



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL DA BAHIA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E  
TECNOLOGIAS AMBIENTAIS

Allana Souza de Carvalho

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)  
TRIANA**

PORTO SEGURO 2023

ALLANA SOUZA DE CARVALHO

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)**

**TRIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre(a) em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador(a): Prof(a). Dr.(a). Luciano da Silva Lima

Coorientador(a): Prof (a). Dr (a). Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira

PORTO SEGURO 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DO IFBA, COM OS  
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

C33lu Carvalho. Allana Souza de.

Uso de solventes eutéticos profundos na extração de constituintes Químicos de *Miconia albicans* (Sw.) Triana/ Allana Souza de Carvalho; Orientador Luciano da Silva Lima; Coorientador, Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira -- Porto Seguro: IFBA, 2023.

55 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Ambientais) -- Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal da Bahia, 2023.

1. Antioxidante. 2. Ácidos Fenólicos. 3. Mata Atlântica - Bahia. I. Lima, Luciano da Silva, orient. II. Bandeira, Marcus Luciano Souza de Ferreira, Coorientador. III. TÍTULO.

CDU:574.2

ALLANA SOUZA DE CARVALHO

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)**

**TRIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre(a) em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador(a): Prof (a). Dr. (a). Luciano da Silva Lima

Coorientador(a): Prof (a). Dr. (a). Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira

Este trabalho foi submetido à avaliação e julgado aprovado em: 31/ 05/ 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr(a). Florisvalda da Silva Santos  
Universidade Federal do Sul da Bahia



---

Dr(a). Bruno Oliveira Moreira  
Universidade Federal da Bahia

---

Dr(a). Allison Gonçalves Silva  
Instituto Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente



ALLISON GONCALVES SILVA

Data: 29/06/2023 10:55:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**ORIENTADOR(A)**



Documento assinado digitalmente

LUCIANO DA SILVA LIMA

Data: 04/07/2023 09:25:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr(a). Luciano da Silva Lima  
Instituto Federal da Bahia

PORTO SEGURO  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por sempre me dar forças e sabedoria para vencer cada batalha. Ao meu esposo Raimundo Damião dos Santos Corrêa por sempre me apoiar e me ajudar nas horas mais difíceis. Aos meus filhos Bianca Carvalho Corrêa e Lorenzo Carvalho Corrêa é por vocês que mamãe luta cada dia. Aos meus pais Manoel Nascimento de Carvalho e Ivone Monteiro de Souza por sempre estarem presentes e sempre acreditarem em mim. As minhas irmãs metralhas Maione, Leilane, Laiss e Jéssica (família Carvalho), vocês são a razão do meu viver, eu amo cada uma incondicionalmente, obrigada por estarem sempre presentes em cada passo da minha vida. Ao Prof. Dr. Luciano da Silva Lima, pela oportunidade, orientação e paciência. Foi uma experiência incrível, aprendi muito com você, como pessoa e como profissional. Obrigada! Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira pelos ensinamentos e pelas dicas. Obrigada por toda ajuda! Ao Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva, pelas dicas e ensinamentos. À minha colega Gabriela Leite de Melo por toda ajuda e colaboração para a confecção deste trabalho, você foi essencial. Muito obrigada por tudo! À minha amiga e companheira de trabalho Leinah Silva Souza, que nunca mediu esforços para me ajudar e me orientar, sem você estaria perdida. Obrigada por estar sempre à disposição. Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação. Obrigada!

CARVALHO, Allana Souza de. **Uso de solventes eutéticos profundos na extração de constituintes de *Miconia albicans* (Sw.) Triana**. Orientador: Luciano da Silva Lima. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Ambientais) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

## RESUMO GERAL

Há muito tempo o ser humano utiliza espécies vegetais para o tratamento e cura de diversas patologias. Apesar de diversas substâncias já terem sido isoladas, ainda existem muitos compostos que se encontram desconhecidos frente a imensa diversidade biológica presente no reino vegetal. Estes compostos provenientes de vegetais podem apresentar ações benéficas sobre a saúde humana, como o de ação antioxidante. Os antioxidantes são compostos com habilidades de impedir ou inibir o impacto dos radicais livre que estão associados ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer. Geralmente a obtenção desses compostos bioativos são realizados por extrações líquido-líquido ou sólido-líquido pelo uso de solventes que normalmente apresentam alguns efeitos nocivos ao meio ambiente. Desta forma, a dissertação apresenta o estudo dividido em dois artigos. O primeiro objetiva a comparação da eficiência da extração de solventes eutéticos e convencionais na extração dos bioativos fenólicos, flavonoides e antioxidante da *Miconia albicans* (Sw.) Triana. Nesse contexto, foram preparados e caracterizados solventes eutéticos, os quais foram avaliados a capacidade antioxidante pelo método de sequestro com o radical livre DPPH, teores de fenólicos e flavonoides totais, além da caracterização química pela identificação de ácidos fenólicos por CLAE-DAD. No segundo artigo buscou a comparação da extração de bioativos da *M. albicans* comercializada versus a planta nativa coletada em diversas regiões da Mata Atlântica Sul da Bahia. Assim, os resultados indicaram que a extração pelo uso do solvente eutético profundo (DES) demonstram ser mais efetivos nas avaliações dos constituintes em *M. albicans*, sendo uma alternativa mais limpa e verde do que os solventes convencionais.

Palavras-chaves: Ácidos fenólicos, Mata Atlântica, Antioxidante

CARVALHO, Allana Souza de. **Use of deep eutectic solvents in the extraction of constituents of *Miconia albicans* (Sw.) Triana.** Advisor: Luciano da Silva Lima. 2023. Dissertation (Master's in Environmental Science & Technology) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

## ABSTRACT

For a long time, human beings have used plant species to treat and cure various pathologies. Although several substances have already been isolated, many compounds are still unknown due to the immense biological diversity present in the plant kingdom. These compounds from vegetables may benefit human health, such as antioxidant action. Antioxidants are compounds that can prevent or inhibit the impact of free radicals associated with the development of chronic diseases like diabetes and cancer. Generally, the extraction of these bioactive compounds is carried out by liquid-liquid or solid-liquid extractions using solvents that usually have harmful effects on the environment. Thus, the dissertation presents the study divided into two articles. The first aims to compare the efficiency of the extraction of eutectic and conventional solvents in the extraction of phenolic bioactive, flavonoids, and antioxidants of *Miconia albicans* (Sw.) Triana. In this context, eutectic solvents were prepared and characterized and evaluated the antioxidant capacity by the method of sequestration with the free radical DPPH, phenolic and flavonoid contents, in addition to the chemical characterization by the identification of phenolic acids by HPLC- DAD. In the second article, we sought to compare the extraction of bioactives from the commercialized *M. albicans* versus the native plant collected in several regions of the Atlantic Forest South of Bahia. Thus, the results indicated that the extraction by using the deep eutectic solvent (DES) is more effective in evaluating the constituents in *M. albicans*, a cleaner and greener alternative than conventional solvents.

Keywords: Phenolic acids, Atlantic Forest, Antioxidant

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da espécie <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana .....	12
<i>Figura 1: Preparação dos solventes eutéticos</i> .....	22
<i>Figura 2: Extração dos constituintes da M. albicans com os solventes eutéticos e convencionais</i> .....	23
<i>Figura 3: Estruturas químicas das substâncias utilizadas na composição dos DES analisados.</i> .....	24
<i>Figura 4: Espectros de absorção de infravermelho na formação do DES 1 (a) e DES 2 (b) e seus precedentes</i> .....	27
<i>Figura 5: Teor de fenólicos e flavonoides totais da espécie M. albicans comercializada. DES 1 (eutético) e DES 2 (eutético); Etanol (EtOH); Metanol (MeOH) ± desvio padrão</i> .....	29
<i>Figura 6: Seletividade dos padrões ácido cafeico (tR 3,310 min), ácido trans-ferúlico (tR 6,255 min), ácido rosmarínico (tR 10,386 min) e ácido trans cinâmico (tR 12,041 min)</i> .....	30
<i>Figura 1. Mapa de coleta da M. albicans</i> .....	42
<i>Figura 2. Obtenção do conteúdo de flavonoides</i> .....	44
<i>Figura 3. Teores de fenólicos e flavonoides totais encontrados nas cinco regiões do Sul da Bahia. Metanol (MeOH) e solventes eutéticos (DES) – cloreto de colina/ácido cítrico/água ....</i> 46	
<i>Figura 4. Seletividade dos padrões ácido cafeico (tR 3,310 min), ácido trans-ferúlico (tR 6,255 min), ácido rosmarínico (tR 10,386 min) e ácido trans cinâmico (tR 12,041 min)</i> .....	47
<i>Figura 5. Semelhanças entre o perfil cromatográfico do material botânico comercializado (a) e nativo (b) da região de Porto Seguro</i> .....	49
<i>Figura 6. Gráfico de cotovelos</i> . ....	50
<i>Figura 7. Gráfico de score (PC1 x PC2) – DES – solvente eutético, MeOH - metanol, CN – Canavieiras, EU – Eunápolis, OS – Porto Seguro, SCC – Santa Cruz Cabrália, UMA – Una e PC – Planta comercial</i> .....	50
<i>Figura 8: Análises de agrupamento hierárquico. PC – Planta comercial, SCC – Santa Cruz Cabrália, CN – Canavieiras, UNA – Una, EU – Eunápolis e PS – Porto Seguro</i> .....	51



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias isoladas da espécie <i>M. albicans</i> .....	13
Tabela 1. Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.....	26
Tabela 2. Capacidade antioxidante dos extratos de <i>M. albicans</i> .....	28
Tabela 3. Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R <sup>2</sup> ), Tempo de retenção (tR), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD .....	30
Tabela 4. Concentração de ácidos fenólicos no extrato de <i>M. albicans</i> .....	31
Tabela 1. Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.....	45
Tabela 2. Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R <sup>2</sup> ), Tempo de retenção (tR), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD .....	48
Tabela 3. Concentração de ácidos fenólicos no extrato de <i>M. albicans</i> em diferentes regiões ...	48

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
OBJETIVOS .....	15
OBJETIVO GERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
ARTIGO 1 .....	19
EXTRAÇÃO VERDE DE COMPONENTES BIOATIVOS DE <i>Miconia albicans</i> (SW.) TRIANA USANDO SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS .....	19
RESUMO.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4. CONCLUSÃO .....	31
5. REFERÊNCIAS.....	32
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	36
ARTIGO 2 .....	40
INVESTIGAÇÃO DE SIMILARIDADES EM EXTRAÇÃO VERDE DOS FITOCONSTITUINTES DE <i>Miconia albicans</i> DE DIFERENTES LOCAIS DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA .....	40
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4. CONCLUSÃO .....	52
5. REFERÊNCIAS.....	52
CONCLUSÃO GERAL.....	54

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse em estudos relacionados com plantas estas por sua vez, constituem a fonte mais antiga de fármacos consumidos pela humanidade por possuírem agentes terapêuticos que são eficazes no tratamento de cura e prevenção de diversas patologias (CORDEIRO *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2022). Entre as substâncias investigadas com interessantes efeitos biológicos destacam-se os compostos fenólicos, os quais constituem o principal grupo de antioxidantes de origem vegetal. Os flavonoides compreendem a mais importante classe de fenólicos que apresentam elevado poder antioxidante (PIERONI *et al.*, 2011). Os flavonoides são tipos de fenólicos com elevado poder antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2009). Os antioxidantes são compostos que apresentam habilidades de impedir ou inibir o impacto de certas enzimas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer (BANOV *et al.*, 2006; MATHEW; SUBRAMANIAN, 2014), além disso, substâncias antioxidantes tem também potencial de induzir respostas de defesa de plantas às doenças fitopatogênicas (RESENDE, 2021).

O reino vegetal possui ainda grande biodiversidade, e novos compostos podem ser encontrados. O Sul do estado da Bahia destaca-se por conter uma imensa área de vegetação preservada, como o bioma Mata Atlântica. Esse bioma abrange cerca de 15% do território nacional, o qual possui extensa diversidade biológica, sendo composta por formações florestais e ecossistemas associados tornando-o um dos conjuntos mais ricos de natureza vegetal e animal do planeta (ARAÚJO, 2013; CRUZ *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Diante do contexto apresentado e da ampla biodiversidade de espécies vegetais existentes, a Mata Atlântica do Sul da Bahia constitui-se em uma área de grande interesse para a extração de compostos bioativos, uma vez que nessa região podem ser encontradas plantas com grande potencial farmacológico, e essa variedade de plantas com potencialidade antioxidante e outras atividades biológicas podem se perder, devido a diminuição dessas áreas vegetais e conseqüentemente o crescimento urbano (HAMANN *et al.*, 2020; PIERONI *et al.*, 2011; SOUZA; LIMA; HACKENHAAR, 2020)

Inúmeras espécies de plantas vêm sendo exploradas comercialmente devido interesse farmacológico, são comercializadas em feiras livres ou casas especializadas, o que gera renda para comunidades que vivem em torno de regiões de grande diversidade biológica. Dentre as espécies de plantas comercializadas, destaca-se a *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Figura 1),

pertencente a família Melastomataceae, conhecida popularmente como canela-de-velho. É uma espécie arbórea muito utilizada na medicina tradicional do nordeste do Brasil para dor nas articulações (artrite, artrose), disfunções estomacais e intestinais, inflamação dentária e outras situações inflamatórias dolorosas. As folhas de *M. albicans* são geralmente utilizadas na forma de chás, feito através de infusão (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2020). A ingestão de chás preparados na forma de infusão auxilia na extração dos compostos fenólicos considerados benéficos à saúde (MORAIS *et al.*, 2009)

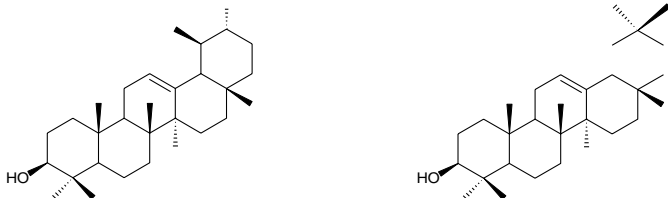
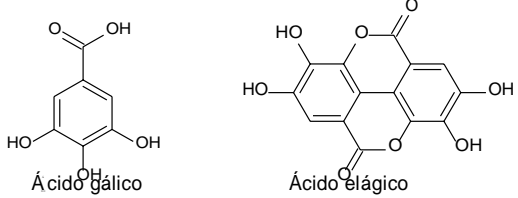
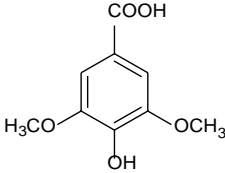
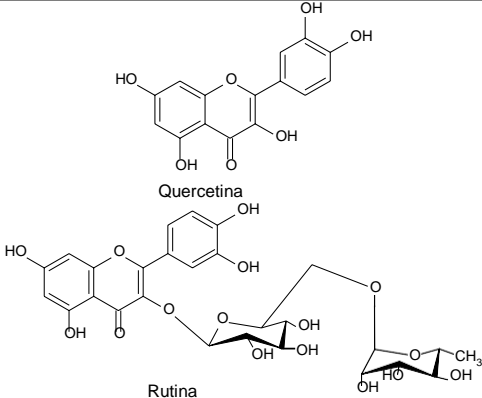
Estudos descritos na literatura identificaram por técnicas como cromatografia gasosa, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (HPLC-LC-ESI-MS/MS), cromatografia em camada e HPLC inúmeros constituintes químicos em extratos de diferentes polaridades (hexano, metanol, etanol, etc) em *M. albicans* (Tab. 1) e a estes, foram atribuídos as ações antifúngica, antitumoral, analgésica, antimalárica e antimicrobiana (extrato etanólico) que foi explicada devido a presença de um conjunto de substâncias, como ácidos triterpênicos, além de efeitos protetores contra danos no DNA induzidos pela doxorrubicina e inibição da tirosinase (CELOTTO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002; CREVELIN *et al.*, 2006; PIERONI *et al.*, 2011; HAMMAN *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Representação da espécie *M. albicans* (Sw.) Triana. Autoria própria.

Por ser uma planta comumente empregada na medicina popular e com um enorme potencial terapêutico, torna-se pertinente o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de proporcionar mais informações sobre a potencialidade farmacológica dessa espécie permitindo assim o uso seguro desse vegetal pela população (SOUZA; LIMA; HACKENHAAR, 2020).

**Tabela 1.** Substâncias isoladas da espécie *M. albicans*

Substâncias isoladas	Técnicas utilizadas	Extrato	Referência
 <p data-bbox="174 531 259 555"><math>\alpha</math>-amirina</p> <p data-bbox="584 531 669 555"><math>\beta</math>-amirina</p>	Cromatografia gasosa	Hexano	Crevelin et al 2006
 <p data-bbox="277 730 389 754">Ácido gálico</p> <p data-bbox="533 730 645 754">Ácido elágico</p>  <p data-bbox="421 951 568 975">Ácido siríngico</p>	HPLC-LC-ESI-MS/MS	Etanol	Hamman et al 2020
 <p data-bbox="412 1166 501 1190">Quercetina</p> <p data-bbox="398 1366 456 1390">Rutina</p>	Cromatografia em camada e HPLC	Metanol	Pieroni et al 2011

Geralmente na obtenção de constituintes químicos de espécies vegetais são empregados solventes orgânicos que apesar de serem eficientes na extração, possuem restrições quanto ao seu uso, pois são inflamáveis, tóxicos, voláteis e não são biodegradáveis, o que acarreta impactos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Nos últimos anos, uma das descobertas mais promissoras no mundo da Química Verde foi o desenvolvimento de solventes verdes, como os Ionic Liquid (ILs) e os Solventes Eutéticos Profundos (*Deep Eutectic Solvents* - DES) (KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015; ÖZEL; ELIBOL, 2021; ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018). Devido a sua grande capacidade de dissolver compostos bioativos oriundos de vários tipos de biomassa, houve uma crescente demanda no uso de ILs como solventes para divisão, extração e purificação de compostos bioativos (VENTURA *et al.*, 2017).

Porém, existe uma preocupação em relação à aplicabilidade dos ILs para extração de compostos bioativos, pois os mesmos possuem alta toxicidade, causando assim efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente, além de elevado custo (GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2010; HAYYAN *et al.*, 2015; JUNEIDI; HAYYAN; HASHIM, 2015; JUNEIDI; HAYYAN; MOHD ALI, 2016; MBOUS *et al.*, 2017). Apesar dos ILs terem sido aceitos como uma fonte de alternativa aos solventes convencionais, por possuírem propriedades que se destacam para os pré-requisitos da Química Verde, como não inflamáveis e reutilizáveis, estes não atenderam a expectativa, ao quesito custo que é de 5 a 20 vezes mais caro do que os solventes convencionais utilizados (DOĞAN ÇALHAN; ÜLGER, 2018). Surge então uma nova busca por solventes alternativos que venham a substituir os ILs e os solventes convencionais utilizados para extração de compostos bioativos. Essa busca tem levado ao uso de solventes eutéticos profundos, que foram aceitos como solventes verdes promissores na extração de bioativos de espécies vegetais, por possuírem características especiais como alta pureza e condutividade, não são inflamáveis, possuem estabilidade térmica além de fácil preparação (DOLDOLOVA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2016; MAJIDI; HADJMOHAMMADI, 2021). Os DES podem ser preparados, utilizando-se uma combinação de materiais que consiste em um aceitador de ligação de hidrogênio (HBA) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD). O cloreto de colina é o HBA mais utilizado como aceitador de hidrogênio, por ter propriedades particulares tais como barato, biodegradável e não tóxico (ALSAUD; SHAHBAZ; FARID, 2021).

Desta forma, torna-se importante a extração de constituintes químicos de produtos naturais utilizando-se novas rotas verdes as quais são consideradas alternativas mais limpas e sustentáveis, apresentando menos riscos à vida, à saúde e ao meio ambiente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar a eficiência da extração dos solventes eutéticos e convencionais na obtenção de compostos bioativos de material botânico da espécie *M. albicans* comercializada, e comparar similaridade de constituintes químicos do material botânico comercializado versus material botânico nativo coletado em diferentes fragmentos da Mata Atlântica localizados em alguns municípios do Sul da Bahia, utilizando análises quimiométricas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Adquirir material botânico da espécie *M. albicans* comercializada e coletar em fragmentos da Mata Atlântica do Sul da Bahia;
- Obter os extratos dessa planta utilizando solventes verdes e convencionais;
- Avaliar o perfil cromatográfico de ambas extrações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Comparar a eficiência de ambas extrações;
- Pesquisar na literatura informações a respeito da espécie *M. albicans* e seus possíveis efeitos fitoterápicos.
- Investigar semelhança da composição química entre o material botânico comercializado e nativo dos diferentes municípios do Sul da Bahia, baseado nos dados obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE-DAD.
- Obter as análises exploratórias por Análises de Componentes Principais (PCA) e Análise de agrupamento Hierárquico (HCA) dos dados obtidos por CLAE-DAD, para possível discriminação, agrupamento e similaridade entre as amostras comercializadas e coletada na Mata Atlântica do Sul da Bahia.

## REFERÊNCIAS

- ALSAUD, N.; SHAHBAZ, K.; FARID, M. Application of deep eutectic solvents in the extraction of polyphenolic antioxidants from New Zealand Manuka leaves (*Leptospermum Scoparium*): Optimization and antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 337, 1 set. 2021.
- ARAÚJO, S. G. **Perspectivas e desafios para o desenvolvimento de fitoterápicos com plantas medicinais da Mata Atlântica para uso veterinário**. 2013. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- BANOV, D.; ROLIM BABY, A.; MARTINS, L.; BOSCO, D.; KANEKO, T. M.; VALÉRIA, M.; VELASCO, R. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219–224, 2006.
- CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; DE ALMEIDA SPESSOTO, M.; GOMES MARTINS, C. H.; CUNHA, W. R. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 339–340, 2003.
- CORDEIRO, M. F.; NUNES, T. R. S.; BEZERRA, F. G.; DAMASCO, P. K. M.; SILVA, W. A. V.; FERREIRA, M. R. A.; MAGALHÃES, O. M. C.; SOARES, L. A. L.; CAVALCANTI, I. M. F.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Phytochemical characterization and biological activities of *plectranthus barbatus andrews*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1–12, 2022.
- CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 8, p. 827-830, 2006
- CRUZ, C. B. M.; VICENS, R. S.; SEABRA, V. da S.; REIS, R. B.; FABER, O. A.; RICHTER, M.; ARNAUT, P. K. E.; ARAÚJO, M. Classificação orientada a objetos no mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica, na escala 1:250.000. **Anais XIII Simposio Brasileiro de Sensoriamento remoto**, n. May 2014, p. 5691–5698, 2007. Disponível em: <<http://marte.sid.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.15.22.53/doc/5691-5698.pdf>>.
- DOĞAN ÇALHAN, S.; ÜLGER, M. Araştırma Makalesi Kolinklorür içeren bazı alçak ötektik çözücülerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. **Mersin Univ Sağlık Bilim Derg**, v. 11, n. 2, 2018.
- DOLDOLOVA, K.; BENER, M.; LALIKOĞLU, M.; AŞÇI, Y. S.; ARAT, R.; APAK, R. Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 353, n. November 2020, 2021.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVÊS, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.
- GORKE, J.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. Toward advanced ionic liquids: Polar,



enzyme-friendly solvents for biocatalysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 40–53, fev. 2010.

HAMANN, B.; WINTER, E. M. dos S.; SILBERT, D. A.; MICKE, G. A.; VITALI, L.; TENFEN, A.; ZIMMERMANN, L. A. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. **Revista Fitos**, v. 14, n. 4, p. 450–461, 18 dez. 2020.

HAYYAN, M.; LOOI, C. Y.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A. In Vitro and in Vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 13 fev. 2015.

JUNEIDI, I.; HAYYAN, M.; HASHIM, M. A. Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83636–83647, 2015.

JUNEIDI, I.; HAYYAN, M.; MOHD ALI, O. Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7648–7659, 1 abr. 2016.

KUDŁAK, B.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 11975–11992, 27 ago. 2015.

LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v. 152, p. 23–32, 15 maio 2016.

MAJIDI, S. M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Development of magnetic dispersive micro-solid phase extraction based on magnetic agarose nanoparticles and deep eutectic solvents for the isolation and pre-concentration of three flavonoids in edible natural samples. **Talanta**, v. 222, n. August 2020, p. 121649, 2021.

MATHEW, M.; SUBRAMANIAN, S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 23 jan. 2014.

MBOUS, Y. P.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A.; LOOI, C. Y. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 105–134, 1 mar. 2017.

MORAIS, S. M.; B CAVALCANTI, E. S.; MARIA COSTA, S. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315–320, 2009.

ÖZEL, N.; ELIBOL, M. A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, 15 jun. 2021.

PIERONI, L. G.; DE REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9439–9450, nov. 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GANDHI, S. R.; PASSOS, F. R. S.; HEIMFARTH, L.; PEREIRA, E. W. M.; MONTEIRO, B. S.; DOS SANTOS, K. S.; DUARTE, M. C.; ABREU, L. S.; NASCIMENTO, Y. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; LIMA, Á. A. N.; ZENGIN, G.; QUINTANS, J. S. S. Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, 10 ago. 2020.

RESENDE, Mário Lúcio Vilela et al. Produtos alternativos para o controlo de doenças das plantas. **Química**, 2021.

RODRIGUES, K. F.; BITENCOURT, T. C.; NÚÑEZ, J. G.; GARCIA, H. O.; BUHL, B.; PADILHA, G. L.; ETHUR, E. M.; HOEHNE, L.; BRUNO, A. N.; FREITAS, E. M. Phytochemical profile and biological activities of *Bromelia antiacantha* extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–7, 2022.

SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; PEDRO, C.; GARCIA, P. A.; MARTINS, C. Avaliação da atividade analgésica de um extrato etanólico de *Miconia fallax*. **Fazenda Boll Chim.**, v. 141, n. 2, p. 158–160, 2002.

SOUSA, M. de; SILVA, C. M. R.; VIEIRA-JR, G. H. M.; AYRES, M. C. C.; CHARLLYTON, L. da C. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. D. C.; BARROS, E. S. D.; ARAÚJO, P. M. B. de; CHAVES, B. M. H. M. S. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, L. S.; LIMA, L. da S.; HACKENHAAR, D. S. M. **Estudo de espécies vegetais bioativas da Mata Atlântica do sul da Bahia**. 2020. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, 2020.

VENTURA, S. P. M.; E SILVA, F. A.; QUENTAL, M. V.; MONDAL, D.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6984–7052, 24 maio 2017.

ZDANOWICZ, M.; WILPISZEWSKA, K.; SPYCHAJ, T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 361–380, 15 nov. 2018.

Este artigo/capítulo está formatado segundo as normas da Revista Scientia Plena  
Disponível no site: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp>.

## ARTIGO 1

### Extração verde de componentes bioativos de *Miconia albicans* (Sw.) Triana usando solventes eutéticos profundos

Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000  
Porto Seguro - BA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências  
Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

-----  
 Manuscrito com material suplementar  
 Manuscrito sem material suplementar

-----  
\*e-mail:[lucianolima@ifba.edu.br](mailto:lucianolima@ifba.edu.br)

## Green extraction of bioactive components of *Miconia albicans* (Sw.) Triana using deep eutectic solvents

### ABSTRACT

The use of green solvents, including eutectic solvents (DES), for the extraction of natural bioactive compounds such as antioxidants, phenolic acids, and flavonoids has grown more and more due to their ability to present unique properties such as high solubility, low volatility, low cost, and easy preparation. In this study, for the first time, combined DES solvents were applied to extract antioxidants, phenolic acids, and flavonoids from *Miconia albicans* (Sw.) Triana is marketed in the city of Porto Seguro. Known as cinnamon-de-velho is widely used in folk medicine for presenting anti-inflammatory action. The present research aimed to compare the efficiency of the extraction of eutectic and conventional solvents in obtaining bioactive compounds of *M. albicans*. The DPPH free radical sequestration method evaluated the presence of antioxidant activity, while the total phenolic contents were evaluated according to the Folin-Ciocalteu method. The extracts' phenolic compounds were characterized by Liquid Chromatography and High Performance (HPLC-DAD). The results indicated that the highest content of flavonoids found in the extraction of the species *M. albicans* was  $73.0 \pm 0.1 \mu\text{g EQ g}^{-1}$  extraction performed with choline chloride and urea (DES 1). In contrast, the solvents choline chloride and citric acid (DES 2) and Methanol (MeOH) demonstrated greater efficacy in extracting phenolic compounds  $978.3 \pm 0.3$  and  $1,023.1 \pm 3 \times 10^{-2}$  EAG  $\text{g}^{-1}$ , respectively. For antioxidant activity, the solvents MeOH and ethanol (EtOH) were more successful in the extraction with antioxidant activity index (IAA) 1.97 and 1.07  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , indicating an intense activity and strong activity. The DES investigated, even in smaller amounts, showed relevant IAA DES 1 0.44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (low activity) and DES 2 0.88  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (moderate activity), characterizing the presence of phenolic compounds and antioxidant activity of the plant sample. The HPLC-DAD analysis identified caffeic, transferulic, rosmarinic and transcinnamic acids using the MeOH solvent, while the other solvents identified only rosmarinic acid. However, when comparing the extraction efficacy of such solvents, the DES 1 solvent was the one that obtained the greatest success for the extraction of rosmarinic acid, which was identified and quantified. Eutectic solvents are effective in extracting bioactives from *M. albicans* with phenolic substances very present in medicinal plants.

