



## **PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DE ALFAVACA (*OCIMUM BASILICUM* L.) POR FILTRAÇÃO COM MEMBRANA**

KRISTOPHER R. DORNELES<sup>1</sup>, WEIBER R. SILVA<sup>2</sup>, MIRIA H. M. REIS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,  
Faculdade de Engenharia Química

<sup>2</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Engenharia Química, Faculdade de  
Engenharia Química

\*e-mail: miria@ufu.br

**RESUMO** – Alfavaca é uma planta medicinal rica em polifenóis e outros bioativos. A obtenção e a purificação destes compostos podem ser realizadas por filtração com membranas. Este trabalho investigou a clarificação de um extrato de alfavaca utilizando membrana de ultrafiltração de polietersulfona de 150 kDa. Apesar da diminuição de compostos fenólicos e flavonoides na corrente do permeado, a capacidade antioxidante do extrato foi mantida. Pelo método de redução do radical estável DPPH, a corrente de permeado apresentou  $1217,72 \mu\text{MET}^{-1}$ , uma redução de apenas 7,3% em relação à alimentação. A resistência de maior influência no decaimento do fluxo foi entendida como o entupimento dos poros.

### **INTRODUÇÃO**

Alfavaca (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta arbustiva aromática, que pertence à família Lamiaceae e é encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Popularmente, a planta é utilizada em chás e infusões para alívio de sintomas gastrointestinais, gripais e espasmódicos. As espécies do gênero *Ocimum* (cerca de 65) possuem folhas e flores ricas em ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e outros bioativos, o que confere às plantas possível atividade antioxidante e outras propriedades farmacológicas (Bindes et al., 2020; Lorenzi e Matos, 2002; POWO, 2022; Vieira e Simon, 2000).

A recuperação de compostos polifenólicos é impactada pelos processos de extração, purificação e concentração. A utilização de membranas para filtrar chás, extratos e outras bebidas é recorrente na indústria, visto sua potencialidade para concentrar moléculas de interesse, como ácidos fenólicos, catequinas e carotenoides (Bindes et al., 2020; de Santana Magalhães et al., 2019).

A separação por membranas se baseia na seletividade e na permeabilidade da barreira e utiliza pressão para conduzir a separação. O método torna-se vantajoso quando se considera que a membrana pode operar em temperatura ambiente, não há necessidade de adição de compostos químicos no processo e existe a possibilidade de aumento de escala. Soma-se a isso o fato de a membrana manter características nutricionais e funcionais dos extratos filtrados (Chhaya et al., 2012; dos Santos et al., 2020; Lu et al., 2021).

Dada a utilização dos processos de separação por membranas para clarificação e purificação de sucos, chás e extratos de plantas comercialmente aceitas, cabe avaliar a aplicação destes mesmos processos de refinamento para o processamento de plantas medicinais e subutilizadas. Este estudo foca na purificação de um extrato de alfavaca com membrana de ultrafiltração, com objetivo de avaliar a clarificação do extrato e a retenção de compostos bioativos. O estudo também contribui para a compreensão da performance da filtração de extratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima

Uma amostra comercial da planta alfavaca (*Ocimum basilicum* L.) seca e triturada, de marca não especificada neste trabalho, foi obtida no comércio de Goiânia - GO em fevereiro de 2022.

### Extração

A extração foi realizada em béquer de vidro de 1000 mL, utilizando água destilada como solvente. Foi utilizada a proporção de 1,0 g de folhas para 100 mL de solvente. A extração foi conduzida a 80 °C, com utilização de chapa aquecedora e agitação magnética, por 30 minutos. O extrato obtido foi coado em peneira doméstica, filtrado em papel filtro de 11 µm e centrifugado a 8000 rpm por 20 min, para remoção de partículas grandes em suspensão. Para conservação, o extrato bruto foi armazenado em frasco revestido com papel alumínio e refrigerado (Bindes et al., 2019).

