

FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA FOLHA DE CAFERANA (*Bunchosia glandulifera*) COM APLICAÇÃO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Palavras-Chave: EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA, ANTIOXIDANTE, ALZHEIMER

Autores(as):

GABRIEL RAMALHEIRA BASAGLIA, FEA – UNICAMP

SARA FRAGA (coorientadora), FEA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. KLICIA ARAUJO SAMPAIO (orientadora), FEA – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

A árvore da caferana (*Bunchosia glandulifera*) produz frutos de coloração vermelha intensa, com polpa cremosa, adocicada, ligeiramente picante e rica em licopeno. Suas folhas são utilizadas em infusões para a prevenção de doenças carcinogênicas, coronarianas e neurodegenerativas, além de auxiliar na preservação da perda de memória. O tônico feito a partir dessas folhas é consumido por comunidades indígenas e residentes das regiões Norte do Rio Grande do Sul e Sul de Santa Catarina para restaurar a força física e o vigor mental (Giraldi; Hanazaki, 2010).

Os benefícios empiricamente declarados na performance mental de consumidores da terceira idade, podem apresentar correlação com estudos realizados com as sementes e com a polpa da caferana, que detectaram a presença de aminoácidos, alcaloides, polióis, carotenoides, ácidos graxos e atividade antioxidante que apresentam ação benéfica no sistema nervoso central, na preservação da memória e na prevenção de doenças relacionadas a neuro degeneração, como o Alzheimer (Fraga et al., 2020, 2021, 2023).

Pesquisas recentes realizadas com a folha da caferana indicaram que as percepções dos consumidores das infusões podem ter respaldo científico. Estudos identificaram na variedade *Bunchosia armeniaca*, um total de 88 compostos, entre eles: 3 alcaloides (trigonelina, harmalina e cafeína), 6 ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido 3,4-dihidroximandélico), 36 flavonoides (flavonois, flavonas, flavanonóis, isoflavonas e flavanonas), 4 cumarinas (daphnetina, esculina, escopoletina e himecromona), 9 polifenóis (2 estilbenóides, 2 flavan-3-ols, 4 antocianinas e 1 chalcona), 13 aminoácidos (5-hidroxisilina, L-histidina, ácido 3-aminoisobutírico, ácido L-glutâmico, ácido 2-aminoisobutírico, L-triptofano, L-glutamina, L-hidroxiprolina, tirosina, ácido L-piroglutâmico, D-alo-isoleucina, fenilalanina e L-metionina sulfona) e 17 compostos diversos, incluindo ácido gama-linolênico (ω -6), gamatocotrienol, piridoxiamina, piridoxina, ácido pantotênico, riboflavina, ácido nicotínico e γ -terpineno. Os extratos da folha apresentaram atividade contra a doença de Alzheimer (Abbas et al., 2022).

O método de extração a partir de fluidos supercríticos SFE (Supercritical Fluid Extraction) como o dióxido de carbono (ScCO_2) ou com fluidos pressurizados - PLE (Pressurized Liquid Extraction) como etanol ou água, apresenta vantagens quando comparado aos métodos tradicionais que aplicam solventes orgânicos, como melhor seletividade no processo, maior pureza dos extratos, fracionamento integrado à extração e a baixa ou ausência de toxicidade dos solventes utilizados (Garmus et al., 2014; Gullón et al., 2020).

O objetivo da realização deste trabalho foi obter extratos de folhas de caferana utilizando SFE e PLE como métodos de extração, realizando um fracionamento por diferença de polaridade de solventes.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais

As amostras de folhas de caferana (*Bunchosia glandulifera*) foram coletadas entre os meses de janeiro e abril de 2022, no município de Santo Antônio da Patrulha (RS), preparadas, higienizadas, secas em estufa de circulação de ar forçado, trituradas e embaladas para conservação. Para as extrações foram utilizados os solventes hexano, etanol, metanol e clorofórmio. Todos com grau PA.

2.2 Análises físico-químicas da matéria-prima

As folhas foram caracterizadas quanto a densidade real e densidade aparente de partículas (Uquiche; del Valle; Ortiz, 2004); porosidade (Rahman et al., 1996); Diâmetro médio de partículas (Wilcox; Deyoe; Pfost, 1970). teor de umidade (AOCS, 2017); teor total de voláteis e umidade (AOAC, 1997); Determinação do pH, Teor de sólidos solúveis por refratômetro (°Brix), Teor de fibra bruta, Teor de cinzas totais (IAL, 2008); teor de lipídios totais (AOCS, 2017); teor de proteínas totais (método de combustão Dumas e fator de correção: 6,25) e teor de carboidratos totais por diferença das demais composições.