Key words: herbal medicines, phenolic compounds, plant species

## 1. INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida no Brasil como canela-de velho, a *Miconia albicans* (Sw.) Triana é uma das espécies mais importantes da família Melastomataceae, podendo atingir até 3 metros de altura, é muito encontrada na flora brasileira, especialmente no Cerrado e Mata Atlântica [1,2]. Na medicina popular, suas partes aéreas são utilizadas na forma de chá, feito por decocção ou infusão, por causa de suas características anti-inflamatórias, como o tratamento de artrite e artrose [3,4]. Estudos realizados por Serpeloni et al (2011) [5] e Hamman (2020) [4] revelaram a presença de metabólitos secundários, tais como esteróis, triterpenos e polifenóis, indicando atividade biológica para esta espécie como ação antioxidante, efeito protetor mutagênico, ação anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antidiabética.

No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução N° 400 de 16 de fevereiro de 2017, proibiu a fabricação, distribuição e comercialização de fitomedicamentos à base de *M. albicans* [6], por falta de estudos formais sobre a segurança e eficácia do uso interno desta planta. Assim, torna-se pertinente o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de proporcionar mais informações sobre a potencialidade farmacológica dessa espécie, permitindo assim o uso seguro desse vegetal pela população [7].

Nesse sentido, na extração dos constituintes químicos de plantas são utilizados solventes orgânicos voláteis como clorofórmio, etanol, metanol, hexano, acetato de etila, acetona, propanol ou suas misturas. Entretanto, esses solventes apresentam grande toxicidade, inflamabilidade, custo elevado, longo tempo para a extração e não são biodegradáveis [8,9]. Portanto, torna-se necessário o emprego de solventes que sejam mais sustentáveis, ou seja, uma opção mais limpa na extração de compostos bioativos, tais como os solventes eutéticos profundos (DES). Assim, os DES se destacam por apresentarem propriedades específicas como boa biocompatibilidade, sustentabilidade, são biodegradáveis, além de fácil preparação e armazenamento [10].

Os DES são preparados, utilizando-se um aceitador de hidrogênio (HBA) e doador de hidrogênio (HBD) em uma correlação molar específica, criando assim uma mistura transparente. O cloreto de colina é um HBA mais frequentemente utilizado na preparação dos DES, à medida que os açúcares, álcoois, amins e ácidos são comumente empregados como HBD [11]. Esses solventes são formados por materiais sólidos e/ou líquidos com

elevados pontos de fusão, que resultam em misturas líquidas a temperatura ambiente. Possuem, grande capacidade de extrair substâncias de diferentes polaridades tornando-os bem versáteis para o uso e obtenção de constituintes químicos bioativos [12].

Estudos feitos por Dheyab (2021) [12] revelaram que os DES possuem seletividade na extração de compostos bioativos, como saponinas, polifenóis, antraquinonas, flavonoides e ácidos fenólicos de fontes naturais diferentes. Muitos compostos fenólicos extraídos de plantas têm apresentado atividade antioxidante, como o ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cafeico e flavonoides [13,14]. Os flavonoides na maioria das plantas são tipos de fenólicos com elevado poder antioxidante [15,16]. Os antioxidantes, são compostos que apresentam habilidades de impedir ou inibir o impacto de certas enzimas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer [17,18].

Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar a extração de fenólicos, flavonoides e avaliar a atividade antioxidante de *M. albicans* com o uso de DES e solventes convencionais, e desta forma comparar os resultados.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Material vegetal

Foram adquiridas 200g de folhas secas de *M. albicans* embaladas em saco plástico com validade de 6 meses, em local de comercialização na cidade de Porto Seguro - Bahia, Brasil no mês de novembro de 2021.

### 2.2. Preparação dos solventes eutéticos profundos

Os DES foram preparados pela mistura do cloreto de colina (Êxodo científica) e ureia (Dinâmica) 1:2 m/m (DES 1), cloreto de colina, ácido cítrico (Dinâmica) e água ultrapura 1:1:2 m/m (DES 2). Neste processo reacional todas misturas foram aquecidas a 60°C por 3h, sob agitação constante com auxílio de agitador magnético (Fig. 1). Após resfriamento à temperatura ambiente, os solventes sintetizados foram armazenados em dessecadores protegidos da luz.

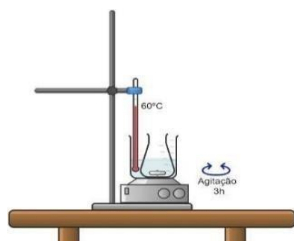


Figura 1: Preparação dos solventes eutéticos. Autoria própria.

### 2.3 Preparação dos extratos

As folhas foram trituradas em moinho de facas e peneiradas em agitador de peneiras (Lucadema, modelo 04/01) à granulometria de 0,450 mm. Os procedimentos extrativos dos constituintes foram realizados por adaptação da metodologia descrita por Christina Bakirtzi [19]. Desta maneira, foram preparadas soluções a 80% (v/v) dos DES 1 e DES 2 e 60% de etanol (EtOH) (Qhemis) e metanol (MeOH) (Sigma-Aldrich) em tubos de 15 mL com água ultrapura. Nos tubos foram adicionados 0,1 g das folhas moídas, 5 mL da mistura dos solventes sob agitação manual e conduzidas a extração no banho ultrassônico (Cristófoli-modelo 11/2010) a 60 °C por 100 min (220V~0,17 kW – 0,8 A,  $f=50/60$  Hz e  $f_{\text{ultrassônica}}=42$  kHz). Na sequência, os materiais foram centrifugados a 2,954 XG por 20 minutos em uma centrífuga (Centrífuga NT810- nova técnica) (Fig. 2) e em seguida guardados sob refrigeração para posteriores análises.



Figura 2: Extração dos constituintes da *M. albicans* com os solventes eutéticos e convencionais. Autoria própria.

### 2.4 Preparo das pastilhas de Brometo de Potássio - KBr

As pastilhas foram preparadas a partir da trituração do KBr em almofariz de ágata. Os reagentes cloreto de colina (Êxodo científica), ureia (Dinâmica), ácido cítrico (Dinâmica) e os solventes eutéticos preparados DES 1 (cloreto de colina/ureia) e DES 2 (cloreto de colina/ácido cítrico/água) foram misturadas, separadamente, ao KBr triturado. Em seguida, foram colocados 0,1g da mistura no pastilhador seguido de compressão em prensa hidráulica de 10 t/min, para obtenção de pastilhas finas e transparentes.

#### 2.4.1 Caracterização dos solventes eutéticos por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

As pastilhas adquiridas foram introduzidas no compartimento de leitura do Espectrômetro de Infravermelho IRAffinity-1S Shimadzu (modelo 00392, Japão) e

analisadas, obtendo-se os espectros de cloreto de colina/ureia/DES 1 e cloreto de colina/ácido cítrico/água DES 2. Os espectros foram obtidos na faixa espectral entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  [20]. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

A caracterização estrutural dos DES, foram realizadas por espectroscopia no infravermelho. De modo a reconhecer as alterações espectrais e estruturais em razão das ligações de hidrogênio formadas no decorrer da síntese dos DES, investigou-se os precedentes individualmente e os DES produzidos a partir destes (Fig. 3).

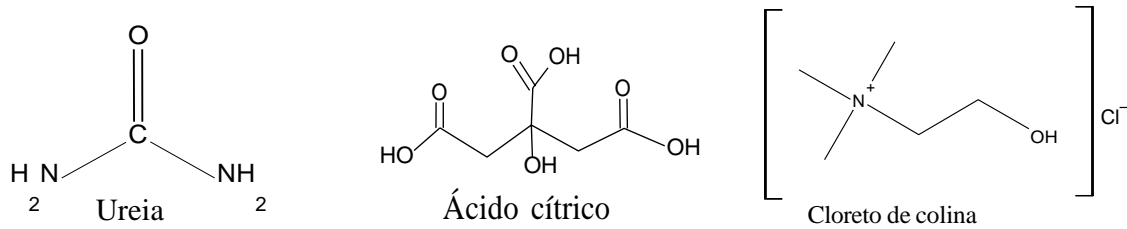


Figura 3: Estruturas químicas das substâncias utilizadas na composição dos DES analisados.

## 2.5 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando a metodologia descrita por Furlan e colaboradores [21], com algumas modificações. Foram preparadas soluções etanólicas dos extratos 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em microplaca de 96 poços foram adicionadas aos poços 100  $\mu\text{L}$  de etanol, 100  $\mu\text{L}$  dos extratos e feita diluição em série das amostras com concentração inicial de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e final de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Logo após, foram adicionadas 100  $\mu\text{L}$  da solução etanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidril (DPPH) (60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após 20 min de incubação sob ausência da luz, foi realizada leituras em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) no comprimento de onda de 517 nm como substância padrão, foi utilizado o hidroxitoluenobutilado (BHT). A partir das absorvâncias obtidas, foram calculados o percentual da atividade antioxidante (equação 1):

$$AA\% = \frac{(Abs\ 2 - Abs\ 1)}{Abs\ 2} \times 100 \quad (1)$$

Onde AA% é a porcentagem da atividade antioxidante, Abs1 absorvância da amostra - branco e Abs2 absorvância equivalente ao controle negativo (etanol e DPPH). A concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) foi obtida através da equação da reta obtida no gráfico da AA% versus concentração da amostra, e o índice de atividade antioxidante (IAA) foi obtido da equação 2:



$$IAA = \frac{[DPPH]}{CE_{50}} \quad (2)$$

## 2.6 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi realizado por adaptações da metodologia descrita por Banov [18]. Resumidamente, 150 µL dos extratos (700 µg mL<sup>-1</sup>) e 150 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>; 0,025g mL<sup>-1</sup>) foram adicionados em microplaca de 96 poços e incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm. A quercetina foi utilizada como padrão na elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em µg de quercetina por mL dos extratos.

## 2.7 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos foi mensurado pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Mathew e Subramanian [22]. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 20 µL dos extratos 2000 µg mL<sup>-1</sup>, 200 µL de água destilada, 20 µL do *Folin-Ciocalteu* e 60 µL carbonato de sódio 8,5%. Em seguida a placa foi incubada por 1h à 45°C sucedida de leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 760 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão para elaboração da curva de calibração e os valores totais do conteúdo fenólico foram expressos µg Equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

## 2.8 Análise Cromatográficas

No preparo das amostras para injeção no CLAE-DAD, os extratos foram eluídos em cartucho C-18 Strata Phenomenex® previamente condicionado. As amostras foram eluídas em 10 mL de metanol, sendo o eluato coletado em tudo de ensaio de 15 mL. Todas as soluções foram filtradas por membranas GxF/PVDF 0,2 µm.

A identificação dos constituintes químicos dos extratos foi realizada por um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, Shimadzu). As condições de separação foram realizadas em sistema de gradiente utilizando dois solventes como fase móvel: solvente B (ácido acético 2%) e C (acetoneitrila) (Tab. 1). Foi utilizado uma coluna analítica de fase reversa Shim-Pak C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula), com taxa de fluxo constante de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, acompanhada com sistema de fotodiodos. Um volume de injeção de 20 µL foi ministrado e as injeções foram feitas em triplicata.

**Tabela 1.** Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.

<b>Tempo (min)</b>	<b>B%</b>	<b>C%</b>
<b>0,05-5</b>	85	15
<b>5,01-20</b>	70	30
<b>20,01-35</b>	50	50
<b>35,01-45</b>	60	40
<b>45,01-65</b>	15	85
<b>65,01-72</b>	0	100

B= ácido acético 2%; C= acetonitrila

Os picos dos cromatogramas foram identificados e comparados com o tempo de retenção dos padrões empregados ácido cafeico, ácido trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (todos da marca Sigma Aldrich), lidos no comprimento de onda de 254 nm.

Para validação do método foram utilizados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade - sensibilidade, precisão intra-corrída (repetibilidade), limites de detecção e quantificação de acordo com Ribani e colaboradores [23] e ANVISA [24].

## 2.9 Análises estatísticas

Os resultados apresentados neste estudo representam a média de três repetições ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão (DP) da média. Foram analisados estatisticamente diferentes resultados para as variáveis atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides totais, comparando os resultados do índice de confiança com o valor fixado do t-Student 3,18, com nível de confiança 95% utilizando o programa Microsoft Excel. As médias foram comparadas por análise de variância ANOVA e teste de Turkey ( $p<0,05$ ).

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização dos solventes eutéticos (DES)

A espectroscopia de infravermelho gerou dois espectros (Figura 4a,b), ambos apresentaram absorções em regiões características de grupos funcionais presentes nos precedentes utilizados na formação dos DESs. As principais diferenças apresentadas entre os espectros DES 1 e DES 2 podem ser visualizadas na intensidade de algumas bandas. Como as vibrações encontradas na região de 3371 a 3382  $\text{cm}^{-1}$ , que estão associadas a vibrações dos grupos funcionais -OH e -NH<sub>2</sub> presentes no cloreto de colina e ureia (DES 1) indicando

o acréscimo do número de onda e aumento do deslocamento da intensidade devido a formação das ligações de hidrogênio, caracterizando a criação do DES. Essas ligações provavelmente podem existir como, OH---NH, OH---OH, NH---OH, NH---NH [25].

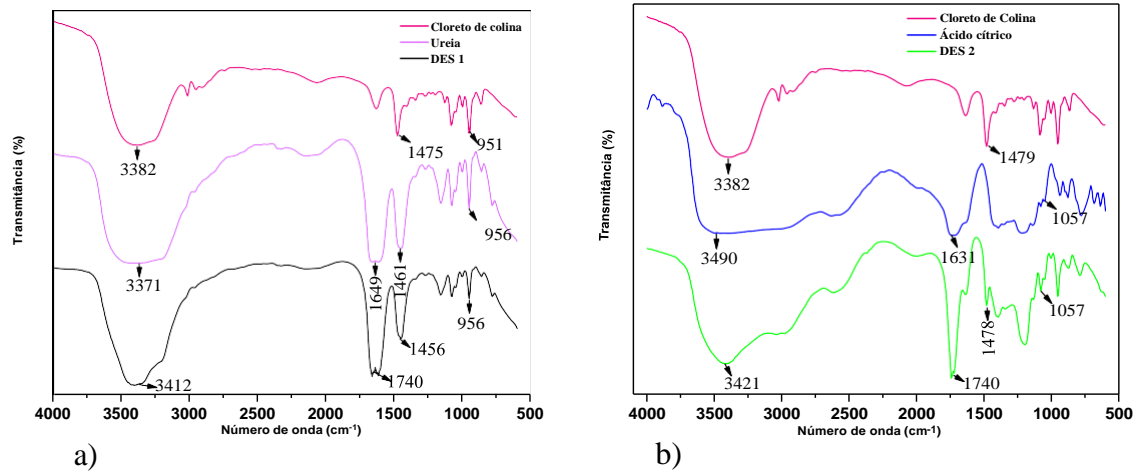


Figura 4: Espectros de absorção de infravermelho na formação do DES 1 (a) e DES 2 (b) e seus precedentes.

Em ambos os espectros foram visualizadas bandas específicas da função álcool, caracterizadas em atribuição do estiramento da ligação O-H em ligação de hidrogênio intermolecular, no entanto, o espectro DES 2 demonstrou bandas mais largas e intensas ( $3490\text{-}3382\text{cm}^{-1}$ ), devido ao aumento da concentração dessa função. Foi verificado diferenças na absorção correspondente ao dobramento do grupo carbonila (C=O) do DES 1 ( $1649\text{-}1475\text{cm}^{-1}$ ) e DES 2 ( $1631\text{-}1479\text{cm}^{-1}$ ), demonstrando a formação de ligações de hidrogênio entre os reagentes, ou seja, a estabilidade dos DES se dá pela caracterização das interações de hidrogênio responsáveis pela formação dos solventes. Esse aumento do comprimento de onda do dobramento carbonila caracteriza o crescimento da densidade de elétrons do oxigênio na carboxila, comprovando a geração de ligações de hidrogênio [26].

### 3.2 Atividade antioxidante

Como mostra a Tab. 2 o extrato MeOH ( $1,97 \pm 0,01$ ) e EtOH ( $1,07 \pm 0,01$ ) obtiveram maiores valores do índice de atividade antioxidante (IAA) quando comparado aos extratos DES 1 ( $0,44 \pm 0,01$ ) e DES 2 ( $0,88 \pm 0,01$ ). De acordo com Scherer e Godoy 2009 [27] o IAA está associado a influência da concentração da solução de DPPH com o valor da concentração efetiva média ( $CE_{50}$ ), e que o aumento do índice está relacionado a maior capacidade dos extratos em estabilizar o radical, ou seja, quanto menor o valor de  $CE_{50}$  por amostra, maior será o consumo de DPPH e conseqüentemente maior será sua atividade

antioxidante. Baseado nos valores de IAA descritos pelos autores, valores de IAA menor que 0,5 apresentam atividade antioxidante baixa, entre 0,5 e 1,0 apresentam atividade antioxidante moderada, entre 1,0 e 2,0 IAA considerada forte e acima de 2,0 atividade antioxidante muito forte [9].

**Tabela 2.** Capacidade antioxidante dos extratos de *M. albicans*.

Solvente	CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Faixas do CE <sub>50</sub>	IAA (µg mL <sup>-1</sup> ) ± DP	Faixas do IAA
<b>BHT</b>	17,53	Intensa atividade	3,42 ± 0,01	Intensa atividade
<b>MeOH</b>	30,33	Intensa atividade	1,97 ± 0,01	Intensa atividade
<b>EtOH</b>	55,65	Moderada atividade	1,07 ± 0,01	Forte atividade
<b>DES 2</b>	68,3	Moderada atividade	0,88 ± 0,01	Moderada atividade
<b>DES 1</b>	109,43	Baixa atividade	0,44 ± 0,01	Baixa atividade

BHT (hidroxitoluenobutilado); MeOH (metanol); EtOH (etanol); DES 2 (cloreto de colina + ácido cítrico + água); DES1 (cloreto de colina + ureia); CE<sub>50</sub> (concentração efetiva média); IAA (índice de atividade antioxidante); DP (desvio padrão). Todas as análises foram feitas em triplicata

Os DESs investigados apresentaram faixa de IAA de baixa atividade para DES 1 e moderada atividade DES 2. Embora poucos estudos tenham sido realizados com foco na utilização de solventes eutéticos na extração de compostos bioativos provenientes de materiais vegetais [28], algumas pesquisas descritas na literatura tem mostrado resultados promissores na aplicação de solventes eutéticos para extração de compostos fenólicos de plantas que em geral são antioxidantes ativos [29].

### 3.3 Teores de flavonoides e fenólicos totais

Na investigação da extração de flavonoides e fenólicos totais de *M. albicans* pelos DESs e solventes convencionais como metanol e etanol (Fig. 5) foi observado que houve maior extração de fenólicos. com o solvente metanol, com valor de 1023,1 µg EAG/g em comparação ao etanol (932,3 µg EAG/g), DES1 e DES 2. Enquanto, na extração de flavonoides, o solvente DES 1 apresentou melhor ação com o teor de 73 µg EQ/g. Apesar disso, o teor de fenólicos obtido no DES 2 (978,6 ug EAG/g) foi próximo ao teor obtido com o metanol (1023,1 µg EAG/g), evidenciando eficácia desse solvente como extrator.

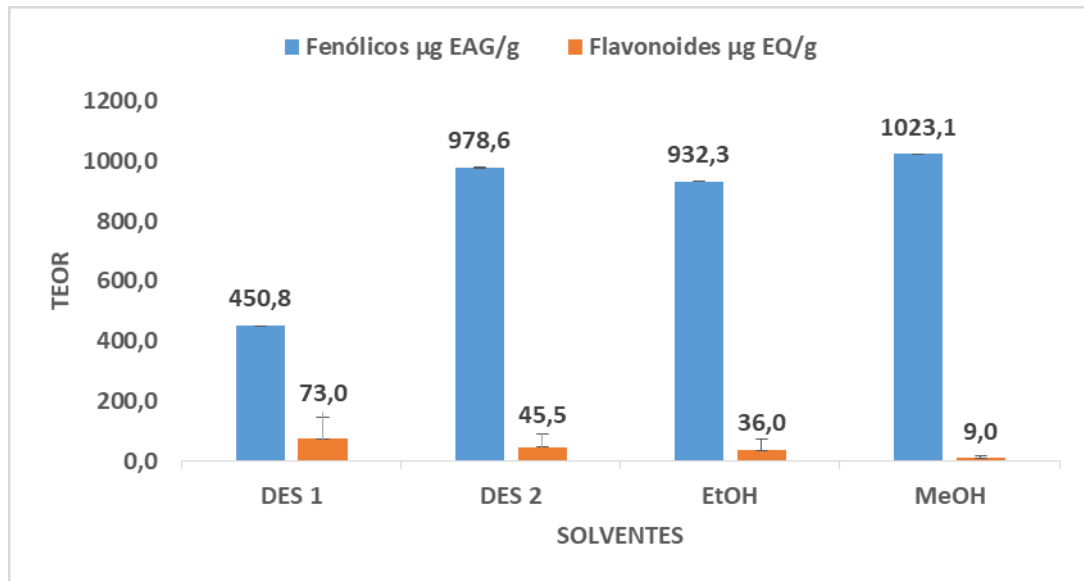


Figura 5: Teor de fenólicos e flavonoides totais da espécie *M. albicans* comercializada. DES 1 e DES 2; Etanol (EtOH); Metanol (MeOH)  $\pm$  desvio padrão.

Tais resultados podem estar associados com solventes que possuem elevada habilidade de formar ligações de hidrogênio com compostos fenólicos [30]. Neste caso, o metanol e o DES 2 obtiveram maior interação e formação de ligação de hidrogênio demonstrando melhores desempenho de extração para fenólicos, enquanto o DES 1 mostrou melhor atividade na extração de flavonoides. A remoção de constituintes químicos depende principalmente das propriedades dos solventes propostos, diante disso os DESs, podem realizar um papel importante na eficácia de extração em razão de suas propriedades físico-químicas como polaridade, viscosidade e solubilização dos compostos fenólicos [31].

Conforme pesquisas realizadas por Dheyab (2021) [12], os DESs possuem seletividade na extração de compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides e esta seletividade pode mudar de acordo com a composição dos DES formado. É evidente que, quando comparado ao solventes convencionais os resultados alcançados para os DESs demonstraram que estes são excelentes extratores por apresentarem habilidades de desempenharem uma imensidade de interações com analitos bioativos [10]. Portanto, estes resultados corroboram com os dados obtidos nesta pesquisa demonstrando a eficácia dos solventes eutéticos na extração de constituintes químicos de *M. albicans*, além de serem considerados ecoeficientes por apresentarem boa biocompatibilidade, são biodegradáveis, não inflamáveis sendo assim menos nocivo à saúde humana e ao meio ambiente.

### 3.4 Análise Cromatográfica

As condições cromatográficas desenvolvidas na identificação dos constituintes químicos de *M. albicans* foi iniciada a partir da seletividade dos padrões ácido cafeico, ácido

trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (Fig. 6).

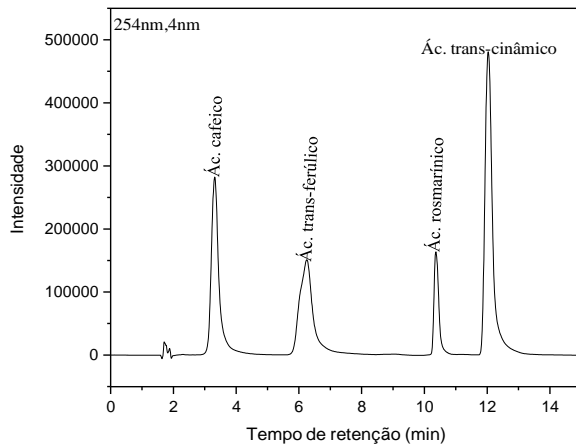


Figura 6: Seletividade dos padrões e seus respectivos tempo de retenção ( $tR$ ). Ácido cafeico ( $tR$  3,310 min), ácido trans-ferúlico ( $tR$  6,255 min), ácido rosmarínico ( $tR$  10,386 min) e ácido trans cinâmico ( $tR$  12,041 min)

Os parâmetros relacionados à eficiência da separação foram avaliados. Com os dados adquiridos por área através da medida da linearidade foram calculados os limites de detecção e quantificação para cada ácido padrão (Tab. 3). Os valores obtidos para linearidade estão de acordo com o valor mínimo estipulado pela RE n° 899: 0,9900.

**Tabela 3.** Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear ( $R^2$ ), Tempo de retenção ( $tR$ ), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD.

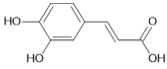
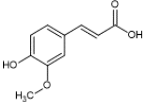
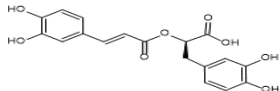
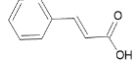
Analito	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>a</sup>	ER	$R^2$	$t_{Rmin}^b \pm DP$	DPR (%)	IC
Ác. cafeico	0,013	0,040	$y=4837,1x + 34727$	0,997	$3,18 \pm 0,25$	7,81	0,12
Ác. ferúlico	0,010	0,310	$y=4876,1x + 15144$	0,996	$6,29 \pm 0,36$	5,7	0,18
Ác. rosmarínico	0,020	0,620	$y=1890x + 836,03$	0,994	$10,42 \pm 0,13$	1,25	0,06
Ác. Trans-cinâmico	0,006	0,019	$y=6933,7 + 46857$	0,999	$12,13 \pm 0,08$	0,63	0,04

<sup>a</sup> Os valores são expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

<sup>b</sup> O tempo é expresso em minuto.

Nas análises dos extratos preparados pelos diferentes solventes eutéticos DES 1 e DES 2 e convencionais metanol e etanol foi possível visualizar que todos os solventes utilizados identificaram e quantificaram apenas o ácido rosmarínico (Tab. 4). No entanto, o solvente DES 1 demonstrou melhor extração para este ácido. Em contrapartida, os ácidos cafeico, trans-ferúlico e trans-cinâmico não foram identificados por nenhum dos solventes utilizados.

**Tabela 4.** Concentração de ácidos fenólicos no extrato de *M. albicans*

Extrato	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ de extrato)			
				
	Ác. cafeico	Ác. trans-ferúlico	Ác. rosmarínico	Ác. trans-cinâmico
DES 1	ND	ND	2,117 $\pm$ 1,05	ND
DES 2	ND	ND	0,916 $\pm$ 1,36	ND
Metanol	ND	ND	0,939 $\pm$ 1,09	ND
Etanol	ND	ND	1,632 $\pm$ 0,99	ND

ND (não detectável); Desvio padrão calculado com  $n=3$

Estudos realizados por Pieroni et al (2011) [32], Vasconcelos et al (2006) [33] e Serpeloni et al (2011) [5] revelaram atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênica para a espécie *M. albicans*. Tais propriedades farmacológicas relatadas podem estar relacionadas à presença dos constituintes químicos encontrados nos extratos como flavonol, rutina, quercetina, 3-(*E*)-*p*-cumaroil- $\alpha$ -amirina,  $\alpha$ -amyrin, ácido epibetulínico, ácido ursólico e ácido epiursólico. O teor de ácido rosmarínico detectado neste estudo demonstra significativa contribuição para suas atividades terapêuticas. Este ácido é conhecido por possuir potenciais efeitos biológicos, bem como exibir ação anti-inflamatória e antioxidante [34], além de contribuir para a redução de insulina e níveis de lipídios plasmáticos apresentando potencial mecanismo antidiabético [35].

Desse modo, a extração realizada com o DES 1 para o ácido rosmarínico, demonstrou maior eficiência, o que pode estar relacionando com a existência de inúmeras redes de ligações de hidrogênio que interagem intensamente com os compostos fenólicos possibilitando sua extração [36]. Portanto, o resultado dessa análise demonstra mais uma vez a aplicabilidade da utilização de solventes eutéticos para extração de bioativos de *M. albicans* comprovando a competência de tais solventes quando comparados aos solventes convencionais.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pela primeira vez foi investigado a extração de bioativos fenólicos, flavonoides e antioxidante da espécie *M. albicans* pelo uso de solventes eutéticos profundos. As atividades foram comparadas com as espécimes com os solventes convencionais como metanol e etanol. Todos os solventes utilizados extraíram o ácido rosmarínico, porém ao comparar a eficiência de extração dos solventes convencionais e eutéticos, observou-se que o solvente eutético DES 1 obteve melhor eficácia na extração do ácido rosmarínico. Os resultados obtidos neste estudo, classificam os solventes eutéticos DES 1 e DES 2 como eficazes na extração de bioativos de *M. albicans*.

