

Otimização do processo extrativo de *Phyllanthus niruri* L.

Heitor Janaudis Carmagnani*
Gabriel Bucciarelli Mansano*
Flavia Sobreira*

134

Resumo

Phyllanthus niruri L., conhecida como quebra-pedra, é uma planta da família *Phyllanthaceae*, pertencente ao gênero *Phyllanthus*. Neste estudo foi avaliado o planejamento fatorial para estudar a importância dos fatores (concentração de etanol e processo extrativo) na concentração de flavonoides e compostos fenólicos presentes nos extratos de *P. niruri*. Diferentes extratos de *P. niruri* foram preparados utilizando etanol 50 e 96%, empregando três métodos extrativos diferentes: maceração, percolação e ultrassom. A quantificação de flavonoides foi realizada pelo método espectrofotométrico com AlCl₃ 10% (v/v) em água. Já o método utilizado para a quantificação de compostos fenólicos foi de Folin-Ciocalteu. As análises foram feitas em triplicata e os resultados analisados nos softwares Minitab18® e Prisma GraphPad®. Foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores de flavonoides e compostos fenólicos totais nos extratos produzidos de *P. niruri*, quando foram utilizados diferentes processos extrativos, bem como diferentes concentrações de etanol. Analisando os gráficos de Pareto, foi possível verificar que a concentração de solvente foi o efeito que mais contribuiu na extração de ambos os compostos bioativos. Verificando os gráficos de interações, foi possível identificar que o etanol 96% influenciou positivamente na extração de flavonoides e o etanol 50% na extração de compostos fenólicos. Assim, o planejamento fatorial aplicado ao processo extrativo de *P. niruri* evidenciou que a extração de flavonoides pode ser realizada com eficiência por métodos extrativos tradicionais, maceração ou percolação, utilizando como solvente o etanol 96%. Já as condições otimizadas para a extração de compostos fenólicos são por percolação ou ultrassom com etanol 50%.

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*. Processo Extrativo. Flavonoides. Compostos fenólicos.

INTRODUÇÃO

Phyllanthus niruri L. (*Phyllanthaceae*), popularmente denominada de quebra-pedra, é uma espécie que ocorre em quase toda a região tropical, inclusive até o sul da América do Norte. Na medicina popular a planta inteira (partes aéreas e raiz) é utilizada para eliminar pedras nos rins e para aumentar a excreção urinária, já que promove um relaxamento dos ureteres. Além disso, há relatos do seu uso para desconforto gastrointestinal, diabetes, problemas respiratórios e hepáticos^{1,2}.

Esta espécie está inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, publicada em 2009 pelo Ministério da Saúde. Esta relação é constituída de espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao SUS³.

A análise fitoquímica desta espécie revelou a presença de vários grupos de princípios ativos, tais como: flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos, lignanas, polifenóis e esteróis. Dessa maneira, a presença destes compostos em *P. niruri* é de grande interesse para os pesquisadores

DOI: 10.15343/0104-7809.202044134143

*Centro Universitário São Camilo, São Paulo – SP, Brasil.
E-mail: heitortablet@gmail.com

que estão interessados na determinação dos seus efeitos farmacológicos⁴.

Recentemente houve um aumento no interesse no mercado de fitoterápicos. É estimado que o mercado global desta classe de medicamentos alcance 20 milhões de dólares por ano⁵. Sendo assim, há a necessidade de se obter extratos padronizados⁶. A produção de extratos padronizados está condicionada ao monitoramento da quantidade de marcadores químicos presentes, além de uma correta identificação da espécie vegetal, informações sobre as condições de cultivo, processos de extração e de purificação. O desenvolvimento de extratos vegetais padronizados resulta na obtenção de produtos farmacêuticos com alto padrão de qualidade com parâmetros determinados de segurança e eficácia terapêutica^{7,8}. Dentre os parâmetros citados, a extração é um passo crucial na preparação de fitoterápicos e a escolha de um método deve ser baseada na eficiência, na estabilidade das substâncias extraídas e na disponibilidade dos meios e custo do processo^{9,10}.

P. niruri é uma espécie muito utilizada pela população na forma de chá. No entanto, esta forma comum de uso, e mesmo a planta em si, não são padronizadas podendo acarretar efeitos adversos ou falta de eficácia¹¹. O objetivo desse trabalho foi estudar a importância dos fatores (concentração de etanol e processo extrativo) na concentração de flavonoides e de compostos fenólicos presentes nos extratos de *P. niruri*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal seco foi obtido da Farmácia Universitária São Camilo - FUSC. Este material vegetal foi adquirido da empresa SantosFlora Comércio de Ervas Ltda., correspondendo ao lote 1608175268 com laudo de autenticidade

fornecido pela empresa.

