

Métodos de Extração de Compostos Fenólicos das Folhas de *Corchorus olitorius*

Juliana Gonçalves de Oliveira¹, Karina Chimanski Coradeli¹, Cássia Regina Bruno Nascimento² e Milena Karina Giani³.

1. Estudante de Nutrição do Centro Universitário Uniamérica.
2. Professora Doutora em Nutrição (UEL) do Centro Universitário Uniamérica (Orientador do trabalho).
3. Mentora do trabalho. Professora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Uniamérica.
julianagodefoz@gmail.com e karinachimanski@gmail.com

Palavras-Chave

Alimento funcional
Antioxidantes
Citotoxicidade
Compostos fenólicos
DPPH
Fitoterápico

Resumo: *Corchorus olitorius* é uma planta alimentícia não convencional (PANC) conhecida popularmente como *jute nalta*, *jute tossa*, *moroheiya*, *mishti paat* e *malokhi-eh*. A folha e a semente de *Corchorus olitorius* vem sendo pesquisadas como potencial fármaco para o tratamento de diabetes melito tipo 2 e suas complicações. O objetivo deste trabalho é identificar e comparar os métodos de extração para os compostos fenólicos de *Corchorus olitorius* já testados em trabalhos de pesquisa. Dentre os reveladores analisados estão, acetato de potássio, água, cloreto de alumínio, etanol, éter dietílico, metanol, butanol, hexano. Devido os fenóis existentes no *Corchorus olitorius* ser de forma polar, faz-se necessário uma extração preferível em água e metanol, onde, para futura pratica é necessária preparação de extrato hidrofílico como o realizado pela metodologia de Oboh (2009). As folhas deverão ser lavadas em água destilada, levadas ao sol e moídas. O extrato aquoso da folha deve ser preparado embebendo o vegetal em água por cerca de 24 h e a mistura filtrada. O filtrado deve ser evaporado sob pressão negativa a 408 °C. O extrato poderá ser armazenado no refrigerador para posterior análise com rendimento calculado em 16,6%.

Artigo recebido em: 07.03.19

Aprovado para publicação em: 24.05.19

INTRODUÇÃO

Corchorus olitorius L. (Tiliaceae), conhecido em inglês como *jute Nalta* ou *jute Tossa*, é amplamente cultivado em Bangladesh, por sua fibra e por suas folhas comestíveis, e é conhecida como "mishti paat". A planta também é considerada como tendo valores etnomedicinais. Glicosídeos de cardolídeos foram relatados a partir de sementes da planta (NAKAMURA, 1998).

As folhas jovens de *Corchorus olitorius* são comestíveis e usadas como legume para sopa no Egito. Nos últimos anos, esta planta tem tido um importante reconhecimento como um vegetal nutritivo rico em K, Ca, P, Fe, ácido ascórbico e caroteno, entre outras vitaminas e minerais. No Japão é conhecida e cultivada sob o nome "moroheiya" (AZUMA, 1999).

No Brasil, com destaque na Amazônia, a história da cultura de *Corchorus Olitorius*, popularmente conhecida como Jute, está intrinsecamente ligada a processos que envolvem a Índia e o Japão. O colono Ryota Oyama foi o responsável pela adaptação da jute nas várzeas amazônicas na década de 1930 (WRIGHT, 2012).

No método de Azuma, et al (1999), os compostos fenólicos foram extraídos suspendendo 20 mg da amostra em 2 ml de MeOH a 70% durante 24 h à temperatura ambiente com agitação vigorosa ocasional. Os resultados obtidos mostraram que o ácido 5-cafeoilquínico foi um antioxidante fenólico predominante nas folhas de *Corchorus olitorius*.

No método de Oboh (2009), o total de composto fenólico extraível em água de folha de *Corchorus olitorius* é significativamente maior do que o composto fenólico total extraível com hexano, isso indica claramente que a maioria dos fenóis existentes na planta existe em uma forma polar.

Em Li Wang 2011, os compostos polifenólicos das folhas foram extraídos por suspensão do pó seco em solução aquosa de etanol a 60% (v/v) e analisados por sistema de HPLC quantitativo. Os principais compostos polifenólicos no MLP incluíram 450 mg de hiperosídeo, 310 mg de quercetina 3-glicosídeo (Q3G) e 1.200mg de quercetina 3-(6-malonilglucosídeo; Q3MG)/100 g de peso seco.