O uso desses solventes para extração de bioativos tem se tornado uma opção mais segura e limpa por apresentarem propriedades especiais como baixa volatilidade, são biodegradáveis e fácil preparação, além de serem menos nocivos ao meio ambiente tornando-os ecoeficientes. Estudos posteriores devem ser realizados utilizando outros solventes eutéticos a fim de identificar e quantificar novos bioativos da espécie do ponto de vista químico e farmacológico. Portanto este estudo se constituiu na valorização da biodiversidade do bioma Mata Atlântica, assim como contribuiu com os princípios ecológicos na utilização de solventes que agridem menos o meio ambiente.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] Martins AB, Semir J, Goldenberg R, Martins E. O gênero *Miconia* (Melastomataceae). *Acta Bot Brasilica* 1996;10:267–316.
- [2] Lima TC, Matos SS, Carvalho TF, Silveira-Filho AJ, Couto LPSM, Quintans-Júnior LJ, et al. Evidence for the involvement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves (Melastomataceae). *J Ethnopharmacol* 2020;259.
- [3] Maria de AAT, Fonseca SA, Brandão M, Sueli MGT, de Fátima SEA, Smânia JA, et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*; 95:367–73.
- [4] Hamann B, Winter EM dos S, Silbert DA, Micke GA, Vitali L, Tenfen A, et al. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. *Rev Fitos* 2020;14:450–61.
- [5] Mara Serpeloni J, Mazzaron Barcelos GR, Prates Mori M, Yanagui K, Vilegas W, Aparecida Varanda E, et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Exp Toxicol Pathol* 2011;63:499–504Manzano



- MI, Centa A, Veiga A de A, da Costa NS, Bonatto SJR, de Souza LM, et al. Phytochemical Evaluation and Anti-Inflammatory Potential of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Extracts. *Molecules* 2022;27.
- [6] Iglesias, DT; Fonseca, RS. *Miconia albicans* (Sw.) Triana (canela-de-velho), the new trend plant from the Brazilian Cerrado: contribution to species identification and pharmacological aspects. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 14, p. 1-9, 2022.
- [7] Do TH, Truong HB, Nguyen HC. Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from *Ocimum Basilicum* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Pharm Chem J* 2020;54:162–9. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02181-3>.
- [8] Oliveira GLS. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. *Rev Bras Plantas Med* 2015;17:36–44.
- [9] Hashemi B, Shiri F, Švec F, Nováková L. Green solvents and approaches recently applied for extraction of natural bioactive compounds. *Trends Anal Chem* 2022;157.
- [10] Mansur AR, Song NE, Jang HW, Lim TG, Yoo M, Nam TG. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. *Food Chem* 2019;293:438–45.
- [11] Dheyab AS, Bakar MFA, Alomar M, Sabran SF, Hanafi AFM, Mohamad A. Deep eutectic solvents (DESs) as green extraction media of beneficial bioactive phytochemicals. *Separations* 2021;8.
- [12] Neto J da RL, Araucate AD de, Moura PA de, Filho CMB, Tenório JCG, Silva AG da, et al. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *J Med Plants Res* 2016;10:409–16.
- [13] Martín-García B, Pimentel-Moral S, Gómez-Caravaca AM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. Box-Behnken experimental design for a green extraction method of phenolic compounds from olive leaves. *Ind Crops Prod* 2020;154:112741.
- [14] Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 2002;50:3660–7.
- [15] Morais SM, B Cavalcanti ES, Maria Costa SO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev Bras Farmacogn Brazilian J Pharmacogn* 2009;19:315–20.

- [16] Duarte-Almeida JM, Santos RJ dos, Genovês MI, LAJOLO FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnol Aliment* 2006;26:446–52.
- [17] Banov D, Rolim Baby A, Martins L, Bosco D, Kaneko TM, Valéria M, et al. Caracterização do extrato seco de Ginkgo biloba L. em formulações de uso tópico. *Acta Farm Bonaer* 2006;25:219–24.
- [18] Bakirtzi C, Triantafyllidou K, Makris DP. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2016;3:120–7.
- [19] Soares LA, De E, Gil S, Rezende KR. Análises preliminares de substâncias viscosas em espectrômetro de infravermelho utilizando suporte alternativo Analytical alternative method applied to viscous substances by infrared spectrometry. *Rev Eletrônica Farmácia* 2006;3:63–7.
- [20] Martha S, Negri G, Berry PE, Ee BW Van, Salatino A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton ( Euphorbiaceae ) 2015;38:693–702.
- [21] Mathew M, Subramanian S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PLoS One* 2014;9.
- [22] Ribani M, Beatriz C, Bottoli G, Collins CH, Sales IC, Jardim F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. vol. 27. 2004.
- [23] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003., 2003.
- [24] Yue D, Jia Y, Yao Y, Sun J, Jing Y. Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. *Electrochim Acta* 2012;65:30–6.
- [25] Elderderi S, Leman-Loubière C, Wils L, Henry S, Bertrand D, Byrne HJ, et al. ATR-IR spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. *J Mol Liq* 2020;311.
- [26] Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index ( AAI ) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method 2009;112:654–8.
- [27] da Silva RF, Carneiro CN, Cheila CB, J. V. Gomez F, Espino M, Boiteux J, et al. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchem J* 2022;175.
- [28] Petkov H, Trusheva B, Krustanova S, Grozdanova T, Popova M, Alipieva K, et al.

- Green extraction of antioxidants from natural sources with natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus L'Academie Bulg Des Sci* 2022;75:1129–37.
- [29] Alsaud N, Shahbaz K, Farid M. Application of deep eutectic solvents in the extraction of polyphenolic antioxidants from New Zealand Manuka leaves (*Leptospermum Scoparium*): Optimization and antioxidant activity. *J Mol Liq* 2021;337.
- [30] Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011;126:1821–35.
- [31] Pieroni LG, De Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 2011;16:9439–50.
- [3] Vasconcelos MAL, Royo VA, Ferreira DS, Miller Crotti AE, Andrade E Silva ML, Carvalho JCT, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift Fur Naturforsch - Sect C J Biosci* 2006;61:477–82.
- [34] Adomako-Bonsu AG, Chan SL, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol Vitr* 2017;40:248–55.
- [35] Berhow MA, Affum AO, Gyan BA. Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims grown in Ghana. *J Med Food* 2012;15:611–20.
- [36] Zannou O, Koca I. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. *Lwt* 2022;158:113184.

## ARTIGO 1

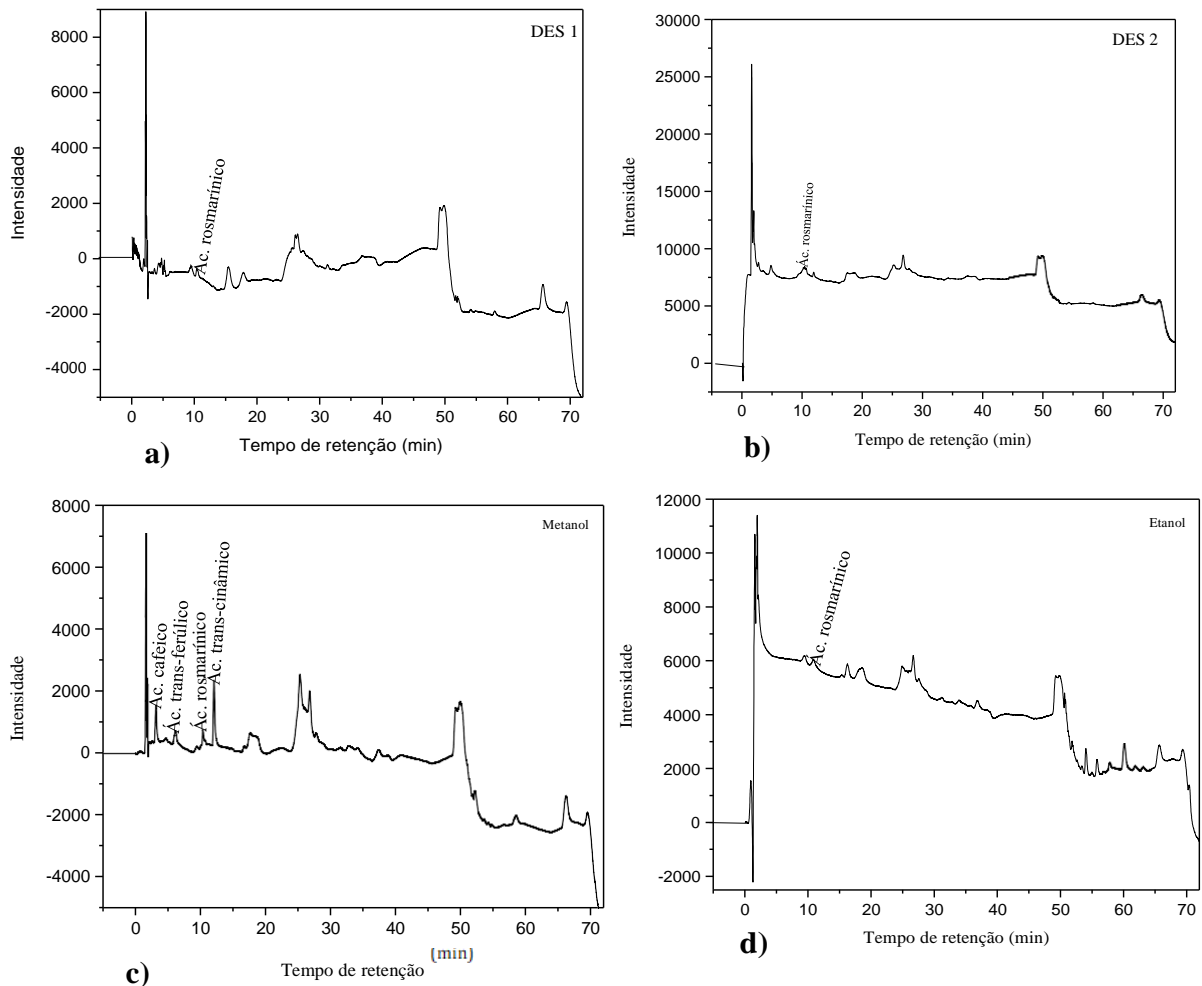
**Extração verde de componentes bioativos de *Miconia albicans*  
(Sw.) Triana usando solventes eutéticos profundos**

Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

## MATERIAL SUPLEMENTAR



**Fig. a)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente DES 1 em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tr 10,449min)

**Fig. b)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente DES 2 em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tr 10,449min)

**Fig. c)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação dos ácidos cafeico (tr 3,268min), trans-ferúlico (tr 6,200min), rosmarínico (tr 10,449min) e trans-cinâmico (tr 12,169min)

**Fig. d)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente etanol em CLAE-DAD com a identificação do rosmarínico (tr 10,892min)

## ARTIGO 2

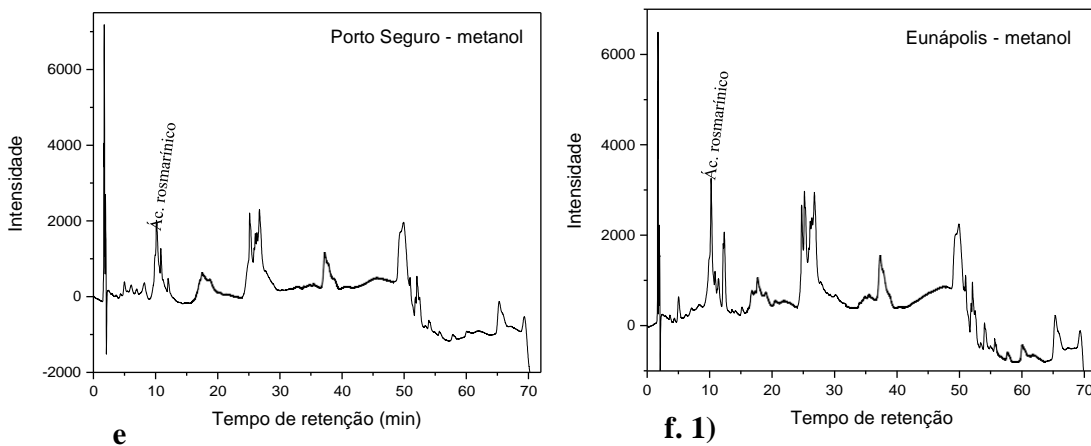
### Investigação de similaridades em extração verde dos fitoconstituintes de *Miconia albicans* de diferentes locais da Mata Atlântica do Sul da Bahia

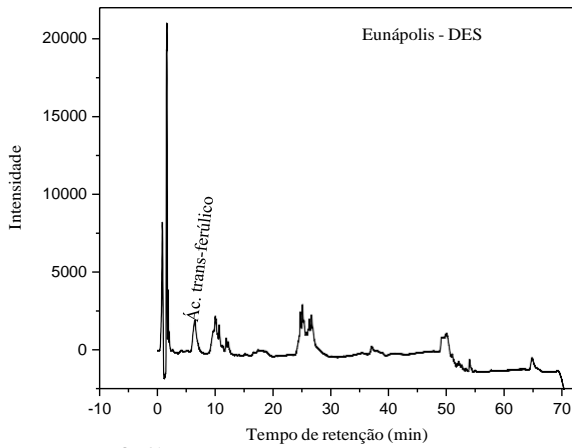
Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

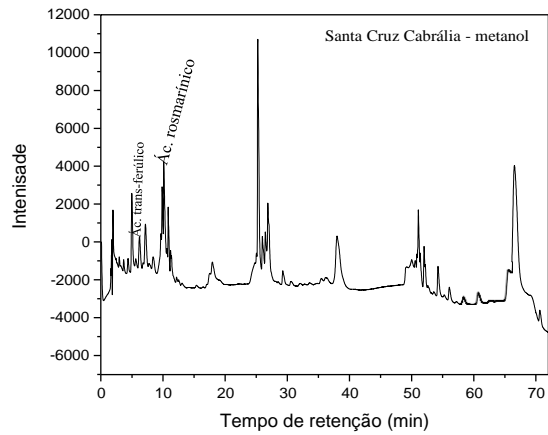
<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

## MATERIAL SUPLEMENTAR

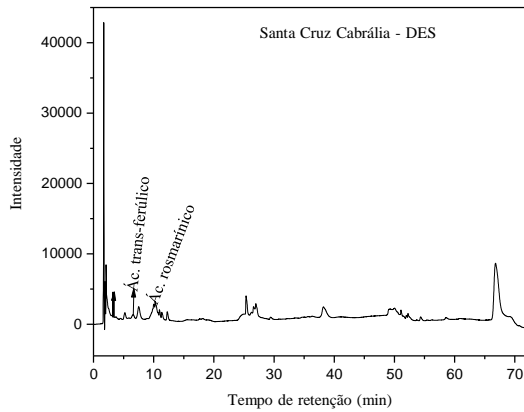




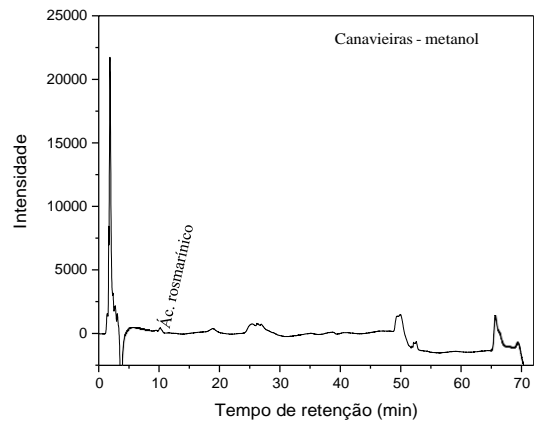
f. 2)



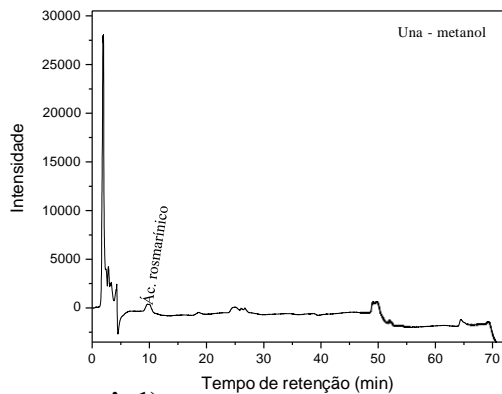
g. 1)



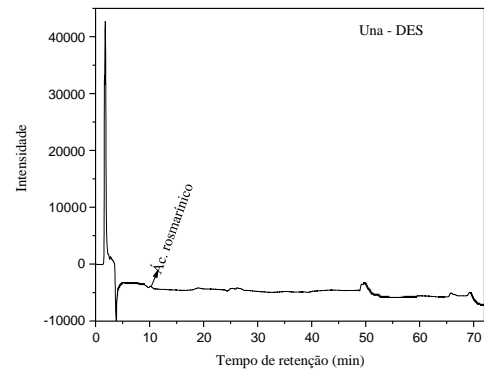
g. 2)



h)



i. 1)



i. 2)

**Fig. e)** Análise do extrato metanólico de *M. albicans* nativa do município de Porto Seguro em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,068min).

**Fig. f. 1,2.** Análise do extrato *M. albicans* nativa do município de Eunápolis utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,095min) e **f 2)** usando DES 2 com a identificação do ácido trans-ferúlico (tR 6,45min).

**Fig. g.1,2: g.1)** Análise do extrato *M. albicans* nativa do município de Santa Cruz Cabrália utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido trans-ferúlico (tR 6,169min) e ácido rosmarínico (tR 10,068min). **g. 2)** ácido cítrico com identificação de do ácido trans-ferúlico (tR 6,518min) e ácido rosmarínico (tR 10,170min).

**Fig. h).** Análise do extrato *M. albicans* nativa utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,095min)

**Fig. i.1,2: i,1)** Análise do extrato *M. albicans* nativa utilizando solvente metanol. **i,2)** ácido cítrico em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico ambos no (tR 10,068min).

Este artigo/capítulo está formatado segundo as normas da Revista Química Nova  
Disponível no site: <https://quimicanova.sbq.org.br/>

## ARTIGO 2

### **Investigação de similaridades em extração verde dos fitoconstituintes de *Miconia albicans* de diferentes locais da Mata Atlântica do Sul da Bahia**

Allana S. de Carvalho<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal da Bahia, 45810-000 Porto Seguro -BA, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, 45810-000 Porto Seguro -BA, Brasil

### **Investigation of similarities in green extraction of phytoconstituents of *Miconia albicans* from different locations of the Atlantic Forest of Southern Bahia**

#### ABSTRACT

The Atlantic Forest (MA) biome is considered one of the planet's richest sets of plant species because it has great biological diversity. Remnants of AM found in different regions of southern Bahia are becoming more and more the focus of study in the extraction of bioactive compounds from plant species because plants with great pharmacological potential can be found in these regions. Therefore, the base plant of this study, *Miconia albicans* (Sw.) Triana collected in different regions of the South of Bahia when compared to the commercial plant demonstrated through the technique of High-Performance Liquid Chromatography (CLAE\_DAD) relevant phenolic and total flavonoid contents, where the UAN region showed higher content in the extraction of rosmarinic acid (23.33  $\mu\text{g/mL}$ ) with methanol solvent. While in the chemometric analysis of hierarchical grouping (HCA), it was verified that the commercial *M. albicans* obtained more significant similarity with the plant collected in the region of Santa Cruz Cabrália for presenting concentrations of chemical constituents very close. Therefore, further studies on *M. albicans* should be conducted in order to explore its herbal potential

Keywords: plant species, chemometric analyses, herbal medicines



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que possui uma imensa flora de enorme variedade biológica, em espécies vegetais distribuídas em diversos biomas. <sup>1,2</sup> Nesse contexto, pode-se destacar a Mata Atlântica (MA) que corresponde com cerca de 23 % e 15% , respectivamente, da riqueza da diversidade de plantas do país (IBGE, 2004).<sup>3</sup> A região Sul do estado da Bahia, Brasil é uma das áreas que concentra grande parte de diversidade de planta do bioma e muitas dessas com potencialidade fitoterápica ainda não foram investigadas e correm o risco de se perder devido a devastação dessas áreas vegetais.<sup>4</sup>

A *Miconia albicans* (Sw.) Triana pertencente ao gênero *Miconia* e família Meslasmaceae é comumente encontrada na MA.<sup>5-7</sup> A espécie caracteriza-se por ser arbórea de até 3 metros de altura é, conhecida popularmente como “canela-de-velho”, “maria-branca”, “lacre-branco”, “folha-branca”. Na medicina popular é utilizada para fins medicinais na forma de chá, com o objetivo de tratamento de diversas patologias como dores e inflamações nas articulações, bursite, artrite, artrose, infecções geniturinárias, antiofídico, prevenção de infartos, regulação do ritmo cardíaco, problemas gástricos, vitiligo e alívio de sintomas febris. <sup>8,9</sup>. Contudo, por ser bastante comum nas áreas da MA e serem muito comercializadas, torna-se pertinente a investigação do perfil fitoquímico de *M. albicans* encontradas em diferentes regiões da MA do Sul da Bahia a fim de verificar se há similaridades dos constituintes químicos de plantas encontradas na região em relação as demais plantas da mesma espécie que já são comercializadas em locais especializados. Nesse cenário, MA é considerada importante foco de estudo por possuir extensa biodiversidade, nas quais muitas famílias que vivem entorno usufruem e tiram seu sustento através da abundância de seus recursos naturais.<sup>3</sup>

Na obtenção de constituintes químicos de plantas geralmente é feito o emprego de solventes orgânicos. Nesse sentido, são realizados processos extrativos pelo uso de metanol, hexano, clorofórmio e acetona que são altamente nocivos ao meio ambiente.<sup>10</sup> E o uso dos solventes eutéticos profundos (DES) tem se tornado uma opção mais limpa e segura por possuírem características significativas, tais como baixa volatilidade, não inflamáveis, baixa toxicidade além de fácil preparo.<sup>11</sup>

Este trabalho objetivou investigar a similaridade dos constituintes químicos obtidos via extração verde de *M. albicans* coletada em diferentes municípios do Sul do estado da Bahia. A comparação considerou os perfis químicos obtidos por Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (CLAE-DAD) e composição fenólica desse material e de material botânico comercializado.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Material vegetal

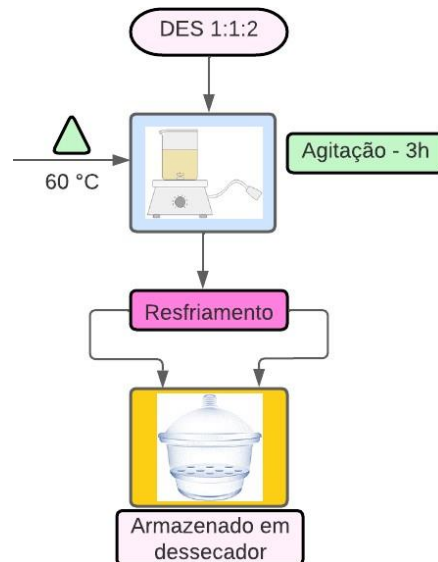
Foram adquiridas 200g de folhas secas de *M. albicans* embaladas em saco plástico com validade de 6 meses, em local de comercialização na cidade de Porto Seguro - Bahia, Brasil no mês de novembro de 2021. Enquanto que o material botânico nativo (folhas) de *M. albicans* foram coletadas em bordadura de floresta em áreas úmidas e todas estavam floridas, em diferentes fragmentos da Mata Atlântica localizados em cinco municípios do Sul do estado da Bahia, Brasil. Canavieiras – BA, Rodovia BA 001 (15°34'33.1S 38°59'31.3" W), Una (15°17'00.7"S 39°06'45.5"W), Porto Seguro – Bahia (16°48'34.6"S 39°08'46.7"W), Santa Cruz Cabrália (16°07'59.7"S 38°57'45.6"W) e Eunápolis (16°17'03.5"S 39°32'07.5"W). Posteriormente, foram identificadas a partir da comparação com exsicatas depositadas no Herbário Professor Geraldo C.P. Pinto (GCPP) da Universidade Federal do Sul da Bahia, no *Campus* Sosígenes Costa (Porto Seguro-Ba) sob o número (GCPP 1110). A Figura 1 ilustra o mapa geográfico dos locais de coleta da *M. albicans*.



**Figura 1.** Mapa de coleta da *Miconia albicans*

### 2.2 Preparo do solvente eutético

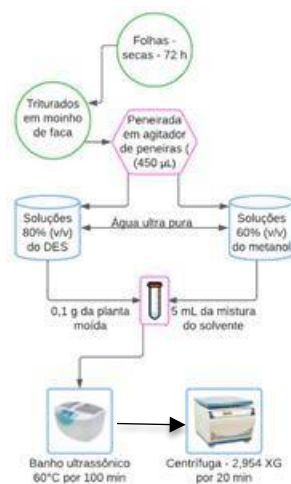
O DES foi preparado empregando uma mistura do cloreto de colina (Êxodo científica), ácido cítrico (Dinâmica) e água ultrapura 1:1:2 m/m. A mistura foi aquecida a 60°C durante 3h sob agitação constante com ajuda de um agitador magnético. Após resfriado à temperatura ambiente, o solvente foi guardado em dessecador (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Preparo do solvente eutético. Autoria própria.

### 2.3 Preparo dos extratos

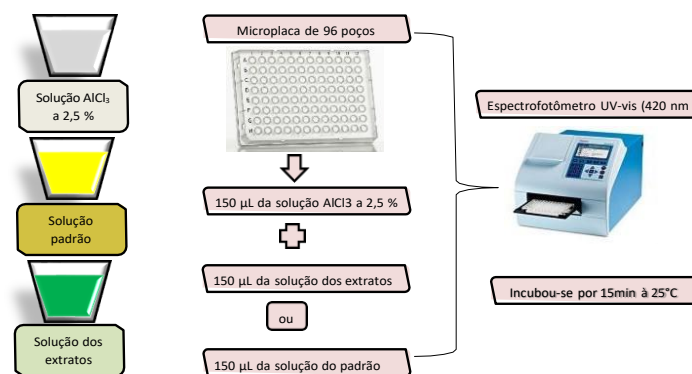
As folhas de *M. albicans* inicialmente foram secas em estufa por 72h a 40°C, em seguida triturada em moinho de facas, peneiradas em agitador de peneiras (Lucadema, modelo 04/01) a granulometria 0,450 mm. Para as extrações dos constituintes a metodologia foi adaptada de Christina Bakirtzi.<sup>12</sup> Foi preparado soluções do solvente em água ultrapura DES a 80% e metanol 60%, e foi adicionado 0,1 g das folhas moída e 5 mL de solvente. Sendo a mistura agitada manualmente e conduzida no banho ultrassônico (Cristófoli-modelo 11/2010 - 220V~0,17 kW – 0,8 A,  $f=50/60$  Hz e  $f_{ultrassônica}= 42$  kHz) a 60 °C por 100 min, logo após foram centrifugados a 2,954 XG por 20 min, como mostra o fluxograma abaixo. Em seguida os sobrenadantes foram guardados sob refrigeração para posteriores análises.



Fluxograma 1: Extração dos constituintes da *M. albicans* com o solvente eutético e convencional. Autoria própria.

## 2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi obtido por adaptações da metodologia descrita por Banov<sup>13</sup>, como representado na Fig. 2, utilizando como padrão a quercetina para elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por mL dos extratos. Foram preparadas soluções de  $\text{AlCl}_3$  a 2,5 %, solução padrão e solução dos extratos. Em seguida foram adicionados a uma placa de 96 poços 150  $\mu\text{L}$  das soluções, 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos e 150  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 2,5%, incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm.



**Figura 2:** Obtenção do conteúdo de flavonoides totais.

No procedimento, 150 $\mu\text{L}$  das soluções, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos e 150  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 2,5% (0,025g  $\text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados em microplaca de 96 poços e incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm. A quercetina foi utilizada como padrão na elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por mL dos extratos.

## 2.5 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos foi empregado o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Mathew e Subramanian<sup>14</sup>. Em resumo, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  dos extratos, 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, 20  $\mu\text{L}$  do *Folin-Ciocalteu* e 60  $\mu\text{L}$  carbonato de sódio a 8,5% à microplaca de 96 poços posteriormente a placa foi incubada por 1h a 45°C e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 760 nm. Utilizou-se o ácido gálico como padrão para elaboração da curva de calibração e os

valores totais do conteúdo fenólico foram expressos  $\mu\text{g}$  Equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

## 2.6 Preparo das amostras para análise em CLAE-DAD

Para a extração em fase sólida utilizou-se cartuchos C18 Strata Phenomenex® anteriormente condicionados, na eluição de 10 mL dos extratos MeOH, água, extrato (6:2:2 v/v/v) o eluato foi coletado em tubo de ensaio de 15 mL, filtrados por membranas GxF/PVDF 0,2  $\mu\text{m}$  e manipulados no injetor cromatográfico com a ajuda de microsseringa com capacidade para 200  $\mu\text{L}$ .