2.3 Métodos de extração

Os extratos foram obtidos em leito fixo com ScCO₂ sob pressão de 350 bar, seguido de extração com etanol e água respectivamente, sob pressão de 150 bar. A temperatura de trabalho foi de 60 °C. Os detalhes do processo podem ser observados na Figura 1.

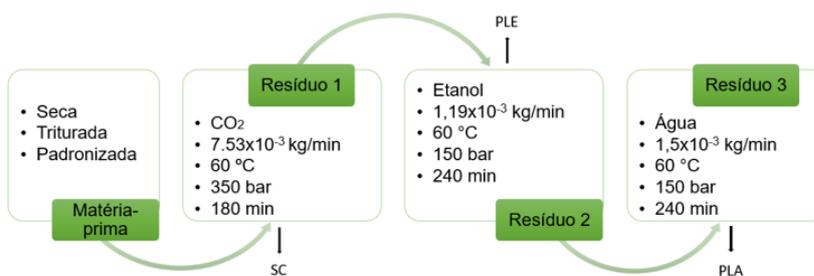


Figura 1 - Dados detalhados dos processos de extração SFE e PLE

2.4 Cinética de extração e rendimento global

O leito foi preenchido totalmente com cerca de 34,88 g de matéria-prima e em seguida foi pressurizado com CO₂ até 350 bar, ficando em repouso em temperatura de 60 °C por 30 min. A primeira etapa da extração foi realizada no tempo de 3 horas, sendo distribuído em 13 pontos com intervalos de 10 min para a primeira hora, 15 min para a segunda hora e 20 min para terceira hora. Na segunda etapa o fluido passou a ser etanol e a extração teve acréscimo de 1 h (intervalo de 20 min) completando tempo de 4 h de processo distribuído em 16 pontos. A terceira etapa teve como fluido água e o tempo foi distribuído de forma idêntica à segunda etapa. Os extratos foram secos, concentrados e pesados, para a quantificação do rendimento em cada etapa, bem como do rendimento global, calculado pela razão entre a massa de extrato e a massa da matéria-prima inicial. As curvas da cinética de extração foram plotadas em software Excel (Licenciado sob ID 00327-60000-00000-AA092, Microsoft®, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da matéria-prima

Os resultados das análises físico-químicas da folha da caferana, podem observados na Tabela 1. As análises entre a densidade real das partículas e densidade aparente do leito apresentou diferença de $1,122 \text{ g.cm}^{-3}$. A diferença pode ser explicada pela presença de espaços vazios quantificados na análise de densidade aparente. A

razão entre os valores das densidades real e aparente forneceu o valor da porosidade do leito de partículas. Na definição do tamanho médio das partículas da matéria-prima considerou-se a facilitação dos processos de extração, pois a porosidade e o tamanho das partículas de um soluto são propriedades fundamentais. Estas impactam diretamente na permeação do solvente, garantindo maiores ou menores superfícies de contato entre o soluto e o solvente, facilitando ou dificultando os fenômenos de difusão e convecção e o rendimento dos extratos (Bird; Stewart; Lightfoot, 2004).

Entre as análises de umidade e de teor de voláteis totais foi observado 1,6% de diferença, podendo ser justificado através da evaporação ocorrida no método de incineração, que pode arrastar compostos voláteis (Garmus et al., 2014). O valor pH das folhas de caferana ficou semelhante ao pH das folhas de *Moringa oleífera*, que apresentou resultados de 5,40 podendo ser classificado como pouco ácido (Câmara et al., 2019). O teor de sólidos solúveis foi de 2 °Brix, indicando que nas folhas contêm baixos índices de açúcares. O teor de fibra bruta obtido foi de 25,95%, ficando abaixo do que foi encontrado para as folhas da *Moringa oleífera* de cerca de 38% (Siguemoto, 2013).

As folhas apresentaram alto percentual de cinzas totais com 14,72% com valores maiores do que os obtidos nas folhas de fruta pão (*Artocarpus altilis*) por Silva (2021). Os teores de cinzas estão diretamente relacionados ao conteúdo de minerais como cálcio, fósforo, potássio, ferro e outros minerais presentes na amostra (Nielsen, 2019). O teor de lipídios totais foi de 1,91%, semelhante aos valores encontrados nas folhas de fruta pão e de moringa oleífera que ficaram entre 1,20% e 3% de lipídios (Siguemoto, 2013; Silva, 2021).