### Processo de separação por membrana

O extrato centrifugado foi filtrado em membrana de ultrafiltração plana (Microdyn-Nadir<sup>®</sup>) de polietersulfona (PES) com tamanho de poro (MWCO) de 150 kDa. A área de filtração considerada foi  $3,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ . O módulo de filtração operou em fluxo cruzado, sob pressão de 1 bar e temperatura ambiente, até um fator de concentração de 2,0. O fluxo de permeado foi registrado em função do tempo de filtração, e a corrente de permeado foi coletada para análises. O módulo de filtração é mostrado na Figura 1, enquanto o esquema do sistema de filtração é apresentado na Figura 2.

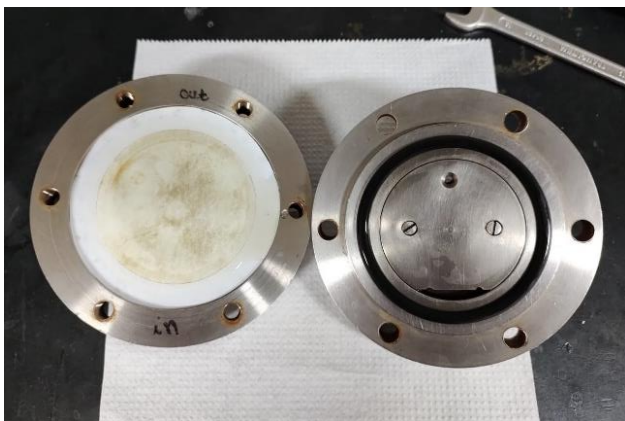


Figura 1: Módulo de filtração e exemplo de membrana plana.

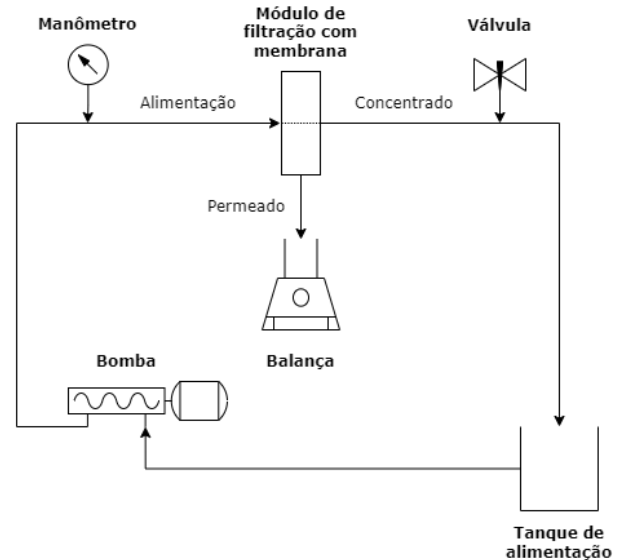


Figura 2: Diagrama do sistema de filtração utilizado nos ensaios.

O modelo de resistências em série foi estipulado para descrever o entupimento dos poros da membrana. Para a determinação da resistência total ( $R_T$ ) foram consideradas as resistências: hidráulica da membrana ( $R_M$ ), da formação de torta ( $R_C$ ) e do bloqueio de poros ( $R_P$ ) (Sun et al., 2018).

A resistência hidráulica da membrana, expressa pela Equação 1, foi determinada pela filtração de água ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>) através da membrana limpa, antes de se realizar a filtração do extrato. A soma das resistências da formação de torta e do bloqueio de poros, expressa pela Equação 2, foi determinada pela filtração de água ultrapura através da membrana "suja", após finalizada a filtração do extrato de alfavaca. A resistência do bloqueio de poros, expressa pela Equação 3, foi determinada individualmente pela filtração de água ultrapura através da membrana após a remoção manual da torta da membrana.

$$R_M = \frac{\Delta P}{\mu J_{w0}} \quad (1)$$

$$R_P + R_C = \frac{\Delta P}{\mu J_{w1}} \quad (2)$$

$$R_P = \frac{\Delta P}{\mu J_{w2}} \quad (3)$$

onde:  $R_M$  é a resistência hidráulica da membrana ( $\text{m}^{-1}$ );  $R_P$  é a resistência do bloqueio de poros ( $\text{m}^{-1}$ );  $R_C$  é a resistência da formação de torta ( $\text{m}^{-1}$ );  $\Delta P$  é a pressão através da membrana (Pa);  $\mu$  é a viscosidade da água a 25