## 2.7 Identificação dos perfis químicos em CLAE-DAD

A identificação dos constituintes químicos dos extratos foi feita através do sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) Shimadzu). Para as condições de separação foi utilizado sistema de gradiente contendo dois solventes como fase móvel solvente B (ácido acético 2%) e C (acetonitrila), conforme Tabela 1 e a pressão foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  das amostras e as análises foram realizadas em triplicata (n=3).

Tabela 1. Gradiente empregado na análise CLAE-DAD

TEMPO (min)	B%	C%
0,05-5	85	15
5,01-20	70	30
20,01-35	50	50
35,01-45	60	40
45,01-65	15	85
65,01-72	0	100

B= ácido acético 2%; C= acetonitrila

O reconhecimento dos compostos fenólicos foi feito conforme sua ordem de eluição, comparando o seu tempo de retenção com os padrões empregados (ácido cafeico, ácido trans-felúrico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico), no comprimento de onda de 254 nm.

## 2.7 Análises estatísticas

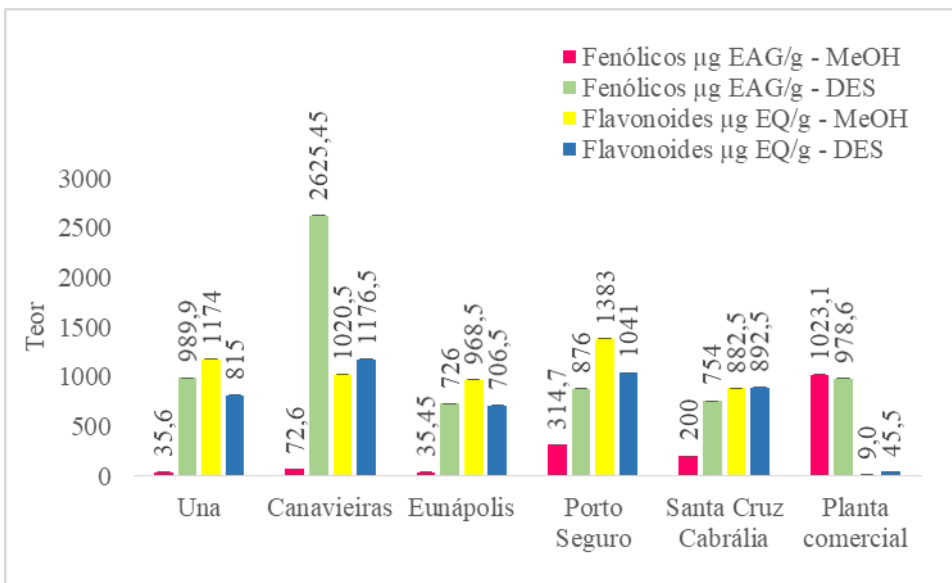
Os resultados apresentados neste estudo representam a média de três repetições (n=3)  $\pm$  desvio padrão (DP) da média. Foram analisados estatisticamente diferentes resultados para

as variáveis atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides totais, comparando os resultados do índice de confiança com o valor fixado do t-Student (2,14), com nível de confiança 95% utilizando o programa Microsoft Excel. As médias foram comparadas por análise de variância ANOVA e teste de Turkey ( $p < 0,05$ ). A partir dos dados obtidos no HPLC, foram realizados a plotagem dos gráficos, com o auxílio do software Origin 2022. Os espectros foram submetidos à análise multivariada para verificar a similaridades nas diferentes amostras, aplicando o PCA e HCA, com o auxílio do software Statistica 2022.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teores de fenólicos e flavonoides totais

O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nos extratos de *M. albicans* são expressos na Fig. 3. Os conteúdos apresentaram variação entre os espécimes coletados em diferentes localidades em comparação com o material botânico comercializado usando diferentes extratores, mostrando diversidade na composição química dos constituintes de *M. albicans*.



**Figura 3:** Teores de fenólicos e flavonoides totais de diferentes regiões do Sul da Bahia e planta comercial. Metanol (MeOH) e (DES – cloreto de colina/ácido cítrico/água).

Neste estudo, foi possível visualizar que todos os fragmentos da MA investigados nos diferentes municípios do Sul do estado da Bahia, obtiveram conteúdo de compostos fenólicos de *M. Albicans* usando diferentes extratores. Pieroni et al (2011),<sup>15</sup> observaram um valor de compostos fenólicos superior ao encontrado neste trabalho correspondendo a  $70,04 \pm 0,12$  mg GA/g ( $70040 \mu\text{g EAG/g}$ ) de extrato seco, presentes no extrato metanólico de *M. albicans*, o que poderia ter influenciado nessas variações observadas seria as condições

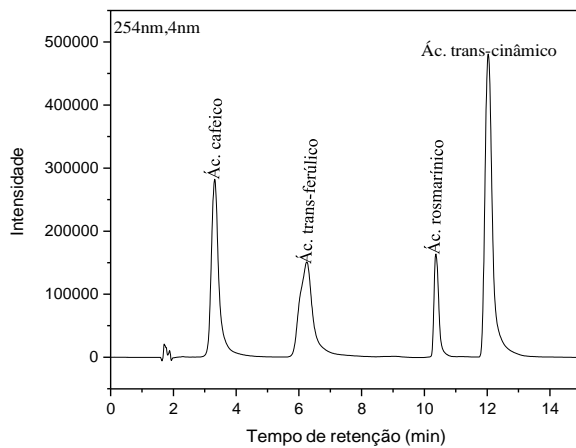
climatológicas, origem geográfica, época de coleta das folhas e dissimilaridades nas características do solo.<sup>16</sup>

Desse modo, o emprego de solventes DES em substituição aos solventes convencionais como uma opção mais limpa e segura na extração de constituintes químicos de *M. albicans* mostrou ser promissor na extração de fenólicos e flavonoides tanto na extração com a planta nativa de diferentes regiões que variaram de 726-2625,45 µg EAG/g (fenólicos) e 706,5-1176,5 µg EQ/g (flavonoides) quanto para a planta comercializada 978,6 µg EAG/g (fenólicos) e 45,5 µg EQ/g (flavonoides). Ao comparar as extrações, observa-se que a planta nativa obteve maiores conteúdos de fenólicos e flavonoides, essas variações podem estar associadas ao fato da planta comercial sofrer diversos processos que vai desde a sazonalidade da colheita do material vegetal, coleta e secagem da planta.

Estudos realizados por Alsaud 2021, demonstraram que a extração de constituintes químicos de espécies vegetais utilizando DES podem estar relacionada com as características dos DES proposto tal como, a natureza dos seus constituintes. E que as propriedades físico-químicas como polaridade, viscosidade e solubilização dos compostos fenólicos exibem um papel importante na eficácia de extração de componentes bioativos de plantas.<sup>18</sup>

### 3.2 Análise por CLAE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas a partir da seletividade dos padrões ácido cafeico, ácido trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (Fig. 4).



**Figura 4:** Cromatograma dos padrões ácido cafeico ( $t_R$  3,310 min), ácido trans-ferúlico ( $t_R$  6,255 min), ácido rosmarínico ( $t_R$  10,386 min) e ácido trans cinâmico ( $t_R$  12,041 min)

Para avaliação da linearidade foi usado o coeficiente de determinação  $R^2$  adquirido a partir da curva de calibração produzida com 5 níveis de concentrações, variando (15,56-260,0 µg mL<sup>-1</sup>). Através dos dados obtidos pela curva de calibração foi possível calcular os

limites de detecção e quantificação para cada ácido Tab. 2. Os valores alcançados para linearidade estão de acordo com o valor mínimo estipulado pela RE n° 899: 0,9900.<sup>19</sup>

**Tabela 2.** Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R<sup>2</sup>), Tempo de retenção (t<sub>R</sub>), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD.

Analito	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>a</sup>	ER	R <sup>2</sup>	t <sub>R</sub> min <sup>b</sup> ±DP	DPR (%)	IC
Ác. cafeico	0,013	0,040	y=4837,1x + 34727	0,997	3,18±0,25	7,81	0,12
Ác. ferúlico	0,010	0,310	y=4876,1x + 15144	0,996	6,29±0,36	5,7	0,18
Ác. rosmarínico	0,020	0,620	y=1890x + 836,03	0,994	10,42±0,13	1,25	0,06
Ác. Trans-cinâmico	0,006	0,019	y=6933,7 + 46857	0,999	12,13±0,08	0,63	0,04

<sup>a</sup> Os valores são expressos em µg mL<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> O tempo é expresso em minuto.

A tabela 3 corresponde a concentração de ácidos fenólicos encontrados em *M. albicans* nas diferentes regiões do Sul da Bahia e planta comercial

**Tabela 3.** Concentração de ácidos fenólicos em *M. albicans* dos diferentes municípios localizados no Sul da Bahia e material botânico comercial.

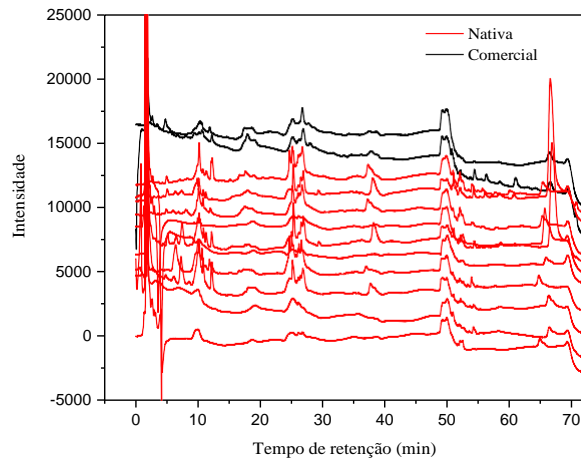
Concentração (µg/mL de extrato)					
Região	Extrato	Ác. Cafeico	Ác. trans-ferúlico	Ác. Rosmarínico	Ác. trans-cinâmico
Porto Seguro	1	ND	ND	2,54±0,56	ND
	2	ND	ND	ND	ND
Eunápolis	1	ND	ND	2,15±1,20	ND
	2	ND	4,69±8,13	ND	ND
Santa Cruz	1	ND	1,31±1,34	3,35±4,14	ND
Cabrália	2	ND	ND	ND	ND
Canavieiras	1	ND	ND	2,83±0,34	ND
	2	ND	ND	<LQ	ND
Una	1	ND	ND	23,33±2,59	ND
	2	ND	ND	3,05±0,43	ND
Planta comercial	1	ND	ND	0,93±1,09	ND
	2	ND	ND	0,91±1,36	ND

ND (não detectável); Desvio padrão calculado com n=3; <LQ (detectável, mas não quantificável); metanol – MeOH (1) e eutético DES (2).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que todos os municípios investigados inclusive material botânico comercial demonstraram presença do ácido rosmarínico utilizando extratores diferentes, enquanto o município de Santa Cruz Cabrália apresentou também a presença do ácido trans-ferúlico. Em contrapartida os ácidos cafeico e trans-cinâmico não foram detectados em nenhum dos locais investigados, nem no material botânico comercializado. Contudo, constatou-se que os perfis cromatográficos dos extratos



do material botânico nativo encontrados são semelhantes aos extratos comercialmente adquiridos, indicando se tratar da mesma planta, como mostra a Fig. 5.

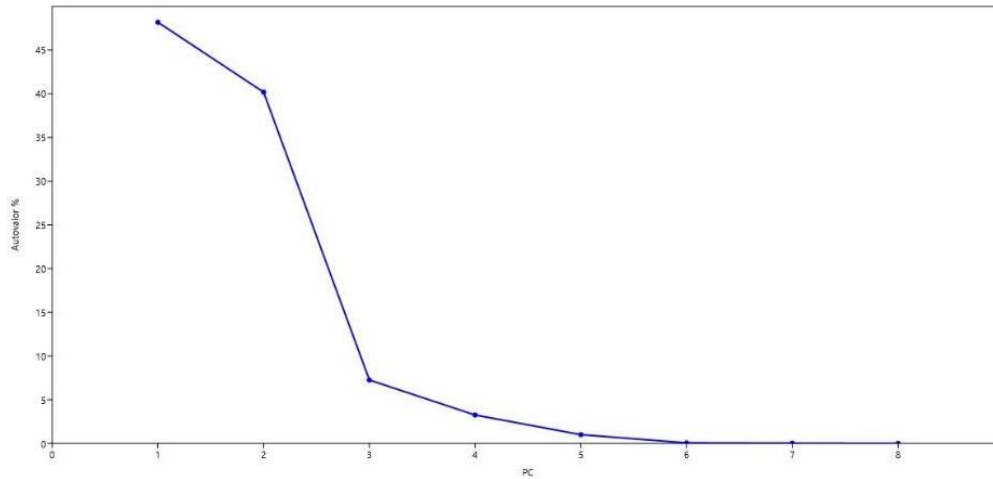


**Figura 5.** Semelhanças entre os perfis cromatográficos do material botânico comercializado e nativo.

As variações observadas nas concentrações dos ácidos fenólicos podem estar relacionado a diversos fatores, como relação da planta com o meio externo, clima, colheita da planta entre outros.<sup>16</sup> Outro aspecto importante é que a presença desses ácidos fenólicos em plantas estão associados a atividades antioxidante, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória.<sup>20</sup> Estudo realizado por Tomé et al (2019),<sup>8</sup> demonstraram atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de *M. albicans* contra *L. innocua*, da fração acetato de etila contra *B. cereus*, cepas de *L. innocua*, *L. monocytogenes* e fração hexano frente *L. Monocytogenes*. Neste estudo, foi demonstrado semelhanças na extração do ácido rosmarínico tanto para as plantas coletadas em diferentes regiões quanto para a planta comercial, estudos descritos na literatura mostram uma imensidade de atividades biológicas para este ácido como anti-inflamatórias, antimutagênica, antibacteriana, antiviral e antioxidante, substâncias essas responsáveis pelo efeito protetor de diversas patologias.<sup>20</sup> Portanto os resultados apresentados corroboram que a *M. albicans* é uma espécie promissora na investigação de compostos biologicamente ativos.

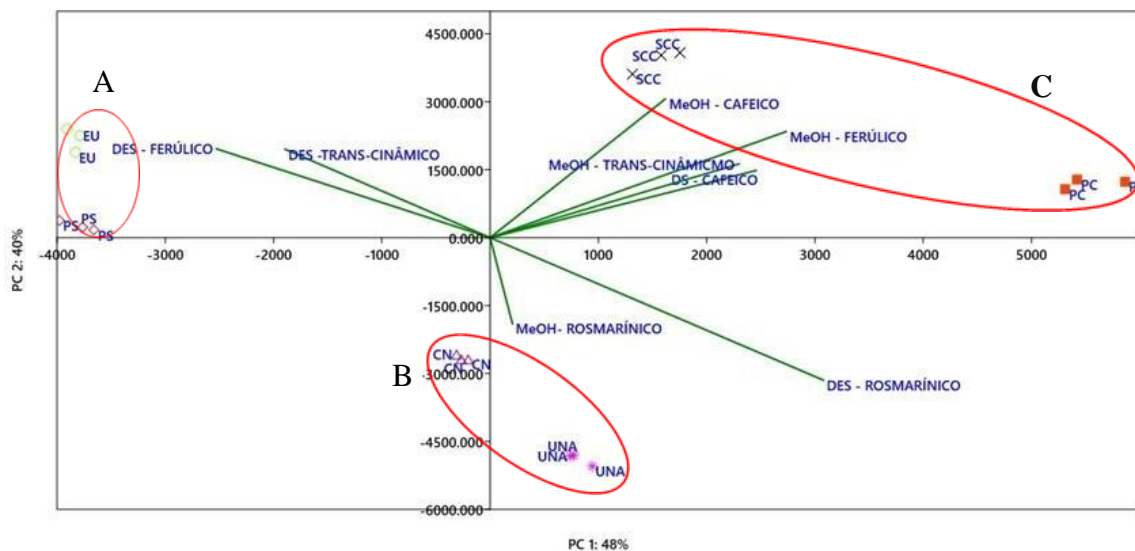
Objetivando a comparação dos perfis químicos dos extratos preparados por diferentes extratores foi utilizado técnicas de análise multivariáveis para agrupar dados a partir da extração dos constituintes ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico de *M. albicans* comercializada e coletadas em diferentes regiões do Sul da Bahia. Dessa forma, os dados cromatográficos foram utilizados como ferramentas para as análises quimiométricas como PCA e HCA para diferenciar os compostos bioativos investigados, mesmo estes não sendo quantificados.<sup>21</sup>

Com base nisso, um gráfico de cotovelo (*screen plot*) (Fig. 6) foi plotado indicando dois componentes principais (PCs) PC1 e PC2, onde o PC1 e PC2 descreve 88% das variâncias obtidas.



**Figura 6** - Gráfico de cotovelo, obtido através dos dados gerados por HPLC.

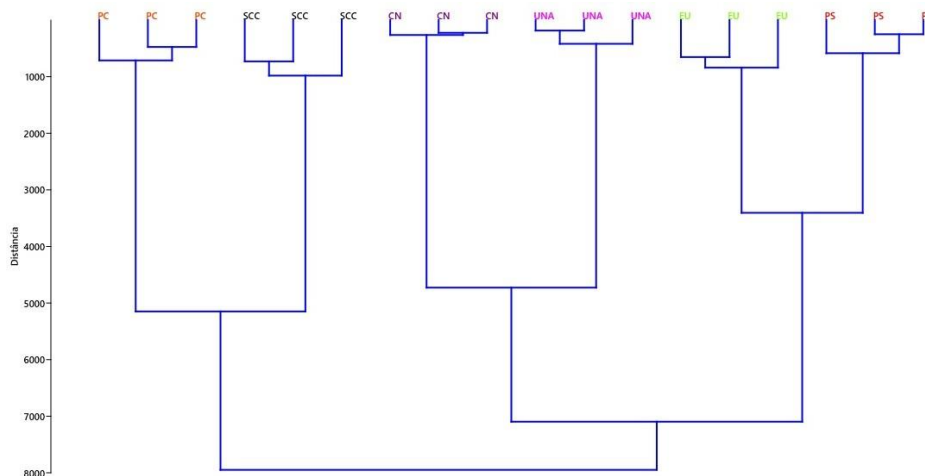
A partir dos valores encontrados de PC1 e PC2 (PC1 48% e PC2 40%) foi obtido gráfico de *score* (Fig. 7), que evidencia o agrupamento das amostras com a formação de três grupos (A, B e C) por grau de similaridade de acordo com suas composições químicas, acentuando também as diferenciações entre elas. No Grupo A composto por: Porto Seguro e Eunápolis, Grupo B composto por Una e Canavieiras, e o Grupo C composto por planta comercial e Santa Cruz Cabrália.



**Figura 7.** Gráfico de scores (PC1 x PC2). DES – solvente eutético, MeOH – metanol, CN – Canavieiras, EU – Eunápolis, PS – Porto Seguro, SCC - Santa Cruz Cabrália, UNA – Una e PC – Planta comercial.

E entre as oito variáveis utilizadas (DES – ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico) e MeOH (ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico) responsáveis pelo agrupamento das amostras foi verificado que os compostos químicos responsáveis por discriminar o grupo A foram os ácidos trans-ferúlico e trans-cinâmico extraído em maior proporção pelo DES, enquanto que no grupo B o ácido com maior teor de extração foi o rosmarínico pelos solventes metanol e DES, já o grupo C obteve maior diferenciação dos compostos bioativos investigados, ácidos cafeico, trans-ferúlico pelo solvente metanol e trans-cinâmico pelo solvente DES.

Ademais, as análises pela utilização das áreas geradas por CLAE apontam que a planta comercial se assemelha à planta coletada em Santa Cruz Cabrália, ambas possuindo os mesmos compostos bioativos extraídos diferenciando apenas na concentração. Por fim, com a análise de agrupamento hierárquico (HCA) (Fig. 8) foi possível confirmar quais das amostras tiveram maior grau de similaridade com a amostra comercial, que foi SSC, complementando a informação mostrada no gráfico de *scores*. Assim, o dendrograma de análise de agrupamento hierárquico aponta a formação de dois grupos principais (PC e SCC) e um subgrupo dividido entre (CN e UNA; EU e PS).



**Figura 8** - Análises de agrupamento hierárquico. PC – Planta comercial, SCC – Santa Cruz Cabrália, CN – Canavieiras, UNA – Una, EU – Eunápolis e PS – Porto Seguro

Toda via, verifica-se que não existem distâncias discrepantes entre os grupos formados, nota-se que CN e UNA se parece um pouco mais com EU e PS, que por sua vez se assemelha à planta comercial. Contudo, as diferenças encontradas nas análises podem estar diretamente associadas ao local de extração das plantas investigadas, pois, variáveis como estação do ano, ambiente, nutrientes presentes no solo e concentração de metabólitos secundários presentes na planta são responsáveis por diferenciar plantas de mesma espécie.<sup>16</sup>

### 3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que os constituintes químicos presentes em *M. albicans* coletadas em fragmentos da Mata Atlântica localizados em diferentes municípios do sul da Bahia em comparação com o material botânico comercializado, demonstraram que as concentrações dos constituintes variaram entre os diferentes municípios a depender dos solventes utilizados na extração. Contudo, utilizando as análises multivariáveis PCA e HCA foi possível concluir que o município de Santa Cruz Cabrália apresentou maior similaridade dos constituintes químicos com o material botânico comercial. Devido a isso, as diferenças encontradas nas concentrações de *M. albicans* em diferentes municípios do Sul da Bahia pode estar associada a diferentes variáveis de cultivo da planta, como clima, tipo de solo, relação da planta com o meio externo entre outros. Diante disso, por apresentar uma vasta diversidade biológica, a Mata Atlântica consiste em uma área de enorme relevância para a bioprospecção de constituintes químicos de espécies vegetais onde podem ser descobertas plantas com imensa potencialidade farmacológica.

### 4. REFERÊNCIAS

1. Sousa, M. de; Silva, C. M. R.; Vieira-Jr, G. H. M.; Ayres, M. C. C.; Charlyton, L. da C. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. D. C.; Barros, E. S. D.; Araújo, P. M. B. de; Chaves, B. M. H. M. S.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
2. Araújo, S. G.; Perspectivas e desafios para o desenvolvimento de fitoterápicos com plantas medicinais da Mata Atlântica para uso veterinário, Fundação Oswaldo Cruz, 2013
3. SOS Mata Atlântica; Disponível em <<https://www.sosma.org.br/>>. Acessado 28 abril **2023**
4. Iglesias, D. T.; Fonseca, R. S.; **2022**, 1.
5. Rodrigues, K. F.; Bitencourt, T. C.; Núñez, J. G.; Garcia, H. O.; Buhl, B.; Padilha, G. L.; Ethur, E. M.; Hoehne, L.; Bruno, A. N.; Freitas, E. M.; *Brazilian J. Biol.* **2022**, *84*, 1. [<https://doi.org/10.1590/1519-6984.255529>] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35239788>
6. Souza, L. S.; Lima, L. da S.; Hackenhaar, D. S. M.; Estudo de espécies vegetais bioativas da Mata Atlântica do sul da Bahia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, 2020

7. Lima, T. C.; Matos, S. S.; Carvalho, T. F.; Silveira-Filho, A. J.; Couto, L. P. S. M.; Quintans-Júnior, L. J.; Quintans, J. S. S.; Silva, A. M. O.; Heimfarth, L.; Passos, F. R. S.; Gandhi, S. R.; Lima, B. S.; Silva, F. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *259*, [https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32387231
8. Tomé, L. U.; Ferreira, H. D.; Alves, V. F.; Oliveira, L. G. de; Borges, L. L.; Sá, S. de; Paula, J. R. de; Fiuza, T. de S.; *Front. J. Soc. Technol. Environ. Sci.* **2019**, *8*, 372.  
[https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i2.p372-391]
9. Corrêa, J. G. de S.; Bianchin, M.; Lopes, A. P.; Silva, E.; Ames, F. Q.; Pomini, A. M.; Carpes, S. T.; de Carvalho Rinaldi, J.; Cabral Melo, R.; Kioshima, E. S.; Bersani-Amado, C. A.; Pilau, E. J.; de Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Visentainer, J. V.; Santin, S. M. d. O.; *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *273*, [https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113979]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33647428
10. Dheyab, A. S.; Bakar, M. F. A.; Alomar, M.; Sabran, S. F.; Hanafi, A. F. M.; Mohamad, A.; *Separations* **2021**, *8*, [https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS8100176]
11. Li, N.; Wang, Y.; Xu, K.; Huang, Y.; Wen, Q.; Ding, X.; *Talanta* **2016**, *152*, 23.  
[https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.042]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26992491
12. Bakirtzi, C.; Triantafyllidou, K.; Makris, D. P.; *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2016**, *3*, 120. [https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003]
13. Banov, D.; Rolim Baby, A.; Martins, L.; Bosco, D.; Kaneko, T. M.; Valéria, M.; Velasco, R.; *Acta Farm. Bonaer.* **2006**, *25*, 219.
14. 1. Mathew, M.; Subramanian, S.; *PLoS One* **2014**, *9*, [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086804]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466247
15. Pieroni, L. G.; De Rezende, F. M.; Ximenes, V. F.; Dokkedal, A. L.; *Molecules* **2011**, *16*, 9439. [https://doi.org/10.3390/molecules16119439]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075573
16. Berhow, M. A.; Affum, A. O.; Gyan, B. A.; *J. Med. Food* **2012**, *15*, 611.  
[https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0278] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22663161
17. Hamann, B.; Winter, E. M. dos S.; Silbert, D. A.; Micke, G. A.; Vitali, L.; Tenfen, A.;

Zimmermann, L. A.; *Rev. Fitos* **2020**, *14*, 450. [<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2020.1055>]

18. Alsaud, N.; Shahbaz, K.; Farid, M.; *J. Mol. Liq.* **2021**, *337*, [<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116385>]

19. ANVISA; (2003)

20. Petersen, M.; Simmonds, M. S. J.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121. [[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)]  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482446>

21. Barbosa, N.; Santos, L.; Seguchi, L.; Silva, B.; Carvalho, T.; Wanderley, E.; Gimenes, R.; Soares, M.; Araujo, A.; Silva, F.; Almeida, M.; Silva, M.; *Quim. Nova* **2022**, *45*, 994. [<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170914>]

## CONCLUSÃO GERAL

No primeiro artigo, pode-se perceber que a espécie *M. albicans* apresentou variados teores de fenólicos e flavonoides totais pela extração de solventes eutéticos (DES) e convencionais. A substituição de solventes convencionais por DES vem se tornando uma opção mais limpa e segura, pois estes apresentam propriedades específicas como boa biocompatibilidade, não são reativos além de serem biodegradáveis. Na atividade antioxidante, a *M. albicans*, exibiu variações nos valores de índice de atividade antioxidante (IAA) como intensa e forte atividade para a extração com solventes convencionais e moderada e baixa atividade com DES. Além disso, foi possível identificar através da análise em CLAE-DAD, os ácidos cafeico, ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico com os extratores metanol e DES, porém foi possível quantificar somente o ácido rosmarínico. Entretanto, novos estudos devem ser realizados utilizando outros ácidos fenólicos a fim de quantificar e identificar componentes na planta *M. albicans*.

No segundo artigo, foi possível perceber que todos os fragmentos da Mata Atlântica investigados em diferentes municípios do Sul da Bahia exibiram conteúdo de fenólicos e flavonoides totais de *M. albicans*, porém o município de Canavieiras mostrou maior concentração (2625,45 µg EAG/g) de fenólicos extraídos com solvente DES, enquanto o município de Porto Seguro mostrou maior extração no teor de flavonoides (1383 µg EQ/g) com extrator metanol. No entanto, foi possível concluir também através das técnicas quimiométricas PCA e HCA que o material botânico comercializado neste estudo obteve

maior grau de similaridade de constituintes químicos com a planta coletada no município de Santa Cruz Cabrália. Portanto são notórias a importância e a necessidade da descoberta de novos compostos fenólicos oriundos de espécies vegetais que possam contribuir de forma significativa para o bem-estar da saúde humana no combate a diversas patologias como câncer e doenças neurodegenerativas.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DO IFBA, COM OS  
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

C33lu Carvalho. Allana Souza de.

Uso de solventes eutéticos profundos na extração de constituintes Químicos de *Miconia albicans* (Sw.) Triana/ Allana Souza de Carvalho; Orientador Luciano da Silva Lima; Coorientador, Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira -- Porto Seguro: IFBA, 2023.

55 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Ambientais) -- Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal da Bahia, 2023.

1. Antioxidante. 2. Ácidos Fenólicos. 3. Mata Atlântica - Bahia. I. Lima, Luciano da Silva, orient. II. Bandeira, Marcus Luciano Souza de Ferreira, Coorientador. III. TÍTULO.

