por último, as extrações supercríticas.

Na extração aquosa em leito fixo (ALF) obteve-se rendimento de extração de 36,47 %, enquanto que na extração aquosa pós-supercrítica (SCA) extraiu-se menos da metade desta quantidade (15,58 %), o que mostra a influência da extração prévia com CO_2 supercrítico no rendimento global das etapas subsequentes e a possibilidade do etanol (etapa anterior a da água) ter extraído alguns compostos que também seriam extraídos na terceira etapa com a água.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados para a concentração (mg equivalente ácido gálico / g de extrato seco) e rendimento (%) de fenóis e para a concentração (mg equivalente catequina / g extrato seco) e rendimento (%) de flavonoides.

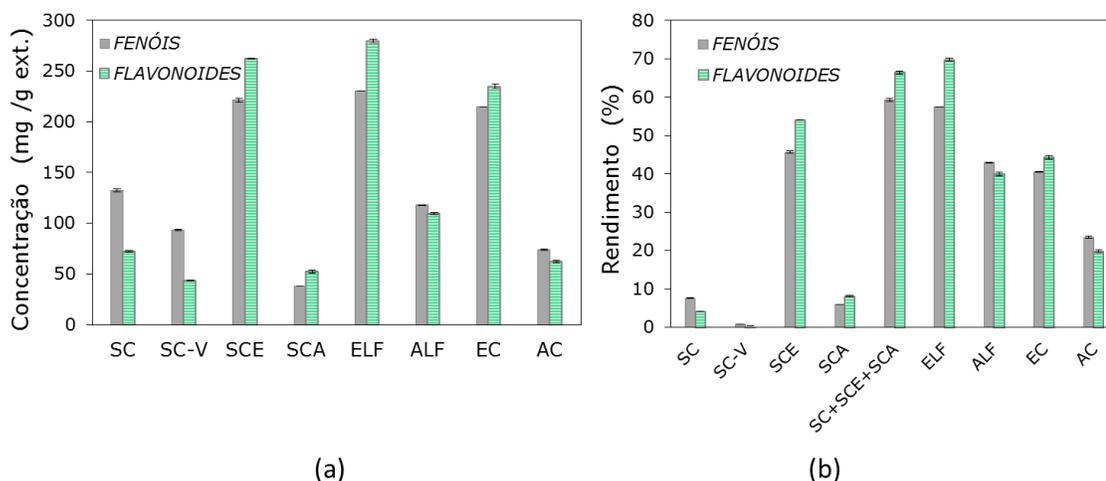


Figura 2 – Concentração (a) e rendimento (b) de fenóis e flavonoides totais nos extratos alecrim-pimenta (*L. sidoides*) obtidos nos diferentes métodos de extração: Supercrítico (SC), supercrítico volátil (SC-V), etanólico sequencial (SCE), aquoso sequencial (SCA), etanólico leito fixo (ELF), aquoso leito fixo (ALF), etanólico convencional (EC) e aquoso convencional (AC). As barras representam o valor da média dos ensaios em triplicata \pm desvio padrão.

Estes resultados indicam a presença de compostos fenólicos de diferentes polaridades. As substâncias de caráter fenólico ficaram mais concentradas nos extratos etanólicos, seguidos do extrato supercrítico e por fim, nos extratos aquosos.

Pode-se observar que as extrações etanólicas se destacaram em relação aos outros solventes independente do processo. Logo, o etanol apresentou uma maior afinidade química com os compostos extraídos favorecendo sua extração, o que indica que essas substâncias apresentam polaridade relativamente elevada.

Observou-se que o rendimento global de extração variou pouco entre os extratos EC, ELF e SCE. No entanto, a análise estatística mostrou que a variável pressão possui influência significativa no rendimento de fenóis entre esses extratos. Os extratos etanólicos obtidos a 400 bar (SCE e ELF) tiveram maior rendimento de compostos fenólicos quando comparados ao extrato etanólico obtido a pressão atmosférica (EC).

A análise dos dados de rendimento e concentração de compostos fenólicos totais para as diferentes extrações aponta a extração sequencial (SC+SCE+SCA) e a extração etanólica em etapa única (ELF) como métodos eficazes na extração dessas substâncias.

No caso dos flavonoides as extrações etanólicas apresentaram concentrações mais altas de flavonoides por grama de extrato. As extrações aquosa e supercrítica apresentaram a seguinte relação quanto ao teor de flavonoides: ALF > SC > AC > SCA > SC-V.

Do ponto de vista estatístico, a pressão apresentou influência significativa no teor flavonoides, para qual os extratos obtidos em etapa única a alta pressão apresentaram rendimentos maiores que os o extratos convencionais.

4. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a extração sequencial é um método eficaz para obtenção de extratos diferenciados a partir de uma mesma matéria prima. O processo em três etapas (SC+SCE+SCA) foi o mais eficiente para obter extratos com alto rendimento global de extração e rendimento de fenóis. Destacou-se a extração etanólica em leito fixo (ELF) para obtenção de extratos mais concentrados em fenóis e flavonoides totais e com o melhor rendimento de flavonoides.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C. S. de; ALVES, L. A.; SOUZA, L. G. da S.; MACHADO, L. L.; MATOS, M. C. de; OLIVEIRA, M. C. F. de; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; MELO, M. T. P.; MARTINS, E. R. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, *Brasil. Rev. bras. plantas med.*, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.

CARVALHO, A. F.; MELO V. M.; CRAVEIRO A. A.; MACHADO M. I.; BANTIM M. B.; RABELO E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CAVALCANTI, E. S.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 66-67, 2002.

GARMUS, T.T.; PAVIANI, L.C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 86, p. 4-14, Fev 2014.

IGNAT, I.; VOLFF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, Jun 15 2011.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, v. 113, n. 9, Supplement 2, p. 71-88, 2002.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M.; MATOS, F. J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. *Annales pharmaceutiques françaises* 54:5 pg 228-30, 1996.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. farmacognosia, química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.79, p.84-7, 1998.

MUKHOPADHYAY, M., Ed. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Raton: CRC Press, Boca Ranton. 2000.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. *Food Science and Technology International*, v. 8, n. 5, p. 269-284, 2002.

SILVA, V.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, JP.; PEREIRA, AV.; HIGINO, JS. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. extract on biological isolates of *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, 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.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia*, v. 83, n. 3, p. 508-512, Apr 2012.

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