PLANEJAMENTO FATORIAL PARA MAXIMIZAR FLAVONOIDES EM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE MORINDA CITRIFOLIA, CULTIVADAS NO MACIÇO DO BATURITÉ/CE.

Holanda, Isnara Silva[1]
Carmo, Franciany Costa Do[2]
Nunes, Luanne Eugênia[3]
Amorim, Marcelo Vítor De Paiva[4]

RESUMO

A *Morinda citrifolia* (L.) é uma planta medicinal da família Rubiaceae, cujo um número elevado de atividades farmacológicas tem sido relatado nos extratos dos frutos, folhas e raízes, tais como analgésico, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora. Por esse motivo, o presente projeto teve como objetivo avaliar mediante um planejamento fatorial, quais alterações garantiriam uma melhor obtenção de quantidade de flavonoides nas folhas de *Morinda citrifolia* (L). O planejamento resultou em 15 amostras diferentes, com tamanhos de folhas (até 10 cm, entre 10 e 20 cm e entre 20 a 30 cm), proporção de solução extratora (10%, 30% e 50% etanólica) e tempo de extração (30, 60 e 120min), todas realizadas à 75 °C em ultrassom. A quantificação de flavonoides variou entre 21,27 a 74,5 mg de quercetina/ 100g de amostra. O planejamento fatorial revelou que a melhor condição para flavonoides foi de 30cm:30%:60 min. Esses resultados indicam que a depender do interesse do composto a ser extraído, condições experimentais devem ser adequadas à necessidade.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Planejamento fatorial; Morinda citrifolia (L); Atividade antioxidante.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, isnaraholanda@aluno.unilab.edu.br[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, francianycosta@aluno.unilab.edu.br[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, luanne.eugenia@unilab.edu.br[3]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, marcelo.amorim@unilab.edu.br[4]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, as plantas medicinais vêm sendo empregadas pela população de todos os continentes para o tratamento de diversas enfermidades, referenciando-as na medicina popular por suas propriedades farmacológicas, as quais geralmente conduzem às prospecções de princípios ativos e pesquisas científicas para comprovação de sua segurança, eficácia e qualidade.

As plantas sempre foram consideradas como fontes de novos medicamentos para as mais diversas doenças (Yilmazer *et al*., 2016). Diversas pesquisas mostraram que os metabólitos das plantas exercem diversos efeitos terapêuticos (Phosrithong & Nuchtavorn, 2016; Remila *et al*., 2015), tais como as ações anti-inflamatórias. O potencial efeito anti-inflamatório de vários compostos naturais são evidenciados pelo controle de peças-chave no desenvolvimento da inflamação com a modulação dos mediadores inflamatórios (Souza *et al*., 2017).

Muitos constituintes têm sido identificados no fruto da *M. citrifolia* (L.), os quais possuem atividade antioxidante, propriedades cardioprotetoras e hepatoprotetoras. Dentre essas, destacam-se 3,3’ – bisdimetilpinoresinol, americanol A, americanina A, moridonlina, isoprincepina, neolignina, kaempferol, quercetina, rutina, catequina e epicatequina (Wang *et a*l., 2008). Diversas pesquisas químicas foram conduzidas na espécie, resultando na identificação de várias categorias de metabólitos e uma variedade de compostos, incluindo flavonoides, compostos fenólicos, iridoides, cumarinas, antraquinonas e terpenoides (Gomes *et al*, 2021).

Com base nos achados na literatura e o seu uso comumente empregado nas populações, o presente projeto teve como objetivo avaliar mediante um planejamento fatorial, quais alterações garantiriam uma melhor obtenção de resposta da quantidade de flavonoides nas folhas de *Morinda citrifolia* (L).