CDU:574.2





UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL DA BAHIA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E  
TECNOLOGIAS AMBIENTAIS

Allana Souza de Carvalho

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)  
TRIANA**

PORTO SEGURO 2023

ALLANA SOUZA DE CARVALHO

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)**

**TRIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre(a) em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador(a): Prof(a). Dr.(a). Luciano da Silva Lima

Coorientador(a): Prof (a). Dr (a). Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira

PORTO SEGURO 2023

*(solicitá-la à biblioteca da UFSB ou do IFBA, após a defesa da dissertação)*



ALLANA SOUZA DE CARVALHO

**USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NA EXTRAÇÃO  
DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Miconia albicans* (SW.)**

**TRIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre(a) em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador(a): Prof (a). Dr. (a). Luciano da Silva Lima

Coorientador(a): Prof (a). Dr. (a). Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira

Este trabalho foi submetido à avaliação e julgado aprovado em: 31/ 05/ 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr(a). Florisvalda da Silva Santos  
Universidade Federal do Sul da Bahia



---

Dr(a). Bruno Oliveira Moreira  
Universidade Federal da Bahia

---

Dr(a). Allison Gonçalves Silva  
Instituto Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente



ALLISON GONCALVES SILVA

Data: 29/06/2023 10:55:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**ORIENTADOR(A)**



Documento assinado digitalmente

LUCIANO DA SILVA LIMA

Data: 04/07/2023 09:25:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr(a). Luciano da Silva Lima  
Instituto Federal da Bahia

PORTO SEGURO  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por sempre me dar forças e sabedoria para vencer cada batalha. Ao meu esposo Raimundo Damião dos Santos Corrêa por sempre me apoiar e me ajudar nas horas mais difíceis. Aos meus filhos Bianca Carvalho Corrêa e Lorenzo Carvalho Corrêa é por vocês que mamãe luta cada dia. Aos meus pais Manoel Nascimento de Carvalho e Ivone Monteiro de Souza por sempre estarem presentes e sempre acreditarem em mim. As minhas irmãs metralhas Maione, Leilane, Laiss e Jéssica (família Carvalho), vocês são a razão do meu viver, eu amo cada uma incondicionalmente, obrigada por estarem sempre presentes em cada passo da minha vida. Ao Prof. Dr. Luciano da Silva Lima, pela oportunidade, orientação e paciência. Foi uma experiência incrível, aprendi muito com você, como pessoa e como profissional. Obrigada! Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcus Luciano Souza de Ferreira Bandeira pelos ensinamentos e pelas dicas. Obrigada por toda ajuda! Ao Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva, pelas dicas e ensinamentos. À minha colega Gabriela Leite de Melo por toda ajuda e colaboração para a confecção deste trabalho, você foi essencial. Muito obrigada por tudo! À minha amiga e companheira de trabalho Leinah Silva Souza, que nunca mediu esforços para me ajudar e me orientar, sem você estaria perdida. Obrigada por estar sempre à disposição. Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação. Obrigada!

CARVALHO, Allana Souza de. **Uso de solventes eutéticos profundos na extração de constituintes de *Miconia albicans* (Sw.) Triana**. Orientador: Luciano da Silva Lima. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Ambientais) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

## RESUMO GERAL

Há muito tempo o ser humano utiliza espécies vegetais para o tratamento e cura de diversas patologias. Apesar de diversas substâncias já terem sido isoladas, ainda existem muitos compostos que se encontram desconhecidos frente a imensa diversidade biológica presente no reino vegetal. Estes compostos provenientes de vegetais podem apresentar ações benéficas sobre a saúde humana, como o de ação antioxidante. Os antioxidantes são compostos com habilidades de impedir ou inibir o impacto dos radicais livre que estão associados ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer. Geralmente a obtenção desses compostos bioativos são realizados por extrações líquido-líquido ou sólido-líquido pelo uso de solventes que normalmente apresentam alguns efeitos nocivos ao meio ambiente. Desta forma, a dissertação apresenta o estudo dividido em dois artigos. O primeiro objetiva a comparação da eficiência da extração de solventes eutéticos e convencionais na extração dos bioativos fenólicos, flavonoides e antioxidante da *Miconia albicans* (Sw.) Triana. Nesse contexto, foram preparados e caracterizados solventes eutéticos, os quais foram avaliados a capacidade antioxidante pelo método de sequestro com o radical livre DPPH, teores de fenólicos e flavonoides totais, além da caracterização química pela identificação de ácidos fenólicos por CLAE-DAD. No segundo artigo buscou a comparação da extração de bioativos da *M. albicans* comercializada versus a planta nativa coletada em diversas regiões da Mata Atlântica Sul da Bahia. Assim, os resultados indicaram que a extração pelo uso do solvente eutético profundo (DES) demonstram ser mais efetivos nas avaliações dos constituintes em *M. albicans*, sendo uma alternativa mais limpa e verde do que os solventes convencionais.

Palavras-chaves: Ácidos fenólicos, Mata Atlântica, Antioxidante

CARVALHO, Allana Souza de. **Use of deep eutectic solvents in the extraction of constituents of *Miconia albicans* (Sw.) Triana.** Advisor: Luciano da Silva Lima. 2023. Dissertation (Master's in Environmental Science & Technology) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

## ABSTRACT

For a long time, human beings have used plant species to treat and cure various pathologies. Although several substances have already been isolated, many compounds are still unknown due to the immense biological diversity present in the plant kingdom. These compounds from vegetables may benefit human health, such as antioxidant action. Antioxidants are compounds that can prevent or inhibit the impact of free radicals associated with the development of chronic diseases like diabetes and cancer. Generally, the extraction of these bioactive compounds is carried out by liquid-liquid or solid-liquid extractions using solvents that usually have harmful effects on the environment. Thus, the dissertation presents the study divided into two articles. The first aims to compare the efficiency of the extraction of eutectic and conventional solvents in the extraction of phenolic bioactive, flavonoids, and antioxidants of *Miconia albicans* (Sw.) Triana. In this context, eutectic solvents were prepared and characterized and evaluated the antioxidant capacity by the method of sequestration with the free radical DPPH, phenolic and flavonoid contents, in addition to the chemical characterization by the identification of phenolic acids by HPLC- DAD. In the second article, we sought to compare the extraction of bioactives from the commercialized *M. albicans* versus the native plant collected in several regions of the Atlantic Forest South of Bahia. Thus, the results indicated that the extraction by using the deep eutectic solvent (DES) is more effective in evaluating the constituents in *M. albicans*, a cleaner and greener alternative than conventional solvents.

Keywords: Phenolic acids, Atlantic Forest, Antioxidant

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da espécie <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana .....	12
<i>Figura 1: Preparação dos solventes eutéticos</i> .....	22
<i>Figura 2: Extração dos constituintes da M. albicans com os solventes eutéticos e convencionais</i> .....	23
<i>Figura 3: Estruturas químicas das substâncias utilizadas na composição dos DES analisados.</i> .....	24
<i>Figura 4: Espectros de absorção de infravermelho na formação do DES 1 (a) e DES 2 (b) e seus precedentes</i> .....	27
<i>Figura 5: Teor de fenólicos e flavonoides totais da espécie M. albicans comercializada. DES 1 (eutético) e DES 2 (eutético); Etanol (EtOH); Metanol (MeOH) ± desvio padrão</i> .....	29
<i>Figura 6: Seletividade dos padrões ácido cafeico (tR 3,310 min), ácido trans-ferúlico (tR 6,255 min), ácido rosmarínico (tR 10,386 min) e ácido trans cinâmico (tR 12,041 min)</i> .....	30
<i>Figura 1. Mapa de coleta da M. albicans</i> .....	42
<i>Figura 2. Obtenção do conteúdo de flavonoides</i> .....	44
<i>Figura 3. Teores de fenólicos e flavonoides totais encontrados nas cinco regiões do Sul da Bahia. Metanol (MeOH) e solventes eutéticos (DES) – cloreto de colina/ácido cítrico/água ....</i> 46	
<i>Figura 4. Seletividade dos padrões ácido cafeico (tR 3,310 min), ácido trans-ferúlico (tR 6,255 min), ácido rosmarínico (tR 10,386 min) e ácido trans cinâmico (tR 12,041 min)</i> .....	47
<i>Figura 5. Semelhanças entre o perfil cromatográfico do material botânico comercializado (a) e nativo (b) da região de Porto Seguro</i> .....	49
<i>Figura 6. Gráfico de cotovelos</i> .....	50
<i>Figura 7. Gráfico de score (PC1 x PC2) – DES – solvente eutético, MeOH - metanol, CN – Canavieiras, EU – Eunápolis, OS – Porto Seguro, SCC – Santa Cruz Cabrália, UMA – Una e PC – Planta comercial</i> .....	50
<i>Figura 8: Análises de agrupamento hierárquico. PC – Planta comercial, SCC – Santa Cruz Cabrália, CN – Canavieiras, UNA – Una, EU – Eunápolis e PS – Porto Seguro</i> .....	51



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias isoladas da espécie <i>M. albicans</i> .....	13
Tabela 1. Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.....	26
Tabela 2. Capacidade antioxidante dos extratos de <i>M. albicans</i> .....	28
Tabela 3. Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R <sup>2</sup> ), Tempo de retenção (tR), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD .....	30
Tabela 4. Concentração de ácidos fenólicos no extrato de <i>M. albicans</i> .....	31
Tabela 1. Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.....	45
Tabela 2. Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R <sup>2</sup> ), Tempo de retenção (tR), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD .....	48
Tabela 3. Concentração de ácidos fenólicos no extrato de <i>M. albicans</i> em diferentes regiões ...	48

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
OBJETIVOS .....	15
OBJETIVO GERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
ARTIGO 1 .....	19
EXTRAÇÃO VERDE DE COMPONENTES BIOATIVOS DE <i>Miconia albicans</i> (SW.) TRIANA USANDO SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS .....	19
RESUMO.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4. CONCLUSÃO .....	31
5. REFERÊNCIAS.....	32
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	36
ARTIGO 2 .....	40
INVESTIGAÇÃO DE SIMILARIDADES EM EXTRAÇÃO VERDE DOS FITOCONSTITUINTES DE <i>Miconia albicans</i> DE DIFERENTES LOCAIS DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA .....	40
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4. CONCLUSÃO .....	52
5. REFERÊNCIAS.....	52
CONCLUSÃO GERAL.....	54

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse em estudos relacionados com plantas estas por sua vez, constituem a fonte mais antiga de fármacos consumidos pela humanidade por possuírem agentes terapêuticos que são eficazes no tratamento de cura e prevenção de diversas patologias (CORDEIRO *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2022). Entre as substâncias investigadas com interessantes efeitos biológicos destacam-se os compostos fenólicos, os quais constituem o principal grupo de antioxidantes de origem vegetal. Os flavonoides compreendem a mais importante classe de fenólicos que apresentam elevado poder antioxidante (PIERONI *et al.*, 2011). Os flavonoides são tipos de fenólicos com elevado poder antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2009). Os antioxidantes são compostos que apresentam habilidades de impedir ou inibir o impacto de certas enzimas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer (BANOV *et al.*, 2006; MATHEW; SUBRAMANIAN, 2014), além disso, substâncias antioxidantes tem também potencial de induzir respostas de defesa de plantas às doenças fitopatogênicas (RESENDE, 2021).

O reino vegetal possui ainda grande biodiversidade, e novos compostos podem ser encontrados. O Sul do estado da Bahia destaca-se por conter uma imensa área de vegetação preservada, como o bioma Mata Atlântica. Esse bioma abrange cerca de 15% do território nacional, o qual possui extensa diversidade biológica, sendo composta por formações florestais e ecossistemas associados tornando-o um dos conjuntos mais ricos de natureza vegetal e animal do planeta (ARAÚJO, 2013; CRUZ *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Diante do contexto apresentado e da ampla biodiversidade de espécies vegetais existentes, a Mata Atlântica do Sul da Bahia constitui-se em uma área de grande interesse para a extração de compostos bioativos, uma vez que nessa região podem ser encontradas plantas com grande potencial farmacológico, e essa variedade de plantas com potencialidade antioxidante e outras atividades biológicas podem se perder, devido a diminuição dessas áreas vegetais e conseqüentemente o crescimento urbano (HAMANN *et al.*, 2020; PIERONI *et al.*, 2011; SOUZA; LIMA; HACKENHAAR, 2020)

Inúmeras espécies de plantas vêm sendo exploradas comercialmente devido interesse farmacológico, são comercializadas em feiras livres ou casas especializadas, o que gera renda para comunidades que vivem em torno de regiões de grande diversidade biológica. Dentre as espécies de plantas comercializadas, destaca-se a *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Figura 1),

pertencente a família Melastomataceae, conhecida popularmente como canela-de-velho. É uma espécie arbórea muito utilizada na medicina tradicional do nordeste do Brasil para dor nas articulações (artrite, artrose), disfunções estomacais e intestinais, inflamação dentária e outras situações inflamatórias dolorosas. As folhas de *M. albicans* são geralmente utilizadas na forma de chás, feito através de infusão (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2020). A ingestão de chás preparados na forma de infusão auxilia na extração dos compostos fenólicos considerados benéficos à saúde (MORAIS *et al.*, 2009)

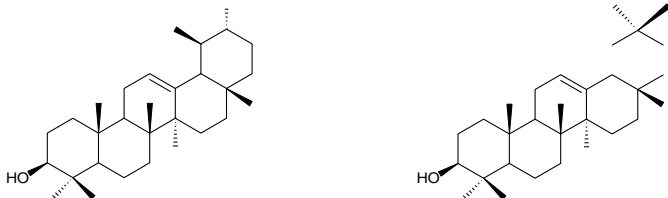
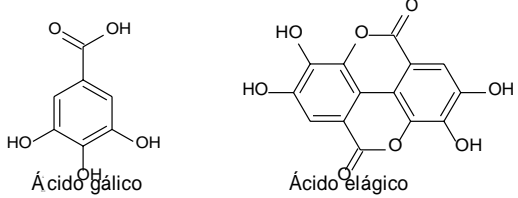
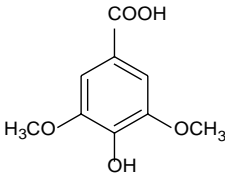
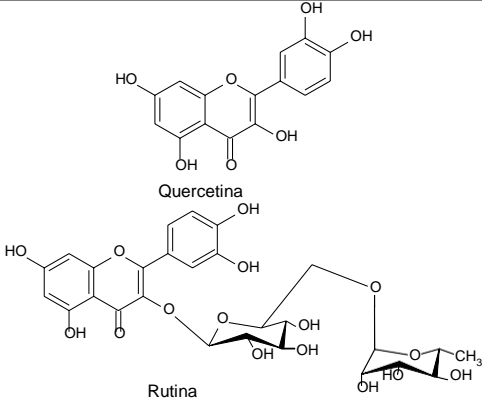
Estudos descritos na literatura identificaram por técnicas como cromatografia gasosa, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (HPLC-LC-ESI-MS/MS), cromatografia em camada e HPLC inúmeros constituintes químicos em extratos de diferentes polaridades (hexano, metanol, etanol, etc) em *M. albicans* (Tab. 1) e a estes, foram atribuídos as ações antifúngica, antitumoral, analgésica, antimalárica e antimicrobiana (extrato etanólico) que foi explicada devido a presença de um conjunto de substâncias, como ácidos triterpênicos, além de efeitos protetores contra danos no DNA induzidos pela doxorrubicina e inibição da tirosinase (CELOTTO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002; CREVELIN *et al.*, 2006; PIERONI *et al.*, 2011; HAMMAN *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Representação da espécie *M. albicans* (Sw.) Triana. Autoria própria.

Por ser uma planta comumente empregada na medicina popular e com um enorme potencial terapêutico, torna-se pertinente o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de proporcionar mais informações sobre a potencialidade farmacológica dessa espécie permitindo assim o uso seguro desse vegetal pela população (SOUZA; LIMA; HACKENHAAR, 2020).

**Tabela 1.** Substâncias isoladas da espécie *M. albicans*

Substâncias isoladas	Técnicas utilizadas	Extrato	Referência
 <p data-bbox="174 531 259 550"><math>\alpha</math>-amirina</p> <p data-bbox="584 531 669 550"><math>\beta</math>-amirina</p>	Cromatografia gasosa	Hexano	Crevelin et al 2006
 <p data-bbox="277 730 389 750">Ácido gálico</p> <p data-bbox="533 730 645 750">Ácido elágico</p>  <p data-bbox="421 951 568 970">Ácido siríngico</p>	HPLC-LC-ESI-MS/MS	Etanol	Hamman et al 2020
 <p data-bbox="412 1166 501 1185">Quercetina</p> <p data-bbox="398 1366 456 1385">Rutina</p>	Cromatografia em camada e HPLC	Metanol	Pieroni et al 2011

Geralmente na obtenção de constituintes químicos de espécies vegetais são empregados solventes orgânicos que apesar de serem eficientes na extração, possuem restrições quanto ao seu uso, pois são inflamáveis, tóxicos, voláteis e não são biodegradáveis, o que acarreta impactos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Nos últimos anos, uma das descobertas mais promissoras no mundo da Química Verde foi o desenvolvimento de solventes verdes, como os Ionic Liquid (ILs) e os Solventes Eutéticos Profundos (*Deep Eutectic Solvents* - DES) (KUDŁAK; OWCZAREK; NAMIEŚNIK, 2015; ÖZEL; ELIBOL, 2021; ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018). Devido a sua grande capacidade de dissolver compostos bioativos oriundos de vários tipos de biomassa, houve uma crescente demanda no uso de ILs como solventes para divisão, extração e purificação de compostos bioativos (VENTURA *et al.*, 2017).

Porém, existe uma preocupação em relação à aplicabilidade dos ILs para extração de compostos bioativos, pois os mesmos possuem alta toxicidade, causando assim efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente, além de elevado custo (GORKE; SRIENC; KAZLAUSKAS, 2010; HAYYAN *et al.*, 2015; JUNEIDI; HAYYAN; HASHIM, 2015; JUNEIDI; HAYYAN; MOHD ALI, 2016; MBOUS *et al.*, 2017). Apesar dos ILs terem sido aceitos como uma fonte de alternativa aos solventes convencionais, por possuírem propriedades que se destacam para os pré-requisitos da Química Verde, como não inflamáveis e reutilizáveis, estes não atenderam a expectativa, ao quesito custo que é de 5 a 20 vezes mais caro do que os solventes convencionais utilizados (DOĞAN ÇALHAN; ÜLGER, 2018). Surge então uma nova busca por solventes alternativos que venham a substituir os ILs e os solventes convencionais utilizados para extração de compostos bioativos. Essa busca tem levado ao uso de solventes eutéticos profundos, que foram aceitos como solventes verdes promissores na extração de bioativos de espécies vegetais, por possuírem características especiais como alta pureza e condutividade, não são inflamáveis, possuem estabilidade térmica além de fácil preparação (DOLDOLOVA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2016; MAJIDI; HADJMOHAMMADI, 2021). Os DES podem ser preparados, utilizando-se uma combinação de materiais que consiste em um aceitador de ligação de hidrogênio (HBA) e um doador de ligação de hidrogênio (HBD). O cloreto de colina é o HBA mais utilizado como aceitador de hidrogênio, por ter propriedades particulares tais como barato, biodegradável e não tóxico (ALSAUD; SHAHBAZ; FARID, 2021).

Desta forma, torna-se importante a extração de constituintes químicos de produtos naturais utilizando-se novas rotas verdes as quais são consideradas alternativas mais limpas e sustentáveis, apresentando menos riscos à vida, à saúde e ao meio ambiente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar a eficiência da extração dos solventes eutéticos e convencionais na obtenção de compostos bioativos de material botânico da espécie *M. albicans* comercializada, e comparar similaridade de constituintes químicos do material botânico comercializado versus material botânico nativo coletado em diferentes fragmentos da Mata Atlântica localizados em alguns municípios do Sul da Bahia, utilizando análises quimiométricas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Adquirir material botânico da espécie *M. albicans* comercializada e coletar em fragmentos da Mata Atlântica do Sul da Bahia;
- Obter os extratos dessa planta utilizando solventes verdes e convencionais;
- Avaliar o perfil cromatográfico de ambas extrações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Comparar a eficiência de ambas extrações;
- Pesquisar na literatura informações a respeito da espécie *M. albicans* e seus possíveis efeitos fitoterápicos.
- Investigar semelhança da composição química entre o material botânico comercializado e nativo dos diferentes municípios do Sul da Bahia, baseado nos dados obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE-DAD.
- Obter as análises exploratórias por Análises de Componentes Principais (PCA) e Análise de agrupamento Hierárquico (HCA) dos dados obtidos por CLAE-DAD, para possível discriminação, agrupamento e similaridade entre as amostras comercializadas e coletada na Mata Atlântica do Sul da Bahia.

## REFERÊNCIAS

- ALSAUD, N.; SHAHBAZ, K.; FARID, M. Application of deep eutectic solvents in the extraction of polyphenolic antioxidants from New Zealand Manuka leaves (*Leptospermum Scoparium*): Optimization and antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 337, 1 set. 2021.
- ARAÚJO, S. G. **Perspectivas e desafios para o desenvolvimento de fitoterápicos com plantas medicinais da Mata Atlântica para uso veterinário**. 2013. Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- BANOV, D.; ROLIM BABY, A.; MARTINS, L.; BOSCO, D.; KANEKO, T. M.; VALÉRIA, M.; VELASCO, R. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219–224, 2006.
- CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; DE ALMEIDA SPESSOTO, M.; GOMES MARTINS, C. H.; CUNHA, W. R. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 339–340, 2003.
- CORDEIRO, M. F.; NUNES, T. R. S.; BEZERRA, F. G.; DAMASCO, P. K. M.; SILVA, W. A. V.; FERREIRA, M. R. A.; MAGALHÃES, O. M. C.; SOARES, L. A. L.; CAVALCANTI, I. M. F.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Phytochemical characterization and biological activities of *plectranthus barbatus andrews*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1–12, 2022.
- CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 8, p. 827-830, 2006
- CRUZ, C. B. M.; VICENS, R. S.; SEABRA, V. da S.; REIS, R. B.; FABER, O. A.; RICHTER, M.; ARNAUT, P. K. E.; ARAÚJO, M. Classificação orientada a objetos no mapeamento dos remanescentes da cobertura vegetal do bioma Mata Atlântica, na escala 1:250.000. **Anais XIII Simposio Brasileiro de Sensoriamento remoto**, n. May 2014, p. 5691–5698, 2007. Disponível em: <<http://marte.sid.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.15.22.53/doc/5691-5698.pdf>>.
- DOĞAN ÇALHAN, S.; ÜLGER, M. Araştırma Makalesi Kolinklorür içeren bazı alçak ötektik çözücülerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. **Mersin Univ Sağlık Bilim Derg**, v. 11, n. 2, 2018.
- DOLDOLOVA, K.; BENER, M.; LALIKOĞLU, M.; AŞÇI, Y. S.; ARAT, R.; APAK, R. Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 353, n. November 2020, 2021.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVÊS, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.
- GORKE, J.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R. Toward advanced ionic liquids: Polar,



enzyme-friendly solvents for biocatalysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 40–53, fev. 2010.

HAMANN, B.; WINTER, E. M. dos S.; SILBERT, D. A.; MICKE, G. A.; VITALI, L.; TENFEN, A.; ZIMMERMANN, L. A. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. **Revista Fitos**, v. 14, n. 4, p. 450–461, 18 dez. 2020.

HAYYAN, M.; LOOI, C. Y.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A. In Vitro and in Vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 13 fev. 2015.

JUNEIDI, I.; HAYYAN, M.; HASHIM, M. A. Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83636–83647, 2015.

JUNEIDI, I.; HAYYAN, M.; MOHD ALI, O. Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7648–7659, 1 abr. 2016.

KUDŁAK, B.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 11975–11992, 27 ago. 2015.

LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v. 152, p. 23–32, 15 maio 2016.

MAJIDI, S. M.; HADJMOHAMMADI, M. R. Development of magnetic dispersive micro-solid phase extraction based on magnetic agarose nanoparticles and deep eutectic solvents for the isolation and pre-concentration of three flavonoids in edible natural samples. **Talanta**, v. 222, n. August 2020, p. 121649, 2021.

MATHEW, M.; SUBRAMANIAN, S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 23 jan. 2014.

MBOUS, Y. P.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A.; LOOI, C. Y. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 105–134, 1 mar. 2017.

MORAIS, S. M.; B CAVALCANTI, E. S.; MARIA COSTA, S. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315–320, 2009.

ÖZEL, N.; ELIBOL, M. A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, 15 jun. 2021.

PIERONI, L. G.; DE REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9439–9450, nov. 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GANDHI, S. R.; PASSOS, F. R. S.; HEIMFARTH, L.; PEREIRA, E. W. M.; MONTEIRO, B. S.; DOS SANTOS, K. S.; DUARTE, M. C.; ABREU, L. S.; NASCIMENTO, Y. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; LIMA, Á. A. N.; ZENGIN, G.; QUINTANS, J. S. S. Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, 10 ago. 2020.

RESENDE, Mário Lúcio Vilela et al. Produtos alternativos para o controlo de doenças das plantas. **Química**, 2021.

RODRIGUES, K. F.; BITENCOURT, T. C.; NUÑEZ, J. G.; GARCIA, H. O.; BUHL, B.; PADILHA, G. L.; ETHUR, E. M.; HOEHNE, L.; BRUNO, A. N.; FREITAS, E. M. Phytochemical profile and biological activities of *Bromelia antiacantha* extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–7, 2022.

SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; PEDRO, C.; GARCIA, P. A.; MARTINS, C. Avaliação da atividade analgésica de um extrato etanólico de *Miconia fallax*. **Fazenda Boll Chim.**, v. 141, n. 2, p. 158–160, 2002.

SOUSA, M. de; SILVA, C. M. R.; VIEIRA-JR, G. H. M.; AYRES, M. C. C.; CHARLLYTON, L. da C. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. D. C.; BARROS, E. S. D.; ARAÚJO, P. M. B. de; CHAVES, B. M. H. M. S. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, L. S.; LIMA, L. da S.; HACKENHAAR, D. S. M. **Estudo de espécies vegetais bioativas da Mata Atlântica do sul da Bahia**. 2020. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, 2020.

VENTURA, S. P. M.; E SILVA, F. A.; QUENTAL, M. V.; MONDAL, D.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6984–7052, 24 maio 2017.

ZDANOWICZ, M.; WILPISZEWSKA, K.; SPYCHAJ, T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 200, p. 361–380, 15 nov. 2018.

Este artigo/capítulo está formatado segundo as normas da Revista Scientia Plena  
Disponível no site: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp>.

## ARTIGO 1

### Extração verde de componentes bioativos de *Miconia albicans* (Sw.) Triana usando solventes eutéticos profundos

Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000  
Porto Seguro - BA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências  
Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

-----  
 Manuscrito com material suplementar  
 Manuscrito sem material suplementar

-----  
\*e-mail:[lucianolima@ifba.edu.br](mailto:lucianolima@ifba.edu.br)

## Green extraction of bioactive components of *Miconia albicans* (Sw.) Triana using deep eutectic solvents

### ABSTRACT

The use of green solvents, including eutectic solvents (DES), for the extraction of natural bioactive compounds such as antioxidants, phenolic acids, and flavonoids has grown more and more due to their ability to present unique properties such as high solubility, low volatility, low cost, and easy preparation. In this study, for the first time, combined DES solvents were applied to extract antioxidants, phenolic acids, and flavonoids from *Miconia albicans* (Sw.) Triana is marketed in the city of Porto Seguro. Known as cinnamon-de-velho is widely used in folk medicine for presenting anti-inflammatory action. The present research aimed to compare the efficiency of the extraction of eutectic and conventional solvents in obtaining bioactive compounds of *M. albicans*. The DPPH free radical sequestration method evaluated the presence of antioxidant activity, while the total phenolic contents were evaluated according to the Folin-Ciocalteu method. The extracts' phenolic compounds were characterized by Liquid Chromatography and High Performance (HPLC-DAD). The results indicated that the highest content of flavonoids found in the extraction of the species *M. albicans* was  $73.0 \pm 0.1 \mu\text{g EQ g}^{-1}$  extraction performed with choline chloride and urea (DES 1). In contrast, the solvents choline chloride and citric acid (DES 2) and Methanol (MeOH) demonstrated greater efficacy in extracting phenolic compounds  $978.3 \pm 0.3$  and  $1,023.1 \pm 3 \times 10^{-2}$  EAG  $\text{g}^{-1}$ , respectively. For antioxidant activity, the solvents MeOH and ethanol (EtOH) were more successful in the extraction with antioxidant activity index (IAA) 1.97 and 1.07  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , indicating an intense activity and strong activity. The DES investigated, even in smaller amounts, showed relevant IAA DES 1 0.44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (low activity) and DES 2 0.88  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (moderate activity), characterizing the presence of phenolic compounds and antioxidant activity of the plant sample. The HPLC-DAD analysis identified caffeic, transferulic, rosmarinic and transcinnamic acids using the MeOH solvent, while the other solvents identified only rosmarinic acid. However, when comparing the extraction efficacy of such solvents, the DES 1 solvent was the one that obtained the greatest success for the extraction of rosmarinic acid, which was identified and quantified. Eutectic solvents are effective in extracting bioactives from *M. albicans* with phenolic substances very present in medicinal plants.