Diante dos variados solventes utilizados na extração de compostos fenólicos o objetivo deste trabalho é identificar e comparar os métodos de extração para os compostos fenólicos de *Corchorus olitorius*.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de revisão bibliográfica narrativa realizado de setembro a novembro de 2018, utilizando pesquisas em bases de dados do Google Scholar, SciELO – Scientific Electronic Library Online e PubMed, nos idiomas inglês e português, abrangendo artigos publicados entre 1998 a 2012 utilizados na introdução com caráter histórico, e artigos entre 1999 a 2014 para o serem discutidos. Foram excluídos artigos de *Corchorus olitorius* que não apresentavam métodos de extração.

RESULTADOS

MÉTODO DE AZUMA (1999)

Folhas de *Corchorus olitorius* (50 g de peso fresco) foram liofilizadas e pulverizadas num moinho de amostras. Os compostos fenólicos foram extraídos suspendendo 20 mg da amostra em 2ml de MeOH a 70% durante 24 h à temperatura ambiente com agitação vigorosa ocasional. Após centrifugação a 9000 rpm por 1 min, a extração foi repetida mais uma vez. Cada sobrenadante foi combinado, filtrado através de um filtro (45µm) e completado até 10 ml com 70% de MeOH. Os compostos fenólicos do extrato foram analisados por HPLC monitorizando UV a 300nm utilizando as seguintes condições: coluna, Capcell Pak C18 UG120 (4,6mmLx250mm, Shiseido); solvente, 0-5 min, MeOH/H₂O/AcOH (25:70:5), 5-40 min, gradiente linear de MeOH/H₂O/AcOH (25:70:5) - MeOH; caudal 1,0mL/min; temperatura da coluna, 40 °C (AZUMA, 1999).

Identificação de compostos fenólicos. Cinco compostos antioxidantes fenólicos 1-5 foram obtidos da fração ácida n-BuOH do extrato MeOH das folhas de *Corchorus olitorius*. A fração de HPLC do composto 5 foi hidrolisada com 1% de HCl em MeOH e analisada por HPLC, e a quercetina 3-galactodide foi detectada como um composto menor (12%) assim como a quercetina 3-glucoside (88%) (dados não mostrados). Isto sugere a ocorrência de acil quercetina 3-galactósido (s) na fração. Não foi possível encontrar sinais de prótons de grupos axila além do grupo malonila. Entre os sinais de prótons de açúcar, apenas os sinais de metileno foram transferidos para campo baixo. Portanto, o derivado de galactosídeo quercetina pode ser acilado pelo ácido malônico em 6-H do galactósido. (AZUMA, 1999).

A atividade antioxidante foi testada usando um sistema de ácido linoleico. Cada amostra, dissolvida em 0,2 ml de água destilada, 0,5 ml de tampão fosfato e 0,2 M (pH 7,0), foi misturada com 2,5% (p/v) de ácido linoleico em etanol 0,5 ml. A peroxidação lipídica foi iniciada pela adição de 50 de dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidinopropano) 0,1 M (AAPH) e realizado a 37 °C durante 5 horas no escuro. O grau de oxidação foi

medido de acordo com o método do tiocianato, para a medição de peróxidos pela leitura da absorbância a 500nm após coloração com FeCl_3 (cloreto de ferro) e tiocianato de amônio. A purificação dos compostos antioxidantes foi feita com a orientação da atividade antioxidante (AZUMA, 1999).

Isolamento de antioxidante. Folhas de *Corchorus olitorius* (300 g de peso fresco) foram extraídas com MeOH e concentradas a fase aquosa in vácuo. O resíduo aquoso foi ajustado a pH 2 e dividido com n-BuOH. A fração n-BuOH foi particionada com tampão carbonato 20 mM (pH 9,5). A fração tampão foi ajustada para pH 2 e extraída com n-BuOH novamente. A fração ácida de n-BuOH foi submetida a uma coluna de sílica gel e eluída 10% por etapas com MeOH em EtOAc. As frações eluídas com 0 e 10% MeOH em EtOAc foram passadas através de um cartucho ODS Sep-Pak (Waters) e depois purificadas por ODS-HPLC utilizando as seguintes condições: coluna Develosil ODS-5 (10mmLx150mm, Nomura Chemicals); solvente, 0-5min, MeOH/H₂O/AcOH (25:70:5), 5-40 min, gradiente linear de MeOH /H₂O/AcOH (25:70:5) MeOH; caudal 3,0mL/min; temperatura da coluna, 40; detecção UV, 254 e 300nm. (AZUMA, 1999).