$^{\circ}\text{C}$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ );  $J_{w0}$  é o fluxo de água através da membrana limpa ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ );  $J_{w1}$  é o fluxo de água através da membrana suja ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ); e  $J_{w2}$  é o fluxo de água através da membrana após a remoção da torta ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

O índice de entupimento (*fouling index*) descreve a diminuição da permeabilidade da membrana durante a filtração e pode ser representado pela Equação 4 (Lu et al., 2021).

$$FI = \left(1 - \frac{L_{P1}}{L_{P0}}\right) \times 100 \quad (4)$$

onde:  $L_{P0}$  é a permeabilidade da membrana à água antes da filtração ( $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$ ); e  $L_{P1}$  é a permeabilidade da membrana à água depois da filtração ( $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$ ).

### Caracterização físico-química

As correntes de alimentação e de permeado foram caracterizadas quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC), à quantidade de sólidos totais (TSC), ao conteúdo de flavonoides (TFC) e à atividade antioxidante pelo método de DPPH.

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a determinação dos compostos fenólicos totais. De forma breve, 150  $\mu\text{L}$  do extrato, 150  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu 50% (v/v) e 2700  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 3,79  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  foram adicionados a tubo de ensaio. A reação foi deixada em ambiente escuro por 30 minutos, e foi realizada leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por L (dos Santos et al., 2022).

Para a determinação do conteúdo de sólidos totais, amostras dos extratos foram secas em estufa a 105  $^{\circ}\text{C}$ , por 24 h. A massa das amostras, correspondente a um volume de 2 mL, foi registrada antes e depois da secagem (de Santana Magalhães et al., 2019).

A determinação do conteúdo de flavonoides também ocorreu por método colorimétrico. De forma breve, 250  $\mu\text{L}$  do extrato, 1000  $\mu\text{L}$  de água destilada e 75  $\mu\text{L}$  de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5% foram adicionados a tubo de ensaio. Após 5 minutos, 75  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% foram adicionados à solução. Após 6 minutos, 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 600  $\mu\text{L}$  de água destilada foram adicionados ao

tubo. A reação foi agitada vigorosamente, e foi realizada leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 510 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de quercetina (EQ) por L (Allothman et al., 2009).

O método de redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do extrato. De forma breve, 150  $\mu\text{L}$  de extrato e 2850  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH 6,1 $\cdot 10^{-4}$   $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  foram adicionadas em tudo de ensaio. A reação foi mantida em ambiente escuro por 60 minutos, e foi realizada leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 515 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de equivalente Trolox (ET) por L e pela eficiência no sequestro de radicais (%) (dos Santos et al., 2022).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físico-químicas do extrato antes e depois da filtração estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características da alimentação e do permeado do extrato de alfavaca.

Amostra	Extrato bruto	Permeado
TPC ( $\text{mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{L}^{-1}$ )	164,61 $\pm$ 1,36	96,78 $\pm$ 2,71
TFC ( $\text{mg}_{\text{EQ}}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1137,33 $\pm$ 19,63	902,00 $\pm$ 17,09
TSC ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1,55 $\pm$ 0,01	1,50 $\pm$ 0,07
DPPH ( $\text{uM}_{\text{ET}}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1313,52 $\pm$ 89,58	1217,72 $\pm$ 35,03

As condições de extração aplicadas resultaram em um extrato de alfavaca com considerável quantidade de compostos polifenólicos. Güez et al. (2017) encontraram a quantidade de 23,78  $\text{mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{L}^{-1}$  de fenólicos totais e 15,98  $\text{mg}_{\text{EQ}}\cdot\text{L}^{-1}$  de flavonoides para um extrato hidroalcolico de alfavaca (*Ocimum basilicum* L.), valores inferiores aos apresentados neste trabalho.

Awah e Verla (2010) encontraram para o extrato metanólico de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) uma quantidade de fenólicos

totais de  $839 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e de flavonoides de  $391,2 \text{ mg}_{\text{ER}}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nesse caso, o congênera da planta avaliada neste trabalho possui uma quantidade maior de fenólicos.