Key words: herbal medicines, phenolic compounds, plant species

## 1. INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida no Brasil como canela-de velho, a *Miconia albicans* (Sw.) Triana é uma das espécies mais importantes da família Melastomataceae, podendo atingir até 3 metros de altura, é muito encontrada na flora brasileira, especialmente no Cerrado e Mata Atlântica [1,2]. Na medicina popular, suas partes aéreas são utilizadas na forma de chá, feito por decocção ou infusão, por causa de suas características anti-inflamatórias, como o tratamento de artrite e artrose [3,4]. Estudos realizados por Serpeloni et al (2011) [5] e Hamman (2020) [4] revelaram a presença de metabólitos secundários, tais como esteróis, triterpenos e polifenóis, indicando atividade biológica para esta espécie como ação antioxidante, efeito protetor mutagênico, ação anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antidiabética.

No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução N° 400 de 16 de fevereiro de 2017, proibiu a fabricação, distribuição e comercialização de fitomedicamentos à base de *M. albicans* [6], por falta de estudos formais sobre a segurança e eficácia do uso interno desta planta. Assim, torna-se pertinente o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de proporcionar mais informações sobre a potencialidade farmacológica dessa espécie, permitindo assim o uso seguro desse vegetal pela população [7].

Nesse sentido, na extração dos constituintes químicos de plantas são utilizados solventes orgânicos voláteis como clorofórmio, etanol, metanol, hexano, acetato de etila, acetona, propanol ou suas misturas. Entretanto, esses solventes apresentam grande toxicidade, inflamabilidade, custo elevado, longo tempo para a extração e não são biodegradáveis [8,9]. Portanto, torna-se necessário o emprego de solventes que sejam mais sustentáveis, ou seja, uma opção mais limpa na extração de compostos bioativos, tais como os solventes eutéticos profundos (DES). Assim, os DES se destacam por apresentarem propriedades específicas como boa biocompatibilidade, sustentabilidade, são biodegradáveis, além de fácil preparação e armazenamento [10].

Os DES são preparados, utilizando-se um aceitador de hidrogênio (HBA) e doador de hidrogênio (HBD) em uma correlação molar específica, criando assim uma mistura transparente. O cloreto de colina é um HBA mais frequentemente utilizado na preparação dos DES, à medida que os açúcares, álcoois, amins e ácidos são comumente empregados como HBD [11]. Esses solventes são formados por materiais sólidos e/ou líquidos com

elevados pontos de fusão, que resultam em misturas líquidas a temperatura ambiente. Possuem, grande capacidade de extrair substâncias de diferentes polaridades tornando-os bem versáteis para o uso e obtenção de constituintes químicos bioativos [12].

Estudos feitos por Dheyab (2021) [12] revelaram que os DES possuem seletividade na extração de compostos bioativos, como saponinas, polifenóis, antraquinonas, flavonoides e ácidos fenólicos de fontes naturais diferentes. Muitos compostos fenólicos extraídos de plantas têm apresentado atividade antioxidante, como o ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cafeico e flavonoides [13,14]. Os flavonoides na maioria das plantas são tipos de fenólicos com elevado poder antioxidante [15,16]. Os antioxidantes, são compostos que apresentam habilidades de impedir ou inibir o impacto de certas enzimas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e câncer [17,18].

Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar a extração de fenólicos, flavonoides e avaliar a atividade antioxidante de *M. albicans* com o uso de DES e solventes convencionais, e desta forma comparar os resultados.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Material vegetal

Foram adquiridas 200g de folhas secas de *M. albicans* embaladas em saco plástico com validade de 6 meses, em local de comercialização na cidade de Porto Seguro - Bahia, Brasil no mês de novembro de 2021.

### 2.2. Preparação dos solventes eutéticos profundos

Os DES foram preparados pela mistura do cloreto de colina (Êxodo científica) e ureia (Dinâmica) 1:2 m/m (DES 1), cloreto de colina, ácido cítrico (Dinâmica) e água ultrapura 1:1:2 m/m (DES 2). Neste processo reacional todas misturas foram aquecidas a 60°C por 3h, sob agitação constante com auxílio de agitador magnético (Fig. 1). Após resfriamento à temperatura ambiente, os solventes sintetizados foram armazenados em dessecadores protegidos da luz.

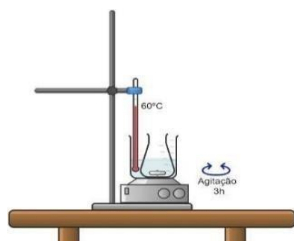


Figura 1: Preparação dos solventes eutéticos. Autoria própria.

### 2.3 Preparação dos extratos

As folhas foram trituradas em moinho de facas e peneiradas em agitador de peneiras (Lucadema, modelo 04/01) à granulometria de 0,450 mm. Os procedimentos extrativos dos constituintes foram realizados por adaptação da metodologia descrita por Christina Bakirtzi [19]. Desta maneira, foram preparadas soluções a 80% (v/v) dos DES 1 e DES 2 e 60% de etanol (EtOH) (Qhemis) e metanol (MeOH) (Sigma-Aldrich) em tubos de 15 mL com água ultrapura. Nos tubos foram adicionados 0,1 g das folhas moídas, 5 mL da mistura dos solventes sob agitação manual e conduzidas a extração no banho ultrassônico (Cristófoli-modelo 11/2010) a 60 °C por 100 min (220V~0,17 kW – 0,8 A,  $f=50/60$  Hz e  $f_{\text{ultrassônica}}=42$  kHz). Na sequência, os materiais foram centrifugados a 2,954 XG por 20 minutos em uma centrífuga (Centrífuga NT810- nova técnica) (Fig. 2) e em seguida guardados sob refrigeração para posteriores análises.



Figura 2: Extração dos constituintes da *M. albicans* com os solventes eutéticos e convencionais. Autoria própria.

### 2.4 Preparo das pastilhas de Brometo de Potássio - KBr

As pastilhas foram preparadas a partir da trituração do KBr em almofariz de ágata. Os reagentes cloreto de colina (Êxodo científica), ureia (Dinâmica), ácido cítrico (Dinâmica) e os solventes eutéticos preparados DES 1 (cloreto de colina/ureia) e DES 2 (cloreto de colina/ácido cítrico/água) foram misturadas, separadamente, ao KBr triturado. Em seguida, foram colocados 0,1g da mistura no pastilhador seguido de compressão em prensa hidráulica de 10 t/min, para obtenção de pastilhas finas e transparentes.

#### 2.4.1 Caracterização dos solventes eutéticos por Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

As pastilhas adquiridas foram introduzidas no compartimento de leitura do Espectrômetro de Infravermelho IRAffinity-1S Shimadzu (modelo 00392, Japão) e

analisadas, obtendo-se os espectros de cloreto de colina/ureia/DES 1 e cloreto de colina/ácido cítrico/água DES 2. Os espectros foram obtidos na faixa espectral entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  [20]. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

A caracterização estrutural dos DES, foram realizadas por espectroscopia no infravermelho. De modo a reconhecer as alterações espectrais e estruturais em razão das ligações de hidrogênio formadas no decorrer da síntese dos DES, investigou-se os precedentes individualmente e os DES produzidos a partir destes (Fig. 3).

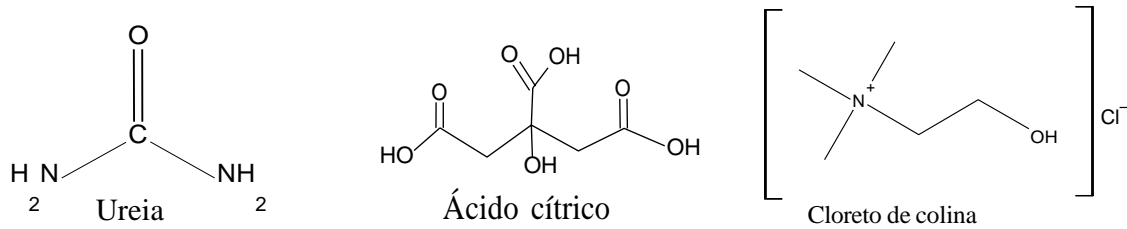


Figura 3: Estruturas químicas das substâncias utilizadas na composição dos DES analisados.

## 2.5 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando a metodologia descrita por Furlan e colaboradores [21], com algumas modificações. Foram preparadas soluções etanólicas dos extratos 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em microplaca de 96 poços foram adicionadas aos poços 100  $\mu\text{L}$  de etanol, 100  $\mu\text{L}$  dos extratos e feita diluição em série das amostras com concentração inicial de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e final de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Logo após, foram adicionadas 100  $\mu\text{L}$  da solução etanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidril (DPPH) (60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após 20 min de incubação sob ausência da luz, foi realizada leituras em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) no comprimento de onda de 517 nm como substância padrão, foi utilizado o hidroxitoluenobutilado (BHT). A partir das absorbâncias obtidas, foram calculados o percentual da atividade antioxidante (equação 1):

$$AA\% = \frac{(Abs\ 2 - Abs\ 1)}{Abs\ 2} \times 100 \quad (1)$$

Onde AA% é a porcentagem da atividade antioxidante, Abs1 absorbância da amostra - branco e Abs2 absorvância equivalente ao controle negativo (etanol e DPPH). A concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) foi obtida através da equação da reta obtida no gráfico da AA% versus concentração da amostra, e o índice de atividade antioxidante (IAA) foi obtido da equação 2:



$$IAA = \frac{[DPPH]}{CE_{50}} \quad (2)$$

## 2.6 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi realizado por adaptações da metodologia descrita por Banov [18]. Resumidamente, 150 µL dos extratos (700 µg mL<sup>-1</sup>) e 150 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>; 0,025g mL<sup>-1</sup>) foram adicionados em microplaca de 96 poços e incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm. A quercetina foi utilizada como padrão na elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em µg de quercetina por mL dos extratos.

## 2.7 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos foi mensurado pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Mathew e Subramanian [22]. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 20 µL dos extratos 2000 µg mL<sup>-1</sup>, 200 µL de água destilada, 20 µL do *Folin-Ciocalteu* e 60 µL carbonato de sódio 8,5%. Em seguida a placa foi incubada por 1h à 45°C sucedida de leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 760 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão para elaboração da curva de calibração e os valores totais do conteúdo fenólico foram expressos µg Equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

## 2.8 Análise Cromatográficas

No preparo das amostras para injeção no CLAE-DAD, os extratos foram eluídos em cartucho C-18 Strata Phenomenex® previamente condicionado. As amostras foram eluídas em 10 mL de metanol, sendo o eluato coletado em tudo de ensaio de 15 mL. Todas as soluções foram filtradas por membranas GxP/PVDF 0,2 µm.

A identificação dos constituintes químicos dos extratos foi realizada por um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, Shimadzu). As condições de separação foram realizadas em sistema de gradiente utilizando dois solventes como fase móvel: solvente B (ácido acético 2%) e C (acetonitrila) (Tab. 1). Foi utilizado uma coluna analítica de fase reversa Shim-Pak C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula), com taxa de fluxo constante de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, acompanhada com sistema de fotodiodos. Um volume de injeção de 20 µL foi ministrado e as injeções foram feitas em triplicata.

**Tabela 1.** Gradiente de eluição usado nas análises cromatográficas.

<b>Tempo (min)</b>	<b>B%</b>	<b>C%</b>
<b>0,05-5</b>	85	15
<b>5,01-20</b>	70	30
<b>20,01-35</b>	50	50
<b>35,01-45</b>	60	40
<b>45,01-65</b>	15	85
<b>65,01-72</b>	0	100

B= ácido acético 2%; C= acetonitrila

Os picos dos cromatogramas foram identificados e comparados com o tempo de retenção dos padrões empregados ácido cafeico, ácido trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (todos da marca Sigma Aldrich), lidos no comprimento de onda de 254 nm.

Para validação do método foram utilizados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade - sensibilidade, precisão intra-corrída (repetibilidade), limites de detecção e quantificação de acordo com Ribani e colaboradores [23] e ANVISA [24].

## 2.9 Análises estatísticas

Os resultados apresentados neste estudo representam a média de três repetições ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão (DP) da média. Foram analisados estatisticamente diferentes resultados para as variáveis atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides totais, comparando os resultados do índice de confiança com o valor fixado do t-Student 3,18, com nível de confiança 95% utilizando o programa Microsoft Excel. As médias foram comparadas por análise de variância ANOVA e teste de Turkey ( $p<0,05$ ).

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização dos solventes eutéticos (DES)

A espectroscopia de infravermelho gerou dois espectros (Figura 4a,b), ambos apresentaram absorções em regiões características de grupos funcionais presentes nos precedentes utilizados na formação dos DESs. As principais diferenças apresentadas entre os espectros DES 1 e DES 2 podem ser visualizadas na intensidade de algumas bandas. Como as vibrações encontradas na região de 3371 a 3382  $\text{cm}^{-1}$ , que estão associadas a vibrações dos grupos funcionais -OH e -NH<sub>2</sub> presentes no cloreto de colina e ureia (DES 1) indicando

o acréscimo do número de onda e aumento do deslocamento da intensidade devido a formação das ligações de hidrogênio, caracterizando a criação do DES. Essas ligações provavelmente podem existir como, OH---NH, OH---OH, NH---OH, NH---NH [25].

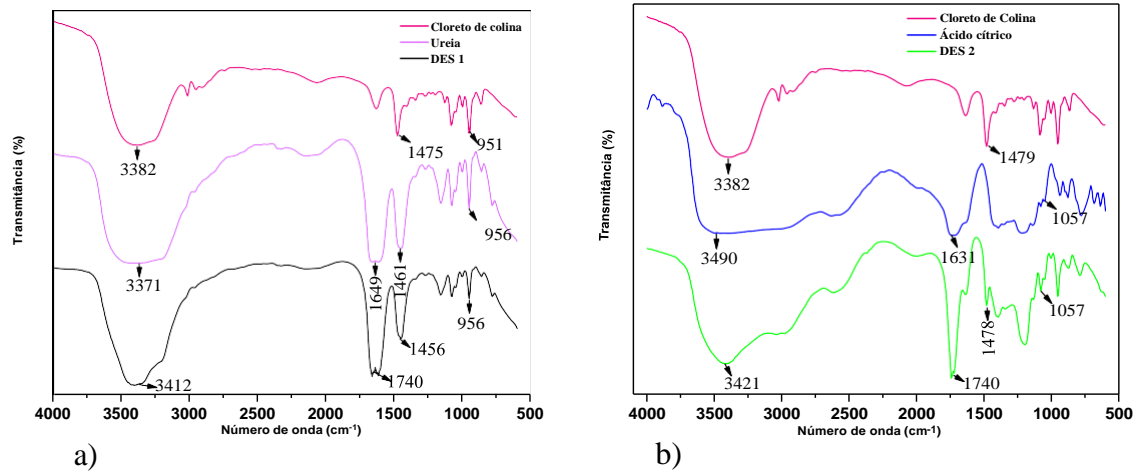


Figura 4: Espectros de absorção de infravermelho na formação do DES 1 (a) e DES 2 (b) e seus precedentes.

Em ambos os espectros foram visualizadas bandas específicas da função álcool, caracterizadas em atribuição do estiramento da ligação O-H em ligação de hidrogênio intermolecular, no entanto, o espectro DES 2 demonstrou bandas mais largas e intensas (3490-3382cm<sup>-1</sup>), devido ao aumento da concentração dessa função. Foi verificado diferenças na absorção correspondente ao dobramento do grupo carbonila (C=O) do DES 1 (1649-1475cm<sup>-1</sup>) e DES 2 (1631-1479cm<sup>-1</sup>), demonstrando a formação de ligações de hidrogênio entre os reagentes, ou seja, a estabilidade dos DES se dá pela caracterização das interações de hidrogênio responsáveis pela formação dos solventes. Esse aumento do comprimento de onda do dobramento carbonila caracteriza o crescimento da densidade de elétrons do oxigênio na carboxila, comprovando a geração de ligações de hidrogênio [26].

### 3.2 Atividade antioxidante

Como mostra a Tab. 2 o extrato MeOH ( $1,97 \pm 0,01$ ) e EtOH ( $1,07 \pm 0,01$ ) obtiveram maiores valores do índice de atividade antioxidante (IAA) quando comparado aos extratos DES 1 ( $0,44 \pm 0,01$ ) e DES 2 ( $0,88 \pm 0,01$ ). De acordo com Scherer e Godoy 2009 [27] o IAA está associado a influência da concentração da solução de DPPH com o valor da concentração efetiva média (CE<sub>50</sub>), e que o aumento do índice está relacionado a maior capacidade dos extratos em estabilizar o radical, ou seja, quanto menor o valor de CE<sub>50</sub> por amostra, maior será o consumo de DPPH e conseqüentemente maior será sua atividade

antioxidante. Baseado nos valores de IAA descritos pelos autores, valores de IAA menor que 0,5 apresentam atividade antioxidante baixa, entre 0,5 e 1,0 apresentam atividade antioxidante moderada, entre 1,0 e 2,0 IAA considerada forte e acima de 2,0 atividade antioxidante muito forte [9].

**Tabela 2.** Capacidade antioxidante dos extratos de *M. albicans*.

Solvente	CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Faixas do CE <sub>50</sub>	IAA (µg mL <sup>-1</sup> ) ± DP	Faixas do IAA
<b>BHT</b>	17,53	Intensa atividade	3,42 ± 0,01	Intensa atividade
<b>MeOH</b>	30,33	Intensa atividade	1,97 ± 0,01	Intensa atividade
<b>EtOH</b>	55,65	Moderada atividade	1,07 ± 0,01	Forte atividade
<b>DES 2</b>	68,3	Moderada atividade	0,88 ± 0,01	Moderada atividade
<b>DES 1</b>	109,43	Baixa atividade	0,44 ± 0,01	Baixa atividade

BHT (hidroxitoluenobutilado); MeOH (metanol); EtOH (etanol); DES 2 (cloreto de colina + ácido cítrico + água); DES1 (cloreto de colina + ureia); CE<sub>50</sub> (concentração efetiva média); IAA (índice de atividade antioxidante); DP (desvio padrão). Todas as análises foram feitas em triplicata

Os DESs investigados apresentaram faixa de IAA de baixa atividade para DES 1 e moderada atividade DES 2. Embora poucos estudos tenham sido realizados com foco na utilização de solventes eutéticos na extração de compostos bioativos provenientes de materiais vegetais [28], algumas pesquisas descritas na literatura tem mostrado resultados promissores na aplicação de solventes eutéticos para extração de compostos fenólicos de plantas que em geral são antioxidantes ativos [29].

### 3.3 Teores de flavonoides e fenólicos totais

Na investigação da extração de flavonoides e fenólicos totais de *M. albicans* pelos DESs e solventes convencionais como metanol e etanol (Fig. 5) foi observado que houve maior extração de fenólicos. com o solvente metanol, com valor de 1023,1 µg EAG/g em comparação ao etanol (932,3 µg EAG/g), DES1 e DES 2. Enquanto, na extração de flavonoides, o solvente DES 1 apresentou melhor ação com o teor de 73 µg EQ/g. Apesar disso, o teor de fenólicos obtido no DES 2 (978,6 ug EAG/g) foi próximo ao teor obtido com o metanol (1023,1 µg EAG/g), evidenciando eficácia desse solvente como extrator.

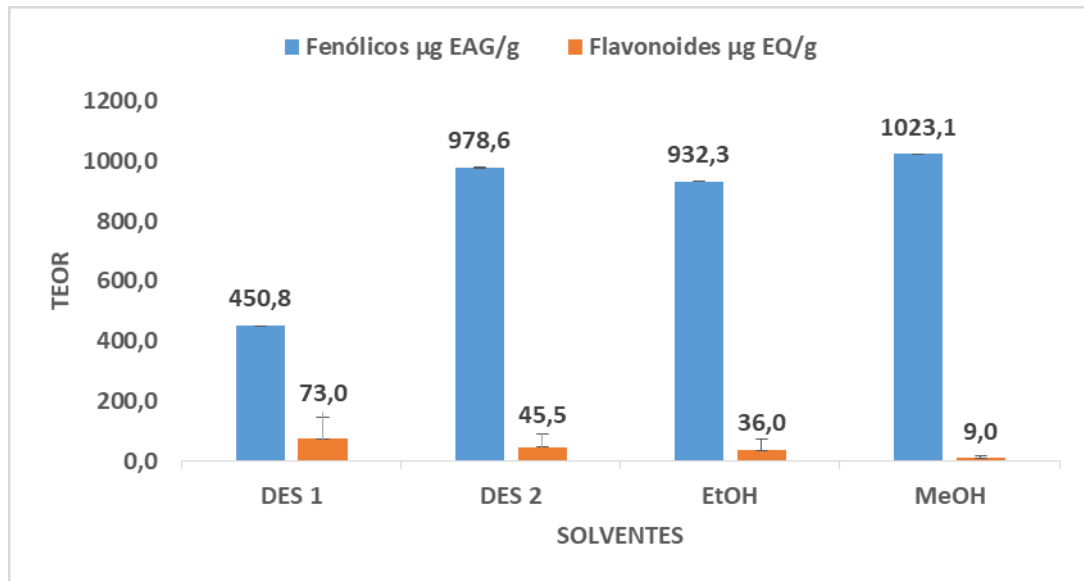


Figura 5: Teor de fenólicos e flavonoides totais da espécie *M. albicans* comercializada. DES 1 e DES 2; Etanol (EtOH); Metanol (MeOH)  $\pm$  desvio padrão.

Tais resultados podem estar associados com solventes que possuem elevada habilidade de formar ligações de hidrogênio com compostos fenólicos [30]. Neste caso, o metanol e o DES 2 obtiveram maior interação e formação de ligação de hidrogênio demonstrando melhores desempenho de extração para fenólicos, enquanto o DES 1 mostrou melhor atividade na extração de flavonoides. A remoção de constituintes químicos depende principalmente das propriedades dos solventes propostos, diante disso os DESs, podem realizar um papel importante na eficácia de extração em razão de suas propriedades físico-químicas como polaridade, viscosidade e solubilização dos compostos fenólicos [31].

Conforme pesquisas realizadas por Dheyab (2021) [12], os DESs possuem seletividade na extração de compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides e esta seletividade pode mudar de acordo com a composição dos DES formado. É evidente que, quando comparado ao solventes convencionais os resultados alcançados para os DESs demonstraram que estes são excelentes extratores por apresentarem habilidades de desempenharem uma imensidade de interações com analitos bioativos [10]. Portanto, estes resultados corroboram com os dados obtidos nesta pesquisa demonstrando a eficácia dos solventes eutéticos na extração de constituintes químicos de *M. albicans*, além de serem considerados ecoeficientes por apresentarem boa biocompatibilidade, são biodegradáveis, não inflamáveis sendo assim menos nocivo à saúde humana e ao meio ambiente.

### 3.4 Análise Cromatográfica

As condições cromatográficas desenvolvidas na identificação dos constituintes químicos de *M. albicans* foi iniciada a partir da seletividade dos padrões ácido cafeico, ácido

trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (Fig. 6).

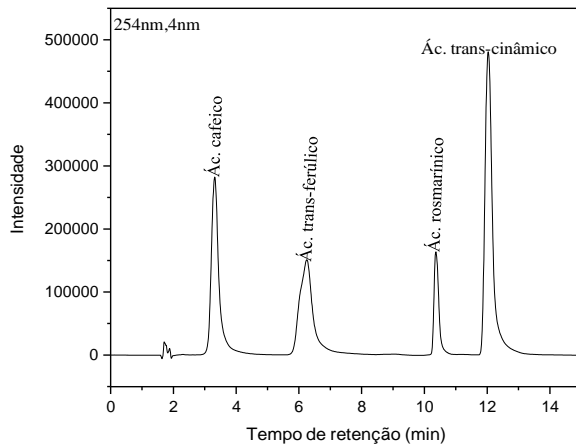


Figura 6: Seletividade dos padrões e seus respectivos tempo de retenção ( $tR$ ). Ácido cafeico ( $tR$  3,310 min), ácido trans-ferúlico ( $tR$  6,255 min), ácido rosmarínico ( $tR$  10,386 min) e ácido trans cinâmico ( $tR$  12,041 min)

Os parâmetros relacionados à eficiência da separação foram avaliados. Com os dados adquiridos por área através da medida da linearidade foram calculados os limites de detecção e quantificação para cada ácido padrão (Tab. 3). Os valores obtidos para linearidade estão de acordo com o valor mínimo estipulado pela RE n° 899: 0,9900.

**Tabela 3.** Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear ( $R^2$ ), Tempo de retenção ( $tR$ ), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD.

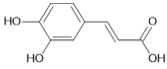
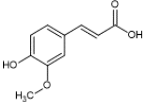
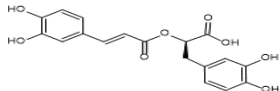
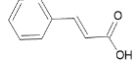
Analito	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>a</sup>	ER	$R^2$	$t_{rmin}^b \pm DP$	DPR (%)	IC
Ác. cafeico	0,013	0,040	$y=4837,1x + 34727$	0,997	$3,18 \pm 0,25$	7,81	0,12
Ác. ferúlico	0,010	0,310	$y=4876,1x + 15144$	0,996	$6,29 \pm 0,36$	5,7	0,18
Ác. rosmarínico	0,020	0,620	$y=1890x + 836,03$	0,994	$10,42 \pm 0,13$	1,25	0,06
Ác. Trans-cinâmico	0,006	0,019	$y=6933,7 + 46857$	0,999	$12,13 \pm 0,08$	0,63	0,04

<sup>a</sup> Os valores são expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

<sup>b</sup> O tempo é expresso em minuto.

Nas análises dos extratos preparados pelos diferentes solventes eutéticos DES 1 e DES 2 e convencionais metanol e etanol foi possível visualizar que todos os solventes utilizados identificaram e quantificaram apenas o ácido rosmarínico (Tab. 4). No entanto, o solvente DES 1 demonstrou melhor extração para este ácido. Em contrapartida, os ácidos cafeico, trans-ferúlico e trans-cinâmico não foram identificados por nenhum dos solventes utilizados.

**Tabela 4.** Concentração de ácidos fenólicos no extrato de *M. albicans*

Extrato	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ de extrato)			
				
	Ác. cafeico	Ác. trans-ferúlico	Ác. rosmarínico	Ác. trans-cinâmico
DES 1	ND	ND	2,117 $\pm$ 1,05	ND
DES 2	ND	ND	0,916 $\pm$ 1,36	ND
Metanol	ND	ND	0,939 $\pm$ 1,09	ND
Etanol	ND	ND	1,632 $\pm$ 0,99	ND

ND (não detectável); Desvio padrão calculado com  $n=3$

Estudos realizados por Pieroni et al (2011) [32], Vasconcelos et al (2006) [33] e Serpeloni et al (2011) [5] revelaram atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênica para a espécie *M. albicans*. Tais propriedades farmacológicas relatadas podem estar relacionadas à presença dos constituintes químicos encontrados nos extratos como flavonol, rutina, quercetina, 3-(*E*)-*p*-cumaroil- $\alpha$ -amirina,  $\alpha$ -amyrin, ácido epibetulínico, ácido ursólico e ácido epiursólico. O teor de ácido rosmarínico detectado neste estudo demonstra significativa contribuição para suas atividades terapêuticas. Este ácido é conhecido por possuir potenciais efeitos biológicos, bem como exibir ação anti-inflamatória e antioxidante [34], além de contribuir para a redução de insulina e níveis de lipídios plasmáticos apresentando potencial mecanismo antidiabético [35].

Desse modo, a extração realizada com o DES 1 para o ácido rosmarínico, demonstrou maior eficiência, o que pode estar relacionando com a existência de inúmeras redes de ligações de hidrogênio que interagem intensamente com os compostos fenólicos possibilitando sua extração [36]. Portanto, o resultado dessa análise demonstra mais uma vez a aplicabilidade da utilização de solventes eutéticos para extração de bioativos de *M. albicans* comprovando a competência de tais solventes quando comparados aos solventes convencionais.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pela primeira vez foi investigado a extração de bioativos fenólicos, flavonoides e antioxidante da espécie *M. albicans* pelo uso de solventes eutéticos profundos. As atividades foram comparadas com as espécimes com os solventes convencionais como metanol e etanol. Todos os solventes utilizados extraíram o ácido rosmarínico, porém ao comparar a eficiência de extração dos solventes convencionais e eutéticos, observou-se que o solvente eutético DES 1 obteve melhor eficácia na extração do ácido rosmarínico. Os resultados obtidos neste estudo, classificam os solventes eutéticos DES 1 e DES 2 como eficazes na extração de bioativos de *M. albicans*.