As proteínas apresentaram 19,42%, valores semelhantes foram obtidos nas folhas de ora-pro-nóbis (Botrel et al., 2019). O valor de carboidratos totais foi estimado por diferenças entre os valores das demais análises, resultando em torno de 28%, ficando acima dos valores encontrados para as folhas de moringa oleífera por Siguemoto (2013). Os valores de carboidratos totais podem englobar quantidades de outras substâncias importantes para a saúde humana como oligossacarídeos.

Tabela 1 - Resultados físico-químicos das folhas da caferana

Tipos de Análises	Resultados
Densidade real das partículas (g.cm ⁻³)	1,49 ± 0,03
Densidade aparente do leito de partículas (g.cm ⁻³)	0,37 ± 0,04
Porosidade	0,75 ± 0,03
Diâmetro médio das partículas (µm)	607,96 ± 1,94
Teor de umidade Karl Fischer (%)	7,94 ± 0,37
Teor total de voláteis (%)	9,81 ± 0,08
Determinação do pH	5,40 ± 0,08
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	2,00 ± 0,50
Teor de fibra bruta (%)	25,92 ± 1,45
Teor de cinzas totais (%)	14,72 ± 0,31
Teor de lipídios totais (%)	1,91 ± 0,03
Teor de proteínas totais (%)	19,42 ± 0,45
Teor de carboidratos totais (%)	27,83 ± 2,63

3.2 Cinéticas de extração e rendimento global

A cinética da extração sequencial em função do tempo está representada na Figura 2. O rendimento global da extração foi de 46,13% de extrato, distribuídos em 2,84% para o extrato CO₂, de 8,66% para o extrato etanólico e de 34,62 para o extrato aquoso.

Ao analisar a Figura 2, observa-se que na primeira hora de extração (ponto 6) o rendimento foi de 2,25%, o que corresponde a 79,23% do rendimento relativo da etapa. Em seguida o processo entra no período de taxa constante de extração (CER), chegando em 2,70% no ponto 9, que corresponde a 95,07% do rendimento relativo da etapa, indicando que o processo poderá ser interrompido no tempo de 105 min do processo, visando economia de recursos energéticos.

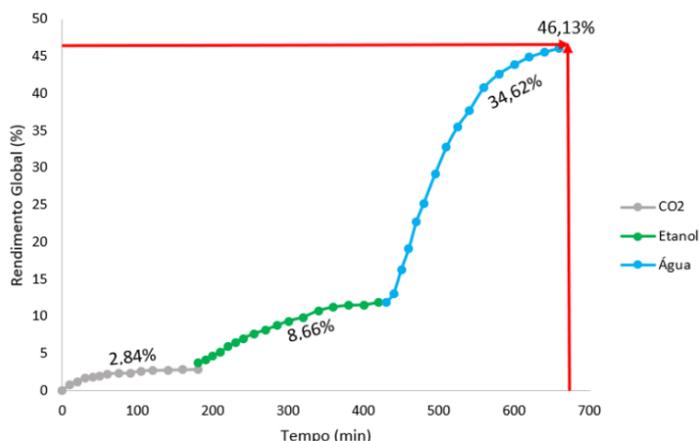


Figura 2 – Cinética de extração e rendimento global

A segunda etapa de extração apresentou rendimento de 8,66% quando atingiu o ponto 9. Na primeira hora de extração (ponto 6 etanol) o rendimento foi 3,67%, equivalente a 42,38% do rendimento relativo da etapa. Na segunda hora (ponto 10 etanol) o rendimento chegou a 5,92%, equivalente a 68,36% do rendimento relativo. Na terceira hora (ponto 13 etanol) o rendimento chegou a 7,90% chegando a 91,22% do rendimento equivalente da etapa etanólica. A partir da terceira hora o processo para a ser lentamente definido pelo fenômeno de difusão e inicia o período de taxa de extração decrescente (FER), que pode ser observada a partir do ponto 14 (etanol), permanecendo constante até o ponto 16 (etanol).