Folhas de *Corchorus olitorius* foram homogeneizadas em 9 vezes o volume de ácido metafosfórico a 5% e centrifugadas a 9000 g por 10 min. O ácido ascórbico nos extratos foi analisado por HPLC sob as seguintes condições: coluna, Shim-pack SCR-102H (8 mm L x 300 mm, Shimadzu); solvente, ácido perclórico 2 mM; caudal 1,0 mL/min; temperatura da coluna, 40 ° C. Para uma detecção mais seletiva de ácido ascórbico (forma reduzida, AsA) e ácido dehidroascórbico (DHAA). O teor de ácido ascórbico foi descrito como a quantidade total de AsA e DHAA, detectada pela absorbância a 300 nm. O teor de R-tocoferol das folhas de *Corchorus olitorius* foi determinado por HPLC (AZUMA, 1999).

MÉTODO DE OBOH (2009)

Preparação de extrato hidrofílico: Folhas de *Corchorus olitorius* foram lavadas em água destilada, levadas ao sol e moídas. O extrato aquoso da folha foi preparado embebendo o vegetal em água por cerca de 24 h; a mistura foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão negativa a 408 °C. O extrato foi armazenado no refrigerador para posterior análise e o rendimento foi calculado em 16,6% (OBOH, 2009).

Preparação de extrato lipofílico: 5 g das folhas de *Corchorus olitorius* moídas foram extraídas com cerca de 200 megahexano usando o extrator Soxhlet. O extrato obtido foi evaporado sob pressão negativa a 408 °C. O extrato foi armazenado no refrigerador para posterior análise e o rendimento foi calculado em 2,7% (OBOH, 2009).

Para determinar o teor de vitamina C do extrato hidrofílico foi determinado, adicionaram-se 75ml de DNPH [2 g de dinitrofenil-hidrazina, 230 mg de tiourea e 270 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de H_2SO_4 5 M) a 500ml de mistura reacional (300ml de diluição apropriada do extrato hidrofílico com 100ml de ácido tricloroacético a 13,3%) e água]. A mistura reacional foi subsequentemente incubada durante 3 h a 378° C, depois foram adicionados 0,5ml de H_2SO_4 a 65% (v/v) ao meio e a absorbância foi medida a 520nm e o teor de vitamina C da amostra foi subsequentemente calculado (OBOH, 2009).

O carotenoide total do extrato lipofílico foi determinado adicionaram-se 4 ml de éter dietílico a 2 ml de extrato lipofílico apropriadamente diluído de folha de *Corchorus olitorius* num tubo de centrífuga graduado de 15ml, este foi subsequentemente saponificado com 0,5ml de KOH saturado em água no escuro durante 30 min. Em seguida, adicionaram-se 5ml de água e centrifugou-se a 4200 rpm durante 3 min. O volume da camada de éter foi medido e a sua absorbância foi medida no espectrofotômetro a 450nm e o carotenoide total foi calculado subsequentemente (OBOH, 2009).

Na determinação do teor total de fenol as diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas com 2,5 ml de reagente de Folin Ciocalteu a 10% (v/v) e neutralizadas com 2,0ml de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura reacional foi incubada durante 40 min a 45° C e a absorbância foi medida a 765nm no espectrofotômetro. O teor total de fenol foi calculado subsequentemente (OBOH, 2009).

O teor total de flavonoides de ambos os extratos foi determinado usando 0,5ml de amostra apropriadamente diluída foram misturados com 0,5ml de metanol, 50ml de 10% AlCl_3 (cloreto de alumínio), 50ml de acetato de potássio 1 M e 1,4ml de água e deixados a incubar à temperatura ambiente durante 30 min. A absorbância da mistura reacional foi subsequentemente medida a 415nm; o teor total de flavonoides foi calculado subsequentemente. Os polifenóis não flavonoides foram tomados como a diferença entre o conteúdo total de fenol e flavonoides totais. O total de composto fenólico extraível em água de folha de *Corchorus olitorius* é significativamente maior do que o composto fenólico total extraível com hexano, isso indica claramente que a maioria dos fenóis existentes na planta existe em uma forma polar (OBOH, 2009).

As pesquisas de OBOH et al (2009) revelaram o total de composto fenólico extraível em água (630,8 mg/100 g) de folha de *Corchorus olitorius* é significativamente maior (PB0,05) do que o composto fenólico total extraível com hexano (99,9 mg /100 g); isso indica claramente que a maioria dos fenóis existentes na planta existe em uma forma polar. Os teores de compostos fenólicos hidrofílicos e lipofílicos foram maiores que os teores de ácido ascórbico e carotenoides totais, e isso revela claramente que o composto fenólico é o antioxidante mais abundante na planta. Além disso, maiores proporções dos compostos fenólicos extraíveis em água são os não flavonoides (63,9%), enquanto 36,1% são flavonoides; inversamente, 54,1% do composto fenólico lipofílico são flavonoides, enquanto o restante não é flavonoide (45,9%).