Jovanovic et al. (2017) avaliaram o extrato de serpilho (*Thymus serpyllum* L.), uma outra lamiácea, e encontraram uma quantidade de  $18,20 \text{ mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{L}^{-1}$  dos compostos fenólicos totais no extrato aquoso e de  $12,4 \text{ mg}_{\text{EC}}\cdot\text{L}^{-1}$  dos flavonoides no extrato hidroalcoólico. Os autores comentam que os menores valores de polifenóis recuperados foram dos extratos aquosos, em comparação com os extratos alcoólicos.

Nota-se uma grande divergência na forma de disponibilização dos resultados de extração dos compostos bioativos. Para os compostos fenólicos, alguns autores preferem utilizar mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato seco, enquanto outros trabalham com mg de equivalente de ácido gálico por L de extrato. Para os flavonoides, são encontrados trabalhos que utilizam equivalente de quercetina (EQ), de rutina (ER) e de catequina (EC) para expressar os dados. Embora as diversas maneiras sejam corretas, a falta de padronização dificulta a comparação de resultados.

A membrana utilizada para a filtração é hidrofílica, com alta resistência química e indicada para uso em efluentes e no processamento de alimentos e fármacos. Possui tamanho de poro de 150 kDa e, por apresentar poros bastante abertos, não é tão indicada para concentração de extratos, apenas para clarificação. Amostras da alimentação, do permeado e do concentrado são apresentadas na Figura 3.

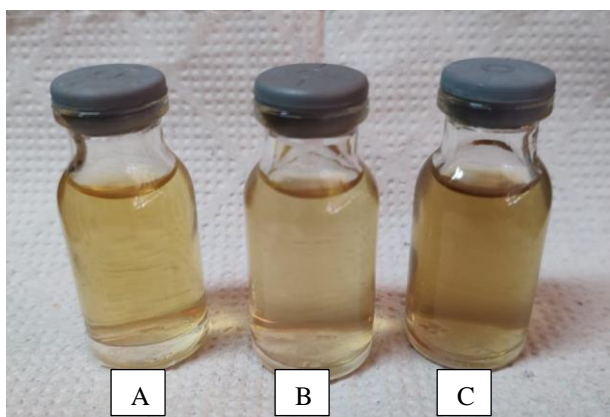


Figura 3: Extrato bruto (A), permeado (B) e concentrado (C).

A filtração através desta membrana reduziu de forma mais pronunciada o conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC) e de flavonoides (TFC). Para o primeiro grupo, houve uma diminuição de cerca de 41%, enquanto para o segundo grupo a diminuição foi de cerca de 21%. Quando se analisa a quantidade de sólidos totais e a atividade antioxidante, nota-se que a diferença entre as duas correntes não foi tão acentuada.

A redução em parâmetros como sólidos totais e turbidez é desejável para obter um extrato clarificado, porém a redução no conteúdo de polifenóis compromete as propriedades nutricionais do extrato (de Santana Magalhães et al., 2019).

A capacidade antioxidante, expressa em  $\mu\text{M}$  equivalente Trolox, teve uma redução apenas de 7,3% com a passagem pela membrana. Pode-se entender, então, que houve manutenção da capacidade antioxidante mesmo com a ultrafiltração. Quanto ao resultado de eficiência no sequestro de radicais, tem-se para o extrato bruto 16,31% e para o permeado 15,18%. Estes baixos valores estão próximos aos obtidos por Awah e Verla (2010) para uma concentração de  $4,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do extrato de alfavacão (17,1%).

O trabalho de Alothman et al. (2009), em um campo diferente, avalia o extrato de frutas e permite comparar que o extrato de alfavaca possui uma eficiência de inibição maior que o extrato aquoso de abacaxi (12,7%) mas menor que o extrato aquoso de goiaba (82,3%).

O fluxo final obtido na filtração do extrato e as resistências calculadas são apresentados na Tabela 2. Para o processo, a maior resistência observada ocorreu pelo entupimento dos poros ( $R_P$ ), correspondendo a 44,3% da contribuição na resistência total.

Tabela 2: Fluxo do estado estacionário e resistências hidráulicas.