A terceira etapa da extração apresentou rendimento de 34,66% e o alto rendimento pode estar relacionado à presença de açúcares, sendo que os extratos, após a secagem por liofilização, apresentaram formação compatível com a cristalização destes componentes. Na primeira hora (ponto 6 água) o rendimento foi de 13,73% equivalente a 39,69% do rendimento relativo da etapa. Na segunda hora (ponto 10 água) do processo o rendimento foi de 26,14% e chegou a 75,51% o rendimento relativo. Na terceira hora (ponto 13 água) da extração o rendimento alcançou 32,34% equivalendo a 93,41% do rendimento relativo da etapa. Na extração aquosa podemos observar que a taxa decrescente do processo não foi alcançada, pois apenas no ponto 16 (água) que o rendimento iniciou o processo de redução. Porém, a etapa foi interrompida ao completar 4 h de processo e conforme avaliação do rendimento, poderia ser interrompida com 3 h de processo. A continuidade de um processo de extração deve ser avaliada considerando-se fatores como o tempo, mão-de-obra, custos energéticos, de solventes e principalmente valor econômico e a demanda do extrato a ser obtido.

4.0 CONCLUSÕES

As folhas da caferana (*Bunchosia glandulifera*) apresentam potencial bioativo e de ação benéfica no organismo humano, principalmente de ação na mitigação dos efeitos degenerativos provocados por doenças que afetam o cérebro. A presença de altas quantidades de proteínas, fibras, cinzas e carboidratos pode ser indicativo de potencialidade nutricional para alimentação de pessoas com restrição do consumo de proteína animal. A produção de extratos fracionados por solventes com diferenças de polaridade, aplicando sistema supercríticos e pressurizados se apresenta como uma opção economicamente viável, levando-se em consideração o alto grau pureza dos extratos e a baixa ou ausência de toxicidade, tanto para os consumidores quanto para o meio ambiente, devido aos solventes utilizados, pois podem ser considerados como solventes *verdes* e ambientalmente amigáveis.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, H. A. *et al.* Novel Neuroprotective Potential of *Bunchosia armeniaca* (Cav.) DC against Lipopolysaccharide Induced Alzheimer's Disease in Mice. **Plants**, [s. l.], v. 11, n. 14, 2022.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th. ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1997.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 7th. ed. Urbana: American Oil Chemists' Society, 2017.
- BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Fenômenos de transporte**. 2th. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2004.
- BOTREL, N. *et al.* Estudo comparativo da composição proteica e do perfil de aminoácidos em cinco clones de ora-pro-nóbis. **EMBRAPA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 196, [s. l.], v. 196, p. 1–20, 2019.
- CÂMARA, G. B. *et al.* Caracterização físico-química, toxicológica e nutricional das folhas da *Moringa oleifera* Lam secas e *in natura*. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1–13, 2019.

- FRAGA, S. *et al.* Caferana seeds (*Bunchosia glandulifera*) as a new source of nutrients: Evaluation of the proximal composition, solvent extraction, bioactive compounds, and δ -lactam isolation. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 12, 2021.
- FRAGA, S. *et al.* Physico-chemical evaluation and carotenoid profile of *in natura* caferana pulp and low sugar carotenoid supplement. *In:*, 2023, Campinas. (UNICAMP, Org.) **15° SLACAN - Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição: “A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável”**. Campinas: [s. n.], 2023. p. 1–1.
- FRAGA, S. *et al.* Sequential high-pressure extraction of caffeine and bioactive compounds from caferana seeds (*Bunchosia glandulifera*). **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdã, v. 165, p. 104958, 2020.
- GARMUS, T. T. *et al.* 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**, Amsterdã, v. 86, p. 4–14, 2014.
- GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta botânica brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 395–406, 2010.
- GULLÓN, P. *et al.* Smart advanced solvents for bioactive compounds recovery from agri-food by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdã, v. 101, p. 182–197, 2020.
- IAL, I. A. L. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV ed. 1ªed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- NIELSEN, S. S. **Food Science Text Series Food Analysis**. 5ªed. Switzerland: Springer International Publishing, 2019-. ISSN 2214-7799.v. 1
- RAHMAN, M. S. *et al.* Density, shrinkage and porosity of calamari mantle meat during air drying in a cabinet dryer as a function of water content. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 135–145, 1996.
- SIGUEMOTO, É. S. **Composição nutricional e propriedades funcionais do murici (*Byrsonima crassifolia*) e da moringa (*Moringa oleifera*)**. 2013. 1–125 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- SILVA, C. E. **Estudo sobre caracterização físico-química, compostos bioativos e atividade antioxidante da fruta pão (*Artocarpus altilis*)**. 2021. 1–77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal De Sergipe, São Cristóvão, 2021.
- UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering**, Amsterdã, v. 65, n. 1, p. 55–66, 2004.
- WILCOX, R. A.; DEYOE, C. W.; PFOST, H. B. A Method for Determining and Expressing the Size of Feed Particles by Sieving. **Poultry Science**, Amsterdã, v. 49, n. 1, p. 9–13, 1970. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119532606>.