O uso desses solventes para extração de bioativos tem se tornado uma opção mais segura e limpa por apresentarem propriedades especiais como baixa volatilidade, são biodegradáveis e fácil preparação, além de serem menos nocivos ao meio ambiente tornando-os ecoeficientes. Estudos posteriores devem ser realizados utilizando outros solventes eutéticos a fim de identificar e quantificar novos bioativos da espécie do ponto de vista químico e farmacológico. Portanto este estudo se constituiu na valorização da biodiversidade do bioma Mata Atlântica, assim como contribuiu com os princípios ecológicos na utilização de solventes que agridem menos o meio ambiente.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] Martins AB, Semir J, Goldenberg R, Martins E. O gênero *Miconia* (Melastomataceae). *Acta Bot Brasilica* 1996;10:267–316.
- [2] Lima TC, Matos SS, Carvalho TF, Silveira-Filho AJ, Couto LPSM, Quintans-Júnior LJ, et al. Evidence for the involvement of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves (Melastomataceae). *J Ethnopharmacol* 2020;259.
- [3] Maria de AAT, Fonseca SA, Brandão M, Sueli MGT, de Fátima SEA, Smânia JA, et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*; 95:367–73.
- [4] Hamann B, Winter EM dos S, Silbert DA, Micke GA, Vitali L, Tenfen A, et al. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. *Rev Fitos* 2020;14:450–61.
- [5] Mara Serpeloni J, Mazzaron Barcelos GR, Prates Mori M, Yanagui K, Vilegas W, Aparecida Varanda E, et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Exp Toxicol Pathol* 2011;63:499–504Manzano



- MI, Centa A, Veiga A de A, da Costa NS, Bonatto SJR, de Souza LM, et al. Phytochemical Evaluation and Anti-Inflammatory Potential of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Extracts. *Molecules* 2022;27.
- [6] Iglesias, DT; Fonseca, RS. *Miconia albicans* (Sw.) Triana (canela-de-velho), the new trend plant from the Brazilian Cerrado: contribution to species identification and pharmacological aspects. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 14, p. 1-9, 2022.
- [7] Do TH, Truong HB, Nguyen HC. Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from *Ocimum Basilicum* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Pharm Chem J* 2020;54:162–9. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02181-3>.
- [8] Oliveira GLS. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. *Rev Bras Plantas Med* 2015;17:36–44.
- [9] Hashemi B, Shiri F, Švec F, Nováková L. Green solvents and approaches recently applied for extraction of natural bioactive compounds. *Trends Anal Chem* 2022;157.
- [10] Mansur AR, Song NE, Jang HW, Lim TG, Yoo M, Nam TG. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. *Food Chem* 2019;293:438–45.
- [11] Dheyab AS, Bakar MFA, Alomar M, Sabran SF, Hanafi AFM, Mohamad A. Deep eutectic solvents (DESs) as green extraction media of beneficial bioactive phytochemicals. *Separations* 2021;8.
- [12] Neto J da RL, Araucate AD de, Moura PA de, Filho CMB, Tenório JCG, Silva AG da, et al. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *J Med Plants Res* 2016;10:409–16.
- [13] Martín-García B, Pimentel-Moral S, Gómez-Caravaca AM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. Box-Behnken experimental design for a green extraction method of phenolic compounds from olive leaves. *Ind Crops Prod* 2020;154:112741.
- [14] Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 2002;50:3660–7.
- [15] Morais SM, B Cavalcanti ES, Maria Costa SO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev Bras Farmacogn Brazilian J Pharmacogn* 2009;19:315–20.

- [16] Duarte-Almeida JM, Santos RJ dos, Genovês MI, LAJOLO FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnol Aliment* 2006;26:446–52.
- [17] Banov D, Rolim Baby A, Martins L, Bosco D, Kaneko TM, Valéria M, et al. Caracterização do extrato seco de Ginkgo biloba L. em formulações de uso tópico. *Acta Farm Bonaer* 2006;25:219–24.
- [18] Bakirtzi C, Triantafyllidou K, Makris DP. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2016;3:120–7.
- [19] Soares LA, De E, Gil S, Rezende KR. Análises preliminares de substâncias viscosas em espectrômetro de infravermelho utilizando suporte alternativo Analytical alternative method applied to viscous substances by infrared spectrometry. *Rev Eletrônica Farmácia* 2006;3:63–7.
- [20] Martha S, Negri G, Berry PE, Ee BW Van, Salatino A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton ( Euphorbiaceae ) 2015;38:693–702.
- [21] Mathew M, Subramanian S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PLoS One* 2014;9.
- [22] Ribani M, Beatriz C, Bottoli G, Collins CH, Sales IC, Jardim F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. vol. 27. 2004.
- [23] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE n° 899, de 29/05/2003., 2003.
- [24] Yue D, Jia Y, Yao Y, Sun J, Jing Y. Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. *Electrochim Acta* 2012;65:30–6.
- [25] Elderderi S, Leman-Loubière C, Wils L, Henry S, Bertrand D, Byrne HJ, et al. ATR-IR spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. *J Mol Liq* 2020;311.
- [26] Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index ( AAI ) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method 2009;112:654–8.
- [27] da Silva RF, Carneiro CN, Cheila CB, J. V. Gomez F, Espino M, Boiteux J, et al. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchem J* 2022;175.
- [28] Petkov H, Trusheva B, Krustanova S, Grozdanova T, Popova M, Alipieva K, et al.

- Green extraction of antioxidants from natural sources with natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus L'Academie Bulg Des Sci* 2022;75:1129–37.
- [29] Alsaud N, Shahbaz K, Farid M. Application of deep eutectic solvents in the extraction of polyphenolic antioxidants from New Zealand Manuka leaves (*Leptospermum Scoparium*): Optimization and antioxidant activity. *J Mol Liq* 2021;337.
- [30] Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011;126:1821–35.
- [31] Pieroni LG, De Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 2011;16:9439–50.
- [3] Vasconcelos MAL, Royo VA, Ferreira DS, Miller Crotti AE, Andrade E Silva ML, Carvalho JCT, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift Fur Naturforsch - Sect C J Biosci* 2006;61:477–82.
- [34] Adomako-Bonsu AG, Chan SL, Pratten M, Fry JR. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol Vitr* 2017;40:248–55.
- [35] Berhow MA, Affum AO, Gyan BA. Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims grown in Ghana. *J Med Food* 2012;15:611–20.
- [36] Zannou O, Koca I. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. *Lwt* 2022;158:113184.

## ARTIGO 1

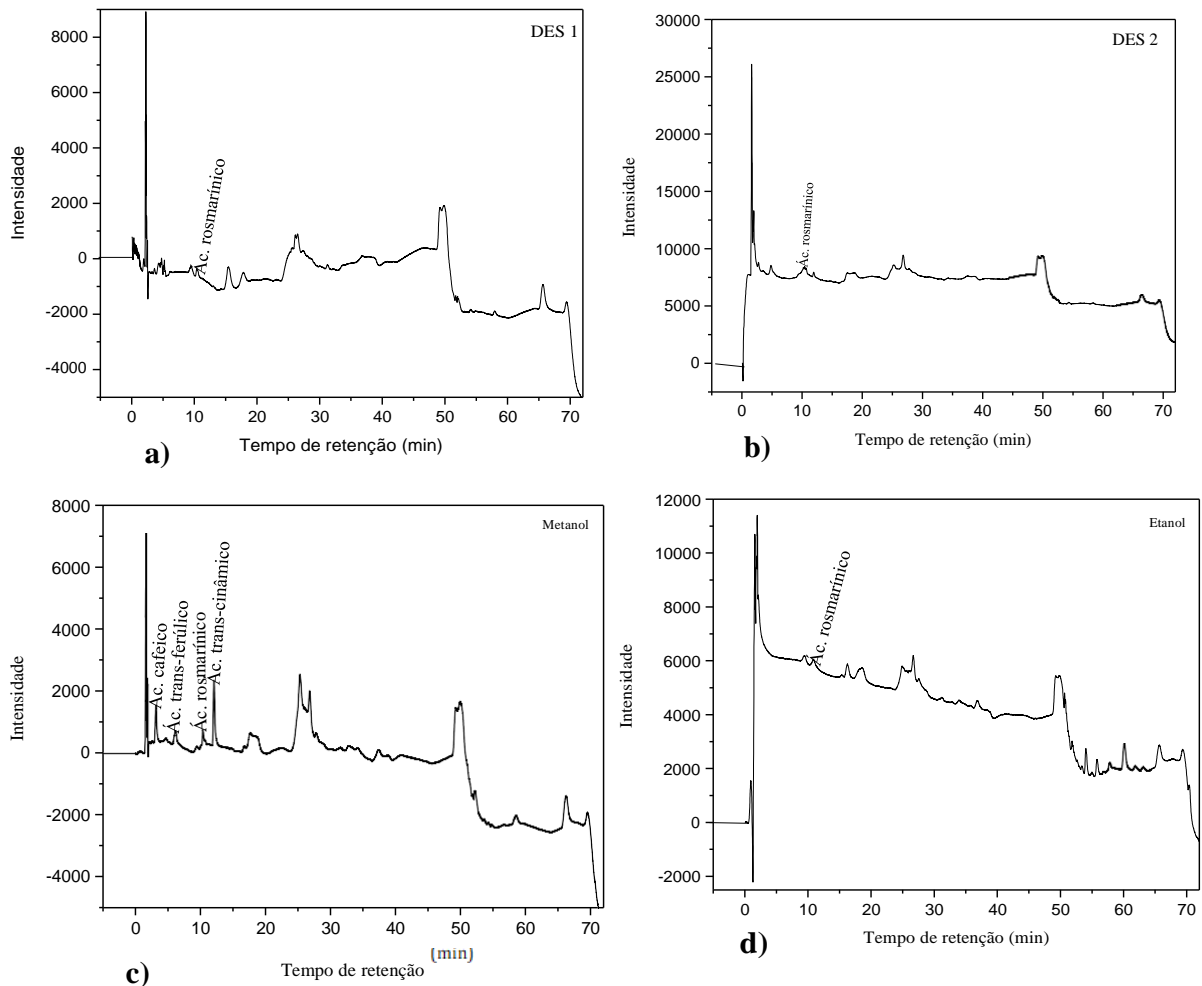
**Extração verde de componentes bioativos de *Miconia albicans*  
(Sw.) Triana usando solventes eutéticos profundos**

Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

## MATERIAL SUPLEMENTAR



**Fig. a)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente DES 1 em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tr 10,449min)

**Fig. b)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente DES 2 em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tr 10,449min)

**Fig. c)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação dos ácidos cafeico (tr 3,268min), trans-ferúlico (tr 6,200min), rosmarínico (tr 10,449min) e trans-cinâmico (tr 12,169min)

**Fig. d)** Análise do extrato *M. albicans* utilizando solvente etanol em CLAE-DAD com a identificação do rosmarínico (tr 10,892min)

## ARTIGO 2

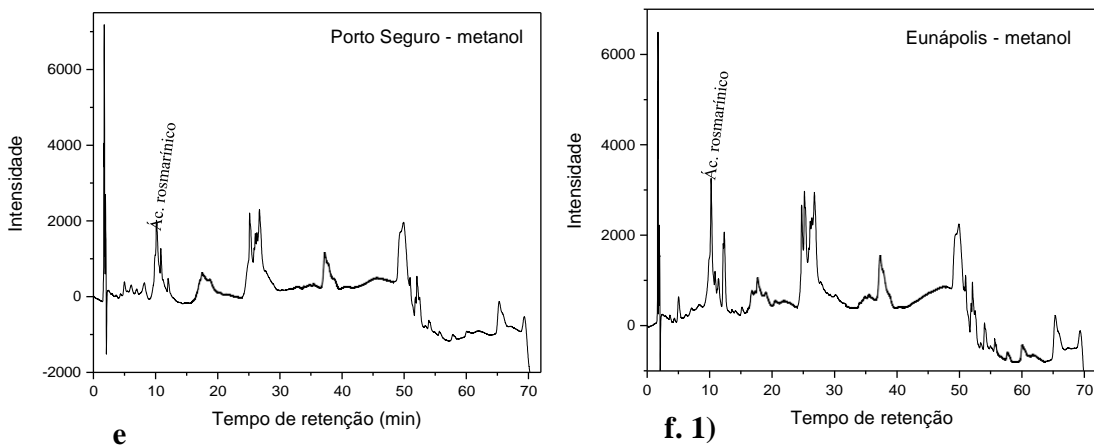
### Investigação de similaridades em extração verde dos fitoconstituintes de *Miconia albicans* de diferentes locais da Mata Atlântica do Sul da Bahia

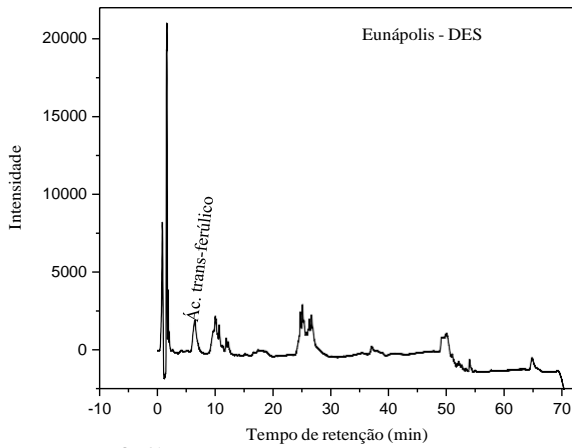
Allana S. de Carvalho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Bahia, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

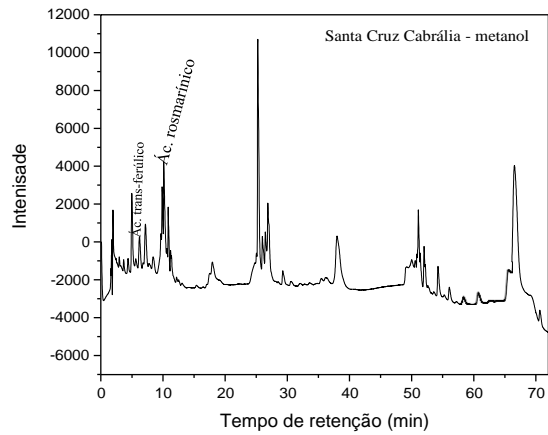
<sup>2</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências Ambientais, 45810-000 Porto Seguro - BA, Brasil

## MATERIAL SUPLEMENTAR

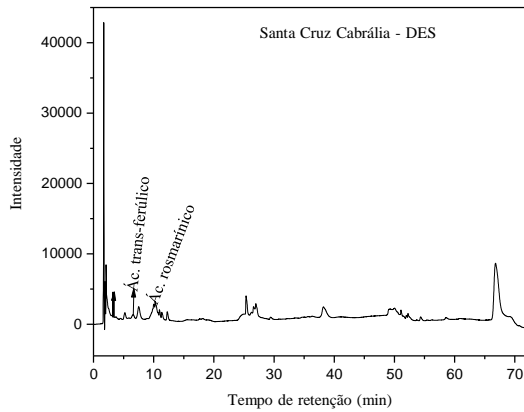




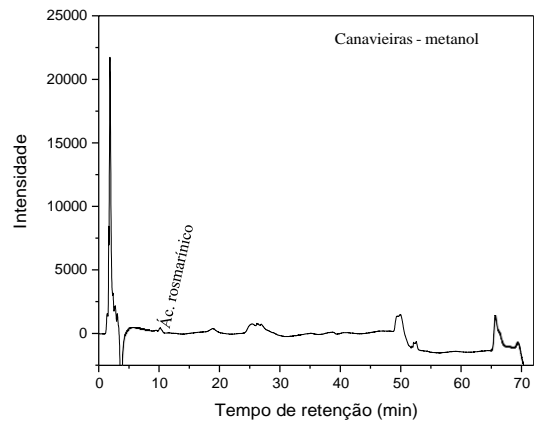
f. 2)



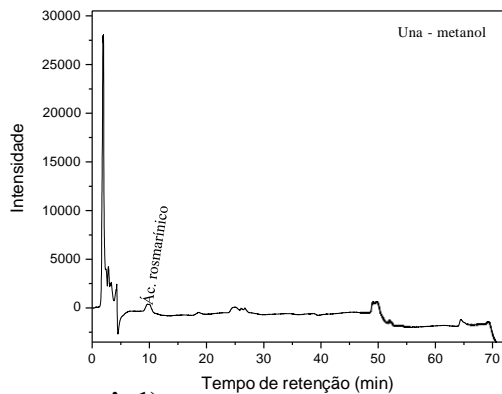
g. 1)



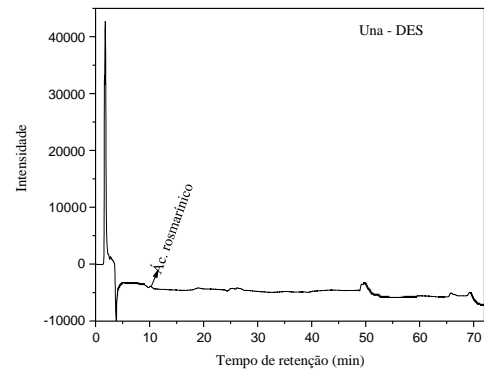
g. 2)



h)



i. 1)



i. 2)

**Fig. e)** Análise do extrato metanólico de *M. albicans* nativa do município de Porto Seguro em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,068min).

**Fig. f. 1,2.** Análise do extrato *M. albicans* nativa do município de Eunápolis utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,095min) e **f 2)** usando DES 2 com a identificação do ácido trans-ferúlico (tR 6,45min).

**Fig. g.1,2: g.1)** Análise do extrato *M. albicans* nativa do município de Santa Cruz Cabrália utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido trans-ferúlico (tR 6,169min) e ácido rosmarínico (tR 10,068min). **g. 2)** ácido cítrico com identificação de do ácido trans-ferúlico (tR 6,518min) e ácido rosmarínico (tR 10,170min).

**Fig. h).** Análise do extrato *M. albicans* nativa utilizando solvente metanol em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico (tR 10,095min)

**Fig. i.1,2: i,1)** Análise do extrato *M. albicans* nativa utilizando solvente metanol. **i,2)** ácido cítrico em CLAE-DAD com a identificação do ácido rosmarínico ambos no (tR 10,068min).

Este artigo/capítulo está formatado segundo as normas da Revista Química Nova  
Disponível no site: <https://quimicanova.sbq.org.br/>

## ARTIGO 2

### **Investigação de similaridades em extração verde dos fitoconstituintes de *Miconia albicans* de diferentes locais da Mata Atlântica do Sul da Bahia**

Allana S. de Carvalho<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal da Bahia, 45810-000 Porto Seguro -BA, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Federal do Sul da Bahia, 45810-000 Porto Seguro -BA, Brasil

### **Investigation of similarities in green extraction of phytoconstituents of *Miconia albicans* from different locations of the Atlantic Forest of Southern Bahia**

#### ABSTRACT

The Atlantic Forest (MA) biome is considered one of the planet's richest sets of plant species because it has great biological diversity. Remnants of AM found in different regions of southern Bahia are becoming more and more the focus of study in the extraction of bioactive compounds from plant species because plants with great pharmacological potential can be found in these regions. Therefore, the base plant of this study, *Miconia albicans* (Sw.) Triana collected in different regions of the South of Bahia when compared to the commercial plant demonstrated through the technique of High-Performance Liquid Chromatography (CLAE\_DAD) relevant phenolic and total flavonoid contents, where the UAN region showed higher content in the extraction of rosmarinic acid (23.33  $\mu\text{g/mL}$ ) with methanol solvent. While in the chemometric analysis of hierarchical grouping (HCA), it was verified that the commercial *M. albicans* obtained more significant similarity with the plant collected in the region of Santa Cruz Cabrália for presenting concentrations of chemical constituents very close. Therefore, further studies on *M. albicans* should be conducted in order to explore its herbal potential

Keywords: plant species, chemometric analyses, herbal medicines



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que possui uma imensa flora de enorme variedade biológica, em espécies vegetais distribuídas em diversos biomas. <sup>1,2</sup> Nesse contexto, pode-se destacar a Mata Atlântica (MA) que corresponde com cerca de 23 % e 15% , respectivamente, da riqueza da diversidade de plantas do país (IBGE, 2004).<sup>3</sup> A região Sul do estado da Bahia, Brasil é uma das áreas que concentra grande parte de diversidade de planta do bioma e muitas dessas com potencialidade fitoterápica ainda não foram investigadas e correm o risco de se perder devido a devastação dessas áreas vegetais.<sup>4</sup>

A *Miconia albicans* (Sw.) Triana pertencente ao gênero *Miconia* e família Meslasmaceae é comumente encontrada na MA.<sup>5-7</sup> A espécie caracteriza-se por ser arbórea de até 3 metros de altura é, conhecida popularmente como “canela-de-velho”, “maria-branca”, “lacre-branco”, “folha-branca”. Na medicina popular é utilizada para fins medicinais na forma de chá, com o objetivo de tratamento de diversas patologias como dores e inflamações nas articulações, bursite, artrite, artrose, infecções geniturinárias, antiofídico, prevenção de infartos, regulação do ritmo cardíaco, problemas gástricos, vitiligo e alívio de sintomas febris. <sup>8,9</sup>. Contudo, por ser bastante comum nas áreas da MA e serem muito comercializadas, torna-se pertinente a investigação do perfil fitoquímico de *M. albicans* encontradas em diferentes regiões da MA do Sul da Bahia a fim de verificar se há similaridades dos constituintes químicos de plantas encontradas na região em relação as demais plantas da mesma espécie que já são comercializadas em locais especializados. Nesse cenário, MA é considerada importante foco de estudo por possuir extensa biodiversidade, nas quais muitas famílias que vivem entorno usufruem e tiram seu sustento através da abundância de seus recursos naturais.<sup>3</sup>

Na obtenção de constituintes químicos de plantas geralmente é feito o emprego de solventes orgânicos. Nesse sentido, são realizados processos extrativos pelo uso de metanol, hexano, clorofórmio e acetona que são altamente nocivos ao meio ambiente.<sup>10</sup> E o uso dos solventes eutéticos profundos (DES) tem se tornado uma opção mais limpa e segura por possuírem características significativas, tais como baixa volatilidade, não inflamáveis, baixa toxicidade além de fácil preparo.<sup>11</sup>

Este trabalho objetivou investigar a similaridade dos constituintes químicos obtidos via extração verde de *M. albicans* coletada em diferentes municípios do Sul do estado da Bahia. A comparação considerou os perfis químicos obtidos por Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (CLAE-DAD) e composição fenólica desse material e de material botânico comercializado.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Material vegetal

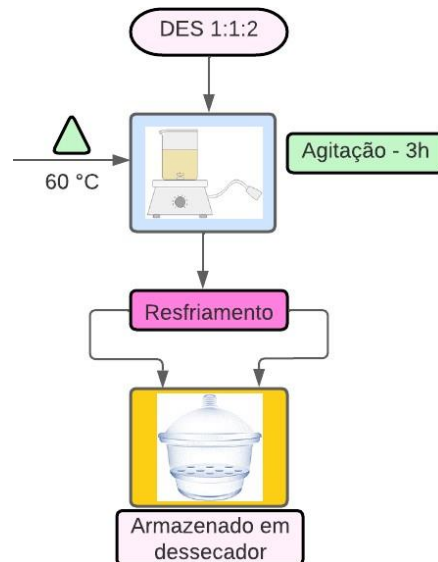
Foram adquiridas 200g de folhas secas de *M. albicans* embaladas em saco plástico com validade de 6 meses, em local de comercialização na cidade de Porto Seguro - Bahia, Brasil no mês de novembro de 2021. Enquanto que o material botânico nativo (folhas) de *M. albicans* foram coletadas em bordadura de floresta em áreas úmidas e todas estavam floridas, em diferentes fragmentos da Mata Atlântica localizados em cinco municípios do Sul do estado da Bahia, Brasil. Canavieiras – BA, Rodovia BA 001 (15°34'33.1S 38°59'31.3" W), Una (15°17'00.7"S 39°06'45.5"W), Porto Seguro – Bahia (16°48'34.6"S 39°08'46.7"W), Santa Cruz Cabrália (16°07'59.7"S 38°57'45.6"W) e Eunápolis (16°17'03.5"S 39°32'07.5"W). Posteriormente, foram identificadas a partir da comparação com exsicatas depositadas no Herbário Professor Geraldo C.P. Pinto (GCPP) da Universidade Federal do Sul da Bahia, no *Campus* Sosígenes Costa (Porto Seguro-Ba) sob o número (GCPP 1110). A Figura 1 ilustra o mapa geográfico dos locais de coleta da *M. albicans*.



**Figura 1.** Mapa de coleta da *Miconia albicans*

### 2.2 Preparo do solvente eutético

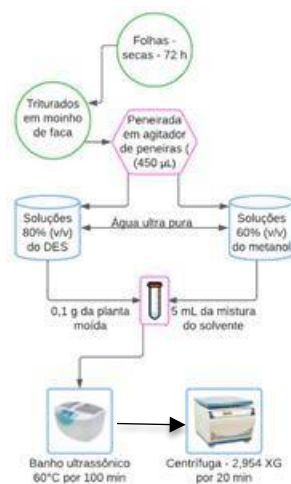
O DES foi preparado empregando uma mistura do cloreto de colina (Êxodo científica), ácido cítrico (Dinâmica) e água ultrapura 1:1:2 m/m. A mistura foi aquecida a 60°C durante 3h sob agitação constante com ajuda de um agitador magnético. Após resfriado à temperatura ambiente, o solvente foi guardado em dessecador (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Preparo do solvente eutético. Autoria própria.

### 2.3 Preparo dos extratos

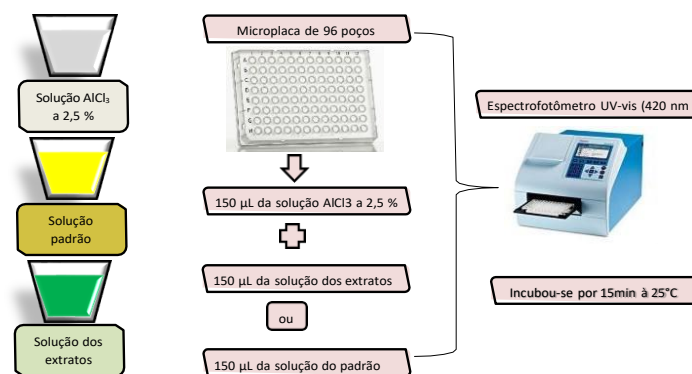
As folhas de *M. albicans* inicialmente foram secas em estufa por 72h a 40°C, em seguida triturada em moinho de facas, peneiradas em agitador de peneiras (Lucadema, modelo 04/01) a granulometria 0,450 mm. Para as extrações dos constituintes a metodologia foi adaptada de Christina Bakirtzi.<sup>12</sup> Foi preparado soluções do solvente em água ultrapura DES a 80% e metanol 60%, e foi adicionado 0,1 g das folhas moída e 5 mL de solvente. Sendo a mistura agitada manualmente e conduzida no banho ultrassônico (Cristófoli-modelo 11/2010 - 220V~0,17 kW – 0,8 A,  $f=50/60$  Hz e  $f_{\text{ultrassônica}}= 42$  kHz) a 60 °C por 100 min, logo após foram centrifugados a 2,954 XG por 20 min, como mostra o fluxograma abaixo. Em seguida os sobrenadantes foram guardados sob refrigeração para posteriores análises.



Fluxograma 1: Extração dos constituintes da *M. albicans* com o solvente eutético e convencional. Autoria própria.

## 2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi obtido por adaptações da metodologia descrita por Banov<sup>13</sup>, como representado na Fig. 2, utilizando como padrão a quercetina para elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por mL dos extratos. Foram preparadas soluções de  $\text{AlCl}_3$  a 2,5 %, solução padrão e solução dos extratos. Em seguida foram adicionados a uma placa de 96 poços 150  $\mu\text{L}$  das soluções, 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos e 150  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 2,5%, incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm.



**Figura 2:** Obtenção do conteúdo de flavonoides totais.

No procedimento, 150 $\mu\text{L}$  das soluções, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos e 150  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 2,5% (0,025g  $\text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados em microplaca de 96 poços e incubada a 25° C por 15 minutos e posteriormente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 420 nm. A quercetina foi utilizada como padrão na elaboração da curva de calibração e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por mL dos extratos.

## 2.5 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos foi empregado o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, adaptado de Mathew e Subramanian<sup>14</sup>. Em resumo, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  dos extratos, 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, 20  $\mu\text{L}$  do *Folin-Ciocalteu* e 60  $\mu\text{L}$  carbonato de sódio a 8,5% à microplaca de 96 poços posteriormente a placa foi incubada por 1h a 45°C e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific Multiskan Go) a 760 nm. Utilizou-se o ácido gálico como padrão para elaboração da curva de calibração e os

valores totais do conteúdo fenólico foram expressos  $\mu\text{g}$  Equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

## 2.6 Preparo das amostras para análise em CLAE-DAD

Para a extração em fase sólida utilizou-se cartuchos C18 Strata Phenomenex® anteriormente condicionados, na eluição de 10 mL dos extratos MeOH, água, extrato (6:2:2 v/v/v) o eluato foi coletado em tubo de ensaio de 15 mL, filtrados por membranas GxF/PVDF 0,2  $\mu\text{m}$  e manipulados no injetor cromatográfico com a ajuda de microseringa com capacidade para 200  $\mu\text{L}$ .