Fluxo final ( $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ )	Resistências ( $10^8 \text{ m}^{-1}$ )			
	$R_M$	$R_C$	$R_P$	$R_T$
73,28	4,598	4,564	7,298	16,46

O “*fouling index*” (FI) é outra ferramenta que permite avaliar a extensão do entupimento

da membrana e ajuda a determinar propriedades anti-entupimento para o processo. A utilização de processos sequenciais de filtração é sugerida como possibilidade para diminuir a resistência hidráulica total (de Santana Magalhães, 2019; Lu et al., 2021). Para a operação realizada, o FI calculado foi de 61,24%, o que representa um decaimento considerável no fluxo do extrato.

## CONCLUSÃO

O trabalho buscou avaliar a clarificação de um extrato de alfavaca comercial e a retenção de compostos bioativos de interesse. Foi possível comprovar que, mesmo com a leve redução nos compostos fenólicos e nos flavonoides após a passagem pela membrana, a capacidade antioxidante do extrato foi mantida. Durante a operação houve um decaimento alto no fluxo de operação, causado principalmente pela resistência pelo entupimento dos poros da membrana. A membrana escolhida cumpriu o papel de clarificar o extrato, entretanto caso o objetivo fosse concentrar a amostra, seria necessário optar por uma membrana com tamanho de poro menor ou aplicar processos sequenciais de clarificação.

## REFERÊNCIAS

- Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, v. 115, p. 785-788, 2009.
- Awah, F. M.; Verla, A. W. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, [S. l.], v. 4, n. 24, p. 2479–2487, 2010.
- Bindes, M. M. M.; Cardoso, V. L.; Reis, M. H. M.; Boffito, D. C. Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. *Journal of Food Engineering*, [S. l.], v. 241, n. August 2018, p. 97–104, 2019.
- Bindes, M. M. M.; Terra, N. M.; Patience, G. S.; Boffito, D. C.; Cardoso, V. L.; Reis, M. H. M. Asymmetric Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PES/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hollow fiber membranes for green tea extract clarification. *Journal of Food Engineering*, [S. l.], v. 277, n. December 2019, p. 1–10, 2020.
- Chhaya; Sharma, C.; Mondal, S.; Majumdar, G. C.; De, S. Clarification of Stevia extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food and Bioproducts Processing*, i. 3, v. 90, p. 525-532, 2012.
- de Santana Magalhães, F.; Sá, M. S. M.; Cardoso, V. L.; Reis, M. H. M. Recovery of phenolic compounds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract by membrane filtrations: Comparison of direct and sequential processes. *Journal of Food Engineering*, v. 257, p. 26-33, 2019.
- dos Santos, L. F.; Vargas, B. K.; Bertol, C. D.; Biduski, B.; Bertolin, T. E.; dos Santos, L. R.; Brião, V. B. Clarification and concentration of yerba mate extract by membrane technology to increase shelf life. *Food and Bioproducts Processing*, v. 122, p. 22-30, 2020.
- dos Santos, S. S.; Paraíso, C. M.; Romanini, E. B.; Correa, V. G.; Peralta, R. M.; da Costa, S. C.; Santos Junior, O. O.; Visentainer, J. V.; Reis, M. H. M.; Madrona, G. S. Bioavailability of blackberry pomace microcapsules by using different techniques: An approach for yogurt application. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2022.
- Güez, C. M.; de Souza, R. O.; Fischer, P.; Leão, M. F. M.; Duarte, J. A.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Zuravski, L.; de Oliveira, L. F. S.; Machado, M. M. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, 2017.
- Jovanovic, A. A.; Dordevic, V. B.; Zdunic, G. M.; Pljevljakusic, D. S.; Savikin, K. P.; Godevac, D. M.; Bugarski, B. M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques.

- Separation and Purification Technology, v. 179, p. 369-380, 2021.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- Lu, C.; Bao, Y.; Huang, J. Fouling in membrane filtration for juice processing. *Current Opinion in Food Science*, v. 42, p. 76-85, 2021.
- POWO. 2022. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>. Acesso em: 17 mar. 2022.
- Sun, Y.; Qin, Z.; Zhao, L.; Chen, Q.; Hou, Q.; Lin, H.; Jiang, L.; Liu, J.; Du, Z. Membrane fouling mechanisms and permeate flux decline model in soy sauce microfiltration. *Journal of Food Process Engineering*, i. 1, v. 41, 2018.
- Vieira, R. F.; Simon, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum spp.*) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Economic Botany*, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.