MÉTODO DE LI WANG (2011)

Os compostos polifenólicos das folhas foram extraídos por suspensão do pó seco em solução aquosa de etanol a 60% (v/v) e analisados por sistema de HPLC quantitativo. Os principais compostos polifenólicos no MLP incluíram 450 mg de hiperosídeo, 310 mg de quercetina 3-glicosídeo (Q3G) e 1.200mg de quercetina 3- (6-malonilglucosídeo; Q3MG)/100 g de peso seco.

Em um estudo realizado por Guindani (2014), com o objetivo de avaliar as melhores condições de extração de compostos fenólicos das flores de *Hibiscus sabdariffa* com teor analisado por método espectrofotométrico de Folin-ciocalteu, a partir de diferentes condições de extração observou-se uma melhor resposta com o método 100% e metanol/água 70/30 para antocianinas. A melhor condição de extração de compostos fenólicos foi para o metanol 100%, porém estatisticamente não há diferença significativa na concentração dos compostos fenólicos se for utilizado 90/10 ou 70/30 de metanol/água. O que permite utilizar esse solvente para extrair compostos fenólicos com possível aplicação na área alimentícia ou farmacêutica. Através dos solventes com características mais polares como o metanol, obtém-se mais eficiência de extração, por outro lado, solventes com características mais apolares como o etanol em 100% mostrou-se menos eficiente. Tendo em vista que tanto *Hibiscus sabdariffa* quanto *Corchorus Olitorius* possuem folhas e flores, podemos comparar os métodos de extração por sua semelhança.

Dentre os métodos de extração sólido-líquido mais empregados, destacam-se os convencionais de maceração, percolação e extração com Soxhlet; e os não convencionais: ultra-som, extração com fluido supercrítico e extração com líquido pressurizado (MELECCHI, 2005).

DISCUSSÃO

Azuma *et al* (1999) cultivou material vegetal do *Corchorus olitorius* no National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. No início de agosto de 1997 para isolamento de antioxidantes e 1998 para análise quantitativa, quando as plantas tinham 1,5 m de altura, folhas jovens ramificadas a partir do caule < 20 cm do topo foram colhidas e usadas imediatamente. Folhas de *Corchorus olitorius* (50 g de peso fresco) foram liofilizadas e pulverizadas num moinho de amostras.

Tabela 1. Conteúdo dos Compostos Antioxidantes em Folhas de *Corchorus olitorius* diante dos resultados de Azuma, 1999.

Composição	Conteúdo (mg/100 g de folha fresca)
5-caffeoylquinic acid	383.9 + - 20.4
3,5-dicaffeoylquinic acid	102.1 + - 8.3
quercetin 3-galactoside	53.3 + - 5.0
quercetin 3-glucoside	376.8 + - 2.8
quercetin 3-(6-malonylglucoside)	126.2 + - 10.4
quercetin 3-(6-malonylgalactoside)	16.7 + - 1.0
ascorbic acid	257.8 + - 14.7
α -tocopherol	14.0 + - 0.7

Oboh *et al* (2009) pesquisou amostras de folhas frescas de *Corchorus olitorius*, compradas em um mercado local, na metrópole de Akure, na Nigéria. A autenticação da folha foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Tecnologia, na Nigéria. Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico.

Tabela 2. Vitamina C, teor de carotenoides totais e fenólicos da folha de *Corchorus olitorius* (mg/100 g de peso seco) dos resultados de Oboh et al. (2009).

Fitoquímico	Aquoso	Hexano
Vitamina C	32.69 +- 3.5	Não determinado
Total de carotenoides	Não determinado	42.59 +- 4.0
Total de fenol	630.89 +- 4.4 ^a	99.99 +- 4.6B
Total flavonoide	227.89 +- 4.0A	54.09 +- 3.8B
Polifenóis não flavonoides	403.09 +- 3.0A	45.99 +- 3.5B

Os dados de OBOH et al (2009) representam a média das leituras em triplicado. Valores com a mesma letra maiúscula sobrescrita ao longo da mesma linha não são significativamente diferentes (P 0,05).