## 2.7 Identificação dos perfis químicos em CLAE-DAD

A identificação dos constituintes químicos dos extratos foi feita através do sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) Shimadzu). Para as condições de separação foi utilizado sistema de gradiente contendo dois solventes como fase móvel solvente B (ácido acético 2%) e C (acetonitrila), conforme Tabela 1 e a pressão foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  das amostras e as análises foram realizadas em triplicata (n=3).

Tabela 1. Gradiente empregado na análise CLAE-DAD

TEMPO (min)	B%	C%
0,05-5	85	15
5,01-20	70	30
20,01-35	50	50
35,01-45	60	40
45,01-65	15	85
65,01-72	0	100

B= ácido acético 2%; C= acetonitrila

O reconhecimento dos compostos fenólicos foi feito conforme sua ordem de eluição, comparando o seu tempo de retenção com os padrões empregados (ácido cafeico, ácido trans-felúrico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico), no comprimento de onda de 254 nm.

## 2.7 Análises estatísticas

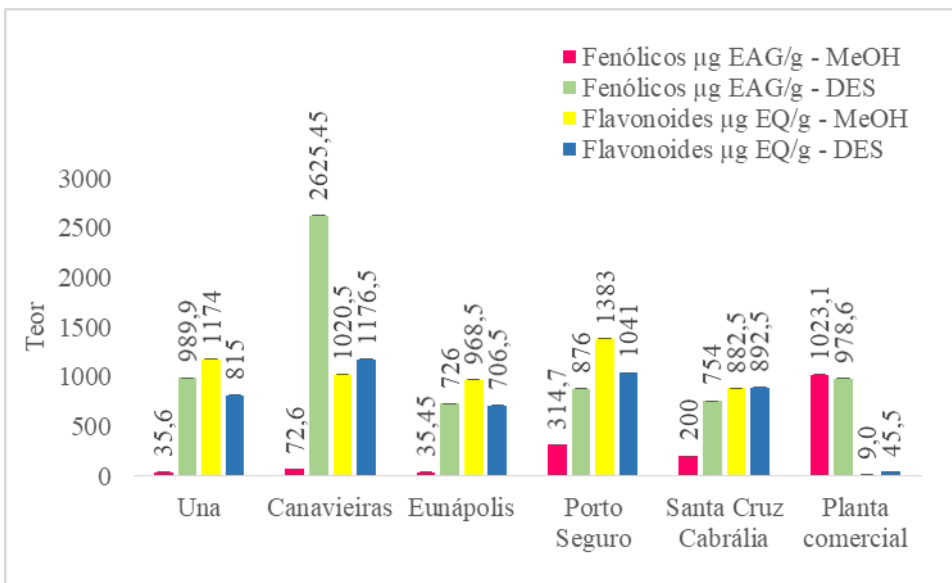
Os resultados apresentados neste estudo representam a média de três repetições (n=3)  $\pm$  desvio padrão (DP) da média. Foram analisados estatisticamente diferentes resultados para

as variáveis atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides totais, comparando os resultados do índice de confiança com o valor fixado do t-Student (2,14), com nível de confiança 95% utilizando o programa Microsoft Excel. As médias foram comparadas por análise de variância ANOVA e teste de Turkey ( $p < 0,05$ ). A partir dos dados obtidos no HPLC, foram realizados a plotagem dos gráficos, com o auxílio do software Origin 2022. Os espectros foram submetidos à análise multivariada para verificar a similaridades nas diferentes amostras, aplicando o PCA e HCA, com o auxílio do software Statistica 2022.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teores de fenólicos e flavonoides totais

O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais nos extratos de *M. albicans* são expressos na Fig. 3. Os conteúdos apresentaram variação entre os espécimes coletados em diferentes localidades em comparação com o material botânico comercializado usando diferentes extratores, mostrando diversidade na composição química dos constituintes de *M. albicans*.



**Figura 3:** Teores de fenólicos e flavonoides totais de diferentes regiões do Sul da Bahia e planta comercial. Metanol (MeOH) e (DES – cloreto de colina/ácido cítrico/água).

Neste estudo, foi possível visualizar que todos os fragmentos da MA investigados nos diferentes municípios do Sul do estado da Bahia, obtiveram conteúdo de compostos fenólicos de *M. Albicans* usando diferentes extratores. Pieroni et al (2011),<sup>15</sup> observaram um valor de compostos fenólicos superior ao encontrado neste trabalho correspondendo a  $70,04 \pm 0,12$  mg GA/g ( $70040 \mu\text{g EAG/g}$ ) de extrato seco, presentes no extrato metanólico de *M. albicans*, o que poderia ter influenciado nessas variações observadas seria as condições

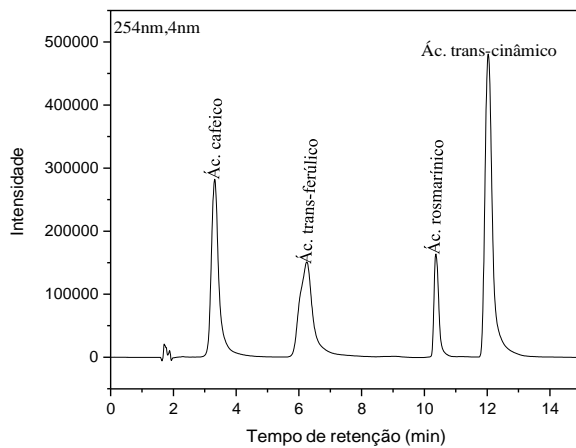
climatológicas, origem geográfica, época de coleta das folhas e dissimilaridades nas características do solo.<sup>16</sup>

Desse modo, o emprego de solventes DES em substituição aos solventes convencionais como uma opção mais limpa e segura na extração de constituintes químicos de *M. albicans* mostrou ser promissor na extração de fenólicos e flavonoides tanto na extração com a planta nativa de diferentes regiões que variaram de 726-2625,45 µg EAG/g (fenólicos) e 706,5-1176,5 µg EQ/g (flavonoides) quanto para a planta comercializada 978,6 µg EAG/g (fenólicos) e 45,5 µg EQ/g (flavonoides). Ao comparar as extrações, observa-se que a planta nativa obteve maiores conteúdos de fenólicos e flavonoides, essas variações podem estar associadas ao fato da planta comercial sofrer diversos processos que vai desde a sazonalidade da colheita do material vegetal, coleta e secagem da planta.

Estudos realizados por Alsaud 2021, demonstraram que a extração de constituintes químicos de espécies vegetais utilizando DES podem estar relacionada com as características dos DES proposto tal como, a natureza dos seus constituintes. E que as propriedades físico-químicas como polaridade, viscosidade e solubilização dos compostos fenólicos exibem um papel importante na eficácia de extração de componentes bioativos de plantas.<sup>18</sup>

### 3.2 Análise por CLAE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas a partir da seletividade dos padrões ácido cafeico, ácido trans-ferúlico, ácido rosmarínico e ácido trans-cinâmico (Fig. 4).



**Figura 4:** Cromatograma dos padrões ácido cafeico ( $t_R$  3,310 min), ácido trans-ferúlico ( $t_R$  6,255 min), ácido rosmarínico ( $t_R$  10,386 min) e ácido trans cinâmico ( $t_R$  12,041 min)

Para avaliação da linearidade foi usado o coeficiente de determinação  $R^2$  adquirido a partir da curva de calibração produzida com 5 níveis de concentrações, variando (15,56-260,0 µg mL<sup>-1</sup>). Através dos dados obtidos pela curva de calibração foi possível calcular os

limites de detecção e quantificação para cada ácido Tab. 2. Os valores alcançados para linearidade estão de acordo com o valor mínimo estipulado pela RE n° 899: 0,9900.<sup>19</sup>

**Tabela 2.** Limites de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), Equação da Reta (ER), Regressão linear (R<sup>2</sup>), Tempo de retenção (t<sub>R</sub>), Desvio padrão (DP), Desvio padrão relativo (DPR), Índice de confiança (IC) por CLAE-DAD.

Analito	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>a</sup>	ER	R <sup>2</sup>	t <sub>R</sub> min <sup>b</sup> ±DP	DPR (%)	IC
Ác. cafeico	0,013	0,040	y=4837,1x + 34727	0,997	3,18±0,25	7,81	0,12
Ác. ferúlico	0,010	0,310	y=4876,1x + 15144	0,996	6,29±0,36	5,7	0,18
Ác. rosmarínico	0,020	0,620	y=1890x + 836,03	0,994	10,42±0,13	1,25	0,06
Ác. Trans-cinâmico	0,006	0,019	y=6933,7 + 46857	0,999	12,13±0,08	0,63	0,04

<sup>a</sup> Os valores são expressos em µg mL<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> O tempo é expresso em minuto.

A tabela 3 corresponde a concentração de ácidos fenólicos encontrados em *M. albicans* nas diferentes regiões do Sul da Bahia e planta comercial

**Tabela 3.** Concentração de ácidos fenólicos em *M. albicans* dos diferentes municípios localizados no Sul da Bahia e material botânico comercial.

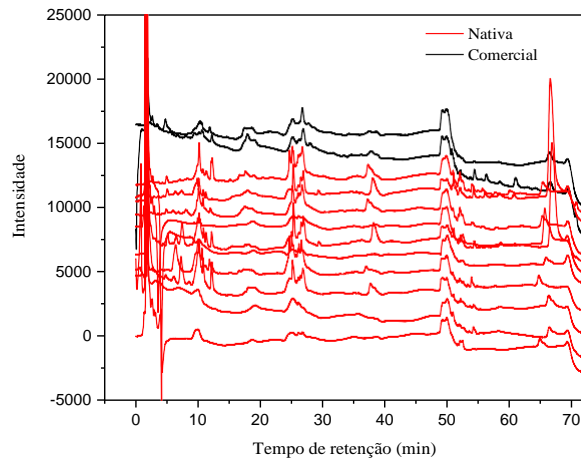
Concentração (µg/mL de extrato)					
Região	Extrato	Ác. Cafeico	Ác. trans-ferúlico	Ác. Rosmarínico	Ác. trans-cinâmico
Porto Seguro	1	ND	ND	2,54±0,56	ND
	2	ND	ND	ND	ND
Eunápolis	1	ND	ND	2,15±1,20	ND
	2	ND	4,69±8,13	ND	ND
Santa Cruz	1	ND	1,31±1,34	3,35±4,14	ND
Cabrália	2	ND	ND	ND	ND
Canavieiras	1	ND	ND	2,83±0,34	ND
	2	ND	ND	<LQ	ND
Una	1	ND	ND	23,33±2,59	ND
	2	ND	ND	3,05±0,43	ND
Planta comercial	1	ND	ND	0,93±1,09	ND
	2	ND	ND	0,91±1,36	ND

ND (não detectável); Desvio padrão calculado com n=3; <LQ (detectável, mas não quantificável); metanol – MeOH (1) e eutético DES (2).

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que todos os municípios investigados inclusive material botânico comercial demonstraram presença do ácido rosmarínico utilizando extratores diferentes, enquanto o município de Santa Cruz Cabrália apresentou também a presença do ácido trans-ferúlico. Em contrapartida os ácidos cafeico e trans-cinâmico não foram detectados em nenhum dos locais investigados, nem no material botânico comercializado. Contudo, constatou-se que os perfis cromatográficos dos extratos



do material botânico nativo encontrados são semelhantes aos extratos comercialmente adquiridos, indicando se tratar da mesma planta, como mostra a Fig. 5.

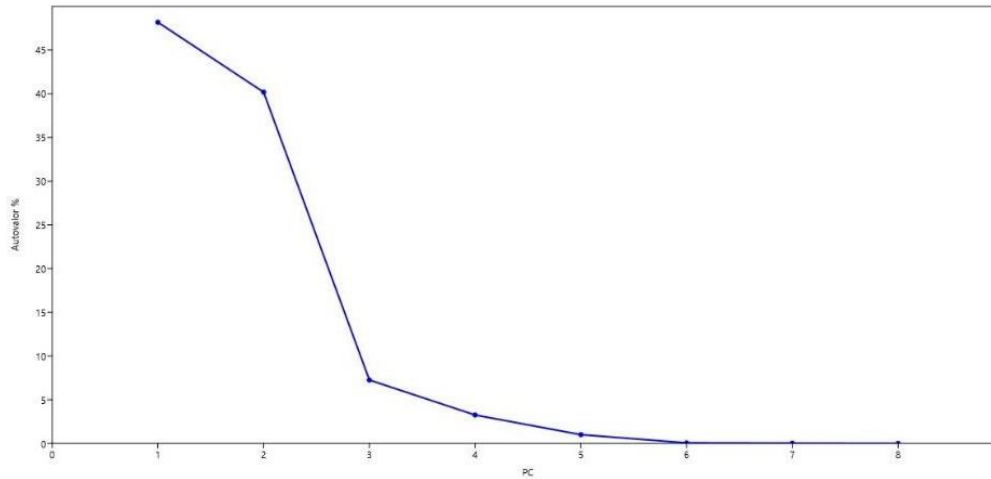


**Figura 5.** Semelhanças entre os perfis cromatográficos do material botânico comercializado e nativo.

As variações observadas nas concentrações dos ácidos fenólicos podem estar relacionado a diversos fatores, como relação da planta com o meio externo, clima, colheita da planta entre outros.<sup>16</sup> Outro aspecto importante é que a presença desses ácidos fenólicos em plantas estão associados a atividades antioxidante, antiviral, antimicrobiana e anti-inflamatória.<sup>20</sup> Estudo realizado por Tomé et al (2019),<sup>8</sup> demonstraram atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de *M. albicans* contra *L. innocua*, da fração acetato de etila contra *B. cereus*, cepas de *L. innocua*, *L. monocytogenes* e fração hexano frente *L. Monocytogenes*. Neste estudo, foi demonstrado semelhanças na extração do ácido rosmarínico tanto para as plantas coletadas em diferentes regiões quanto para a planta comercial, estudos descritos na literatura mostram uma imensidade de atividades biológicas para este ácido como anti-inflamatórias, antimutagênica, antibacteriana, antiviral e antioxidante, substâncias essas responsáveis pelo efeito protetor de diversas patologias.<sup>20</sup> Portanto os resultados apresentados corroboram que a *M. albicans* é uma espécie promissora na investigação de compostos biologicamente ativos.

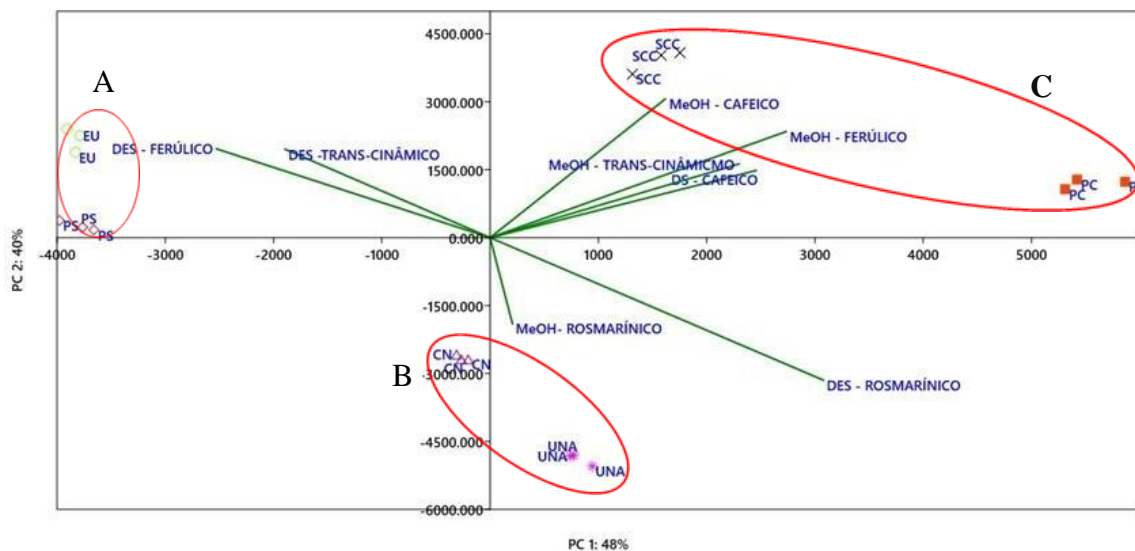
Objetivando a comparação dos perfis químicos dos extratos preparados por diferentes extratores foi utilizado técnicas de análise multivariáveis para agrupar dados a partir da extração dos constituintes ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico de *M. albicans* comercializada e coletadas em diferentes regiões do Sul da Bahia. Dessa forma, os dados cromatográficos foram utilizados como ferramentas para as análises quimiométricas como PCA e HCA para diferenciar os compostos bioativos investigados, mesmo estes não sendo quantificados.<sup>21</sup>

Com base nisso, um gráfico de cotovelo (*screen plot*) (Fig. 6) foi plotado indicando dois componentes principais (PCs) PC1 e PC2, onde o PC1 e PC2 descreve 88% das variâncias obtidas.



**Figura 6** - Gráfico de cotovelo, obtido através dos dados gerados por HPLC.

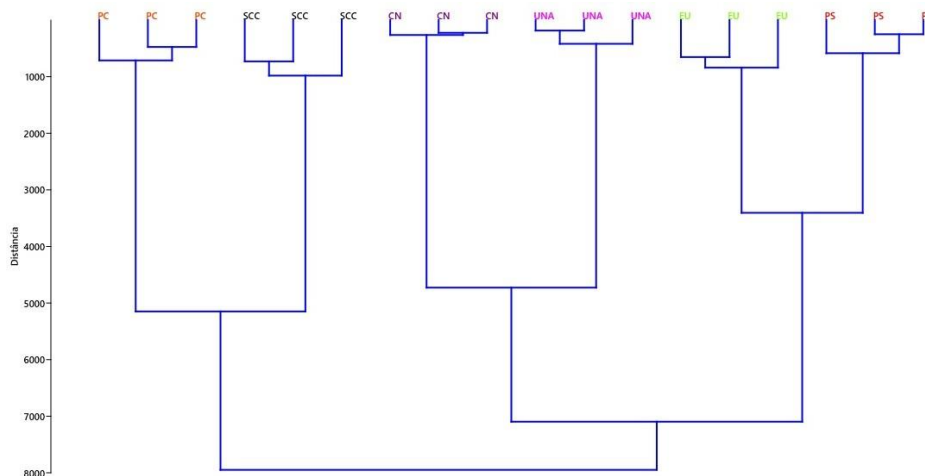
A partir dos valores encontrados de PC1 e PC2 (PC1 48% e PC2 40%) foi obtido gráfico de *score* (Fig. 7), que evidencia o agrupamento das amostras com a formação de três grupos (A, B e C) por grau de similaridade de acordo com suas composições químicas, acentuando também as diferenciações entre elas. No Grupo A composto por: Porto Seguro e Eunápolis, Grupo B composto por Una e Canavieiras, e o Grupo C composto por planta comercial e Santa Cruz Cabrália.



**Figura 7.** Gráfico de scores (PC1 x PC2). DES – solvente eutético, MeOH – metanol, CN – Canavieiras, EU – Eunápolis, PS – Porto Seguro, SCC - Santa Cruz Cabrália, UNA – Una e PC – Planta comercial.

E entre as oito variáveis utilizadas (DES – ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico) e MeOH (ácidos cafeico, trans-ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico) responsáveis pelo agrupamento das amostras foi verificado que os compostos químicos responsáveis por discriminar o grupo A foram os ácidos trans-ferúlico e trans-cinâmico extraído em maior proporção pelo DES, enquanto que no grupo B o ácido com maior teor de extração foi o rosmarínico pelos solventes metanol e DES, já o grupo C obteve maior diferenciação dos compostos bioativos investigados, ácidos cafeico, trans-ferúlico pelo solvente metanol e trans-cinâmico pelo solvente DES.

Ademais, as análises pela utilização das áreas geradas por CLAE apontam que a planta comercial se assemelha à planta coletada em Santa Cruz Cabrália, ambas possuindo os mesmos compostos bioativos extraídos diferenciando apenas na concentração. Por fim, com a análise de agrupamento hierárquico (HCA) (Fig. 8) foi possível confirmar quais das amostras tiveram maior grau de similaridade com a amostra comercial, que foi SSC, complementando a informação mostrada no gráfico de *scores*. Assim, o dendrograma de análise de agrupamento hierárquico aponta a formação de dois grupos principais (PC e SCC) e um subgrupo dividido entre (CN e UNA; EU e PS).



**Figura 8** - Análises de agrupamento hierárquico. PC – Planta comercial, SCC – Santa Cruz Cabrália, CN – Canavieiras, UNA – Una, EU – Eunápolis e PS – Porto Seguro

Toda via, verifica-se que não existem distâncias discrepantes entre os grupos formados, nota-se que CN e UNA se parece um pouco mais com EU e PS, que por sua vez se assemelha à planta comercial. Contudo, as diferenças encontradas nas análises podem estar diretamente associadas ao local de extração das plantas investigadas, pois, variáveis como estação do ano, ambiente, nutrientes presentes no solo e concentração de metabólitos secundários presentes na planta são responsáveis por diferenciar plantas de mesma espécie.<sup>16</sup>

### 3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que os constituintes químicos presentes em *M. albicans* coletadas em fragmentos da Mata Atlântica localizados em diferentes municípios do sul da Bahia em comparação com o material botânico comercializado, demonstraram que as concentrações dos constituintes variaram entre os diferentes municípios a depender dos solventes utilizados na extração. Contudo, utilizando as análises multivariáveis PCA e HCA foi possível concluir que o município de Santa Cruz Cabrália apresentou maior similaridade dos constituintes químicos com o material botânico comercial. Devido a isso, as diferenças encontradas nas concentrações de *M. albicans* em diferentes municípios do Sul da Bahia pode estar associada a diferentes variáveis de cultivo da planta, como clima, tipo de solo, relação da planta com o meio externo entre outros. Diante disso, por apresentar uma vasta diversidade biológica, a Mata Atlântica consiste em uma área de enorme relevância para a bioprospecção de constituintes químicos de espécies vegetais onde podem ser descobertas plantas com imensa potencialidade farmacológica.

### 4. REFERÊNCIAS

1. Sousa, M. de; Silva, C. M. R.; Vieira-Jr, G. H. M.; Ayres, M. C. C.; Charlylton, L. da C. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. D. C.; Barros, E. S. D.; Araújo, P. M. B. de; Chaves, B. M. H. M. S.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.
2. Araújo, S. G.; *Perspectivas e desafios para o desenvolvimento de fitoterápicos com plantas medicinais da Mata Atlântica para uso veterinário*, Fundação Oswaldo Cruz, 2013
3. SOS Mata Atlântica; *Disponível em <<https://www.sosma.org.br/>>. Acessado 28 abril 2023*
4. Iglesias, D. T.; Fonseca, R. S.; **2022**, 1.
5. Rodrigues, K. F.; Bitencourt, T. C.; Núñez, J. G.; Garcia, H. O.; Buhl, B.; Padilha, G. L.; Ethur, E. M.; Hoehne, L.; Bruno, A. N.; Freitas, E. M.; *Brazilian J. Biol.* **2022**, *84*, 1. [<https://doi.org/10.1590/1519-6984.255529>] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35239788>
6. Souza, L. S.; Lima, L. da S.; Hackenhaar, D. S. M.; *Estudo de espécies vegetais bioativas da Mata Atlântica do sul da Bahia*, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, 2020

7. Lima, T. C.; Matos, S. S.; Carvalho, T. F.; Silveira-Filho, A. J.; Couto, L. P. S. M.; Quintans-Júnior, L. J.; Quintans, J. S. S.; Silva, A. M. O.; Heimfarth, L.; Passos, F. R. S.; Gandhi, S. R.; Lima, B. S.; Silva, F. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *259*, [https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32387231
8. Tomé, L. U.; Ferreira, H. D.; Alves, V. F.; Oliveira, L. G. de; Borges, L. L.; Sá, S. de; Paula, J. R. de; Fiuza, T. de S.; *Front. J. Soc. Technol. Environ. Sci.* **2019**, *8*, 372.  
[https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i2.p372-391]
9. Corrêa, J. G. de S.; Bianchin, M.; Lopes, A. P.; Silva, E.; Ames, F. Q.; Pomini, A. M.; Carpes, S. T.; de Carvalho Rinaldi, J.; Cabral Melo, R.; Kioshima, E. S.; Bersani-Amado, C. A.; Pilau, E. J.; de Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Visentainer, J. V.; Santin, S. M. d. O.; *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *273*, [https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113979]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33647428
10. Dheyab, A. S.; Bakar, M. F. A.; Alomar, M.; Sabran, S. F.; Hanafi, A. F. M.; Mohamad, A.; *Separations* **2021**, *8*, [https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS8100176]
11. Li, N.; Wang, Y.; Xu, K.; Huang, Y.; Wen, Q.; Ding, X.; *Talanta* **2016**, *152*, 23.  
[https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.042]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26992491
12. Bakirtzi, C.; Triantafyllidou, K.; Makris, D. P.; *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2016**, *3*, 120. [https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003]
13. Banov, D.; Rolim Baby, A.; Martins, L.; Bosco, D.; Kaneko, T. M.; Valéria, M.; Velasco, R.; *Acta Farm. Bonaer.* **2006**, *25*, 219.
14. 1. Mathew, M.; Subramanian, S.; *PLoS One* **2014**, *9*, [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086804]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466247
15. Pieroni, L. G.; De Rezende, F. M.; Ximenes, V. F.; Dokkedal, A. L.; *Molecules* **2011**, *16*, 9439. [https://doi.org/10.3390/molecules16119439]  
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075573
16. Berhow, M. A.; Affum, A. O.; Gyan, B. A.; *J. Med. Food* **2012**, *15*, 611.  
[https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0278] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22663161
17. Hamann, B.; Winter, E. M. dos S.; Silbert, D. A.; Micke, G. A.; Vitali, L.; Tenfen, A.;

Zimmermann, L. A.; *Rev. Fitos* **2020**, *14*, 450. [<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2020.1055>]

18. Alsaud, N.; Shahbaz, K.; Farid, M.; *J. Mol. Liq.* **2021**, *337*, [<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116385>]

19. ANVISA; (2003)

20. Petersen, M.; Simmonds, M. S. J.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 121.

[[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482446>

21. Barbosa, N.; Santos, L.; Seguchi, L.; Silva, B.; Carvalho, T.; Wanderley, E.; Gimenes, R.; Soares, M.; Araujo, A.; Silva, F.; Almeida, M.; Silva, M.; *Quim. Nova* **2022**, *45*, 994. [<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170914>]

## CONCLUSÃO GERAL

No primeiro artigo, pode-se perceber que a espécie *M. albicans* apresentou variados teores de fenólicos e flavonoides totais pela extração de solventes eutéticos (DES) e convencionais. A substituição de solventes convencionais por DES vem se tornando uma opção mais limpa e segura, pois estes apresentam propriedades específicas como boa biocompatibilidade, não são reativos além de serem biodegradáveis. Na atividade antioxidante, a *M. albicans*, exibiu variações nos valores de índice de atividade antioxidante (IAA) como intensa e forte atividade para a extração com solventes convencionais e moderada e baixa atividade com DES. Além disso, foi possível identificar através da análise em CLAE-DAD, os ácidos cafeico, ferúlico, rosmarínico e trans-cinâmico com os extratores metanol e DES, porém foi possível quantificar somente o ácido rosmarínico. Entretanto, novos estudos devem ser realizados utilizando outros ácidos fenólicos a fim de quantificar e identificar componentes na planta *M. albicans*.

No segundo artigo, foi possível perceber que todos os fragmentos da Mata Atlântica investigados em diferentes municípios do Sul da Bahia exibiram conteúdo de fenólicos e flavonoides totais de *M. albicans*, porém o município de Canavieiras mostrou maior concentração (2625,45 µg EAG/g) de fenólicos extraídos com solvente DES, enquanto o município de Porto Seguro mostrou maior extração no teor de flavonoides (1383 µg EQ/g) com extrator metanol. No entanto, foi possível concluir também através das técnicas quimiométricas PCA e HCA que o material botânico comercializado neste estudo obteve

maior grau de similaridade de constituintes químicos com a planta coletada no município de Santa Cruz Cabrália. Portanto são notórias a importância e a necessidade da descoberta de novos compostos fenólicos oriundos de espécies vegetais que possam contribuir de forma significativa para o bem-estar da saúde humana no combate a diversas patologias como câncer e doenças neurodegenerativas.