METODOLOGIA

As folhas de *Morinda citrifolia* (L.) foram coletadas das plantas localizadas na região do Maciço do Baturité, no período da manhã a uma temperatura de 25 °C na região da Fazenda Experimental Piroás da UNILAB em Redenção no mês de fevereiro, coordenadas 25°03’15.7”S 50°08’02.9”W. As folhas coletadas foram totalmente expandidas, com pecíolo, livres de pragas e doenças e de uma mesma árvore. O material coletado foi imediatamente transportado até o Laboratório de Microbiologia da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras e imediatamente higienizado. As amostras foram desidratadas em estufa para esterilização e secagem (Odontobrás 1.1) com temperatura regulada para 50 °C. Em seguida, as folhas foram moídas em gral e pistilo e peneiradas em um tamis, de modo a obter uma amostra com granulometria de diâmetro inferior a 0,71 mm. Posteriormente, estas foram armazenadas protegidas da luz, em tubos do tipo Falcon envoltos em papel alumínio e mantidas em temperatura de - 6 °C até o momento das análises.

2.1 Delineamento do Planejamento Fatorial

Foram realizados experimentos com o planejamento fatorial de Central Composite Design (CCD), cuja abordagem é amplamente utilizada em experimentos de superfície de resposta (Response Surface Methodology - RSM). O objetivo do CCD é modelar e otimizar processos que envolvem múltiplos fatores ou variáveis independentes, ajudando a determinar as condições ótimas para um sistema ou processo. Para tal utilizaram-se as seguintes variáveis independentes: tamanho da folha (16g de folhas medindo até 10 cm, 10 a 20 cm e 20 a 30 cm), proporção de solvente extrator hidroalcoólico (10% v/v, 30% v/v e 50% v/v), e tempo de extração (30, 60 e 120 min). Para a construção do delineamento, foi usado o *software* STATISTICA, versão 10, com a ferramenta de solução *Experimental Design.*

2.2 Extração das amostras

ISSN: 2447-6161

Conforme o delineamento do planejamento fatorial, o *software* contabilizou um total de 15 amostras, os quais apresentaram características distintas de acordo com cada variável independente. Um total de 500 mg de cada amostra foi pesada e inserida em tubos falcon, contendo 25 mL de solvente extrator, conforme cada condição. Em seguida, as amostras foram imersas no banho ultrassom à 75 °C, as quais foram retiradas conforme o tempo de extração de cada amostra. O procedimento de extração foi realizado em triplicata para cada condição gerada no delineamento. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro Tubo Falcon. Após a obtenção dos extratos, as amostras foram armazenadas em refrigeração entre 2 a 8 °C até a realização das análises do conteúdo total de flavonoides.

2.3 Determinação do conteúdo total de flavonoides

A quantificação do conteúdo total de flavonoides é realizada por espectrofotometria, utilizando-se cloreto de alumínio como reagente de deslocamento. A técnica baseia-se na propriedade do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonoides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas (Salatino; Woisky, 1998; Marcucci *et al*., 2001).

Para a realização do teste, foi construída a curva de calibração para determinação de flavonoides, utilizando soluções de concentrações seriadas a partir de uma solução padrão etanólica de quercetina (200 mg/L). Para a determinação de flavonoides nos extratos, foram transferidos 4,0 mL de cada extrato para tubos de ensaio de 20 mL, os quais já continham 5,0 mL de etanol absoluto. Em cada tubo, foi adicionado 1,0 mL de cloreto de alumínio metanólico a 5%. As amostras permaneceram em repouso por 30 minutos e, em seguida, foram lidas em espectrofotômetro a 425 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi expresso como a média de flavonoides equivalente em miligrama de quercetina por 100 gramas de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Consoante o delineamento do planejamento fatorial, foram necessárias uma quantidade de 16 g de amostras para cada tamanho de folha. Para isso, foram coletadas 77 amostras de folhas, sendo 40 folhas com até 10 cm, 27 folhas de 10 a 20 cm e 10 folhas de 30 cm. Uma vez que as amostras foram preparadas e levadas à extração, o conteúdo total de flavonoides foi quantificado.

Para a quantificação do conteúdo total de flavonoides, foi construída uma curva de calibração utilizando soluções de concentrações seriadas de quercetina (4,36 a 13,08 mg/L), em triplicata, cuja equação da reta e índice de determinação foram de y = 0,0521x – 0,105 e 0,9989, respectivamente.