O objetivo da pesquisa de OBOH et al (2009) é identificar a caracterização das propriedades antioxidantes de extratos hidrofílico e lipofílico de folhas de *Corchorus olitorius*.

Nos estudos de Li Wang *et al* (2011) as folhas de *Corchorus olitorius* colhidas na prefeitura de Shimane, Japão, em 2006, foram liofilizadas e transformadas em pó usando um moinho vibratório de amostras (Heiko Seisakusho, Ltd). Os compostos polifenólicos das folhas foram extraídos por suspensão do pó seco em solução aquosa de etanol a 60% (v/v) e analisados por sistema de HPLC quantitativo. Os principais compostos

polifenólicos no MLP incluíram 450 mg de hiperosídeo, 310 mg de quercetina 3-glicosídeo (Q3G) e 1.200mg de quercetina3-(6-malonilglucosídeo; Q3MG)/100 g de peso seco.

O objetivo do trabalho de Li Wang foi identificar o efeito antiobesidade de compostos polifenólicos de folhas de molokheiya (*Corchorus olitorius* L.) em camundongos deficientes em receptores LL.

CONCLUSÃO

Os pesquisadores dos artigos de *Corchorus olitorius* selecionados, tinham objetivos fotoquímicos diferentes, no entanto todos vêm ao encontro com os benefícios à saúde humana. Dentre os reveladores mais utilizados estão, acetato de potássio, água, cloreto de alumínio, etanol, éter dietílico, metanol, butanol, hexano,

A melhor condição de extração de compostos fenólicos entre os estudos analisados foi para o metanol 100%, porém estatisticamente não há diferença significativa na concentração dos compostos fenólicos se for utilizado 90/10 ou 70/30 de metanol/água devido sua polaridade. Solventes com características mais polares como o metanol, obtém-se mais eficiência de extração, por outro lado, solventes com características mais apolares como o etanol em 100% mostrou-se menos eficiente. O total de composto fenólico extraível em água e metanol da folha de *Corchorus olitorius* é significativamente maior do que o composto fenólico total extraível com hexano indicando que a maioria dos fenóis existentes na planta existe em uma forma polar. Na maioria das pesquisas realizadas o método Folin-ciocalteu foi utilizado para testar o fenólico total.

Devido os fenóis existentes no *Corchorus olitorius* ser de forma polar, faz-se necessário uma extração preferível em água e metanol, onde, para futura pratica é necessária preparação de extrato hidrofílico como o realizado pela metodologia de Oboh (2009). As folhas deverão ser lavadas em água destilada, levadas ao sol e moídas. O extrato aquoso da folha deve ser preparado embebendo o vegetal em água por cerca de 24 h e a mistura filtrada. O filtrado deve ser evaporado sob pressão negativa a 408 °C. O extrato poderá ser armazenado no refrigerador para posterior análise com rendimento calculado em 16,6%.

Na determinação do teor total de fenol as diluições apropriadas dos extratos poderão ser oxidadas com 2,5ml de reagente de Folin Ciocalteau a 10% (v/v) e neutralizadas com 2,0ml de carbonato de sódio a 7,5% e a mistura reacional incubada durante 40 min a 45° C com a absorbância medida a 765nm no espectrofotômetro.

REFERÊNCIAS

- AZUMA K. *et al.* Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L. - National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. **J. Agric. Food Chem. Japao**, 1999.
- GUINDANI, M. *et al.* Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus Sabdariffa*. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2014.
- IGARASHI, O.; UEDA, T. Vitamin E (Tocopherol). In Shin Shokuhin Bunsekihou; Japanese Society for Food Science and Technology, Shin Shokuhin Bunsekihou Editorial Committee, 1996.
- LI WANG *et al.* Antiobesity effect os polyphenolic compounds from molokheiya (*Corchorus olitorius* L.) leaves in LL receptor-deficient mice. **Eur J Nutr**, 2011.
- MELECCHI M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração. **Tese de doutorado-UFRGS**, 2005.

NAKAMURA T. *et al.* Cardenolide glycosides from seeds of *Corchorus olitorius*. **Phytochemistry**, 1998.

OBOH G. *et al.* Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of Jute (*Corchorus olitorius*) leaf – **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2009.

WANG L. *et al.* Antiobesity effect of polyphenolic compounds from molokheiya (*Corchorus olitorius* L.) leaves in LDL receptor-deficient mice Eur. **J Nutr**, 2010.

WRIGHT, R. P. *et al.* New evidence for jute (*Corchorus capsularis* L.) in the Indus civilization. **Archaeological and Anthropological Sciences**, v. 4, 2012.