As amostras de cada extrato foram lidas no espectrofotômetro e suas absorbâncias foram inseridas na curva de calibração para a determinação do conteúdo total de flavonoides. Os resultados encontrados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Conteúdo Total de Flavonoides.



Fonte: próprio autor, 2024.

Os resultados encontrados foram inseridos no *software* STATISTICA, versão 10, para avaliar quais as condições de superfície resposta (Figura 2) seriam consideradas como valores críticos (melhores respostas) para a determinação do conteúdo total de flavonoides, cujos resultados encontrados foram de tamanho da

ISSN: 2447-6161

folha de 30 cm, proporção de 30% e tempo de extração de 60 min.

Figura 2 – Gráfico de superfície resposta para proporção, tamanho e solvente extrator versus Conteúdo Total de Flavonoides.



Fonte: próprio autor, 2024.

Nota-se que no primeiro gráfico ocorre a relação entre proporção do solvente e tamanho das folhas, indicando os extratos das folhas com maiores tamanhos e menor quantidade de solvente possuem maior teor de flavonoides. Estudos demonstram que a concetração de solvente pode afetar a extração de flavonoides, de forma que uma maior concentração do solvente, nem sempre irá resultar em quantidade maiores de flavonoides, podendo diminuir seu quantitativo (Wang, 2022). O segundo gráfico apresenta a influência da proporção do solvente extrator e do tempo de extração, destacando que uma proporção menor de solvente e tempo prolongado de extração favorecem a extração de flavonoides. Entretanto, pondera-se que o tempo de extração prolongado diminui o rendimento da extração (Naczk, 2004; Silva *et al*., 2007; Tiwari *et al*., 2011).

O terceiro gráfico demonstra a interação entre o tamanho das folhas e o tempo de extração, indicando que quanto maior o tamanho da folha e maior o tempo de extração, maior ser o teor de flavonoides. Partículas menores oferecem uma superfície de contato maior para o solvente, facilitando a liberação de flavonoides, entretanto, se as partículas forem muito pequenas, a extração pode não ser eficiente devido à dificuldade de separação do extrato ou à retenção de solvente dentro das partículas muito finas (Oliveira *et al*., 2016).

CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a proporção do solvente, o tamanho das folhas e o tempo de extração são variáveis determinantes para a otimização da extração de flavonoides. Observou-se que maiores proporções de solvente associadas a folhas de tamanho intermediário e tempos de extração controlados proporcionam uma extração mais eficaz. Contudo, tempos de extração prolongados e folhas muito grandes ou muito pequenas tendem a comprometer o rendimento da extração. Esses achados reforçam a importância de se otimizar cuidadosamente as condições de extração para maximizar o conteúdo de flavonoides, considerando a interação entre as variáveis analisadas.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa gratidão à UNILAB pela bolsa de iniciação científica UNILAB-PIBIC IC.

REFERÊNCIAS

GOMES, N. C. S. *et al*. Atividades farmacológicas e sua relação com o estresse oxidativo de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e30210414149, 2021.

MARCUCCI, M. C. *et al*. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105–112, fev. 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. A, v.

ISSN: 2447-6161

1054, n. 1-2, p. 95–111, 29 out. 2004.

OLIVEIRA, V. *et al*. Campinas, v.18, n.1, supl. I. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 18, p. 230–239, 2016.

PHOSRITHONG, N., & NUCHTAVORN, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Clerodendrum leaf extracts collected in Thailand. **European Journal Integrative Medicine**, 8(3), 281–285, 2016.

REMILA, S., ATMANI-KILANI, D., DELEMASURE, S., LOUIS CONNAT, J., AZIB, L., RICHARD, T. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of Pistacia lentiscus (anacardiaceae) leaf and fruit extracts. **European Journal Integrative Medicine**, 7(3), 274–286, 2015.

SALATINO, A.; WOISKY, R. G. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**,

ISSN: 2447-6161