Preparo dos extratos de *Phyllanthus niruri*

A planta inteira foi pulverizada no moinho de facas e submetida ao processo de tamisação, utilizando tamis 20 mesh (850 µm). Os processos extrativos utilizados foram maceração, ultrassom e percolação, obtendo-se 3 extratos hidroetanólicos com etanol 50% e outros 3 diferentes extratos com etanol 96%. Todos os extratos foram elaborados na proporção 1:10 (massa da droga vegetal versus líquido extrator). Os processos extrativos foram realizados em triplicata.

No processo por maceração, as folhas pulverizadas ficaram em contato com o líquido extrator por 7 dias. O processo elaborado por percolação foi realizado na velocidade, em média, de 50 gotas/minuto¹². Já no processo por ultrassom, o material vegetal ficou em contato com o líquido extrator durante 30 minutos em temperatura ambiente¹³. Os extratos produzidos foram concentrados em evaporador rotativo a 40°C.

Delineamento experimental

Neste estudo foi proposto o delineamento experimental fatorial 2x3 tendo etanol e processo extrativo como fatores. Os níveis utilizados foram etanol nas concentrações 50% e 96% e os seguintes processos extrativos: maceração, ultrassom e percolação (tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento experimental realizado para otimizar o processo extrativo de *Phyllanthus niruri*. Tendo X_i onde i é o tipo de extração e j a concentração de etanol.

Fator Processo Extrativo	Fator Etanol	
	50%	96%
Maceração	X11	X12
Ultrassom	X21	X22
Percolação	X31	X32

Quantificação de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides totais nos diferentes extratos foi realizada por espectrofotometria UV/Vis (Shimadzu® UV-1280) empregando o cloreto de alumínio (AlCl_3) como agente complexante¹⁴. Para a execução da técnica utilizou-se quercetina (Sigma Aldrich®) em etanol 96% como SQR. Foram pesados 10 mg de cada amostra e diluídos em 10 mL de etanol 96% para extratos com etanol 96% e em água: etanol (1:1 v/v) para extratos com etanol 50%, obtendo concentração final de 1 mg/mL. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL da amostra, 0,1 mL de solução aquosa de acetato de sódio e 0,1 mL de AlCl_3 a 10% em água. O volume foi completado com 96% de etanol para 5,0 mL. Após 30 minutos da adição do agente complexante, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. O branco foi preparado seguindo a mesma metodologia, porém foi adicionado 0,5 mL de etanol 50% (para extratos com etanol 50%) ou 96% (para extratos com etanol 96%) ao invés da amostra. As análises foram realizadas em triplicatas¹⁵.

Quantificação de substâncias fenólicas

O método utilizado para a quantificação de compostos fenólicos foi de Folin-Ciocalteu. Para a determinação do teor de substâncias fenólicas foram pesados 10 mg de cada extrato com etanol 50% e 30 mg de cada extrato com etanol 96%, diluídos em 10 mL de água: etanol (1:1 v/v) para extratos com etanol 50% e em etanol 96% para extratos com etanol 96%, obtendo concentração final de 1 mg/mL para extratos com etanol 50% e 3 mg/mL para os extratos com etanol 96%. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1 mL da amostra, 6,0 mL de água e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 8 minutos. Em cada tubo foram adicionados 1,5 mL de solução de

carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% em água e 1,9 mL de água.

O branco foi preparado pelo mesmo método, porém foi adicionado 0,1 mL de etanol 50% (para extratos com etanol 50%) ou 96% (para extratos com etanol 96%) em vez da amostra.

Após duas horas de reação na ausência de luz, a absorvância foi determinada em um comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1280). Ácido gálico em etanol a 50% foi utilizado como SQR. As leituras foram realizadas em triplicata¹⁶.

Determinação do Perfil Cromatográfico

Os extratos brutos de *P. niruri* elaborados com etanol 96% e com etanol 50% por diferentes métodos extrativos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) com a finalidade de indicar substâncias de interesse através de comparação com padrão. O sistema cromatográfico utilizado nesta pesquisa foi descrito por Wagner e Bladt¹⁷, direcionado para flavonoides. A fase estacionária empregada foi sílica gel 60 GF254 Merck sobre placa de alumínio com espessura 0,2 mm. A fase móvel foi composta por acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água destilada (100:11:11:26). O revelador foi formulado por difenilboriloxietilamina (NP) a 1% em metanol. O padrão utilizado foi rutina solubilizada em etanol. Por último, a visualização da cromatoplaça foi realizada sob luz UV 366 nm.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico, através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Foi testada a normalidade dos dados, sendo que os valores obtidos foram maiores que 0,05. O teste de normalidade utilizado foi o D'Agostino & Pearson omnibus Normality test. Este teste é o recomendado pelo programa estatístico Prisma

GraphPad®, que foi o software utilizado para realização dos cálculos. Além disso, foi avaliada a homocedasticidade dos dados (resposta – flavonoides versus concentração de etanol e resposta – flavonoides versus processo extrativo). O mesmo foi realizado para os dados obtidos para verificação da presença de compostos fenólicos. Como foi verificado a presença desses pressupostos foi aplicado a ANOVA. Para avaliar a importância dos efeitos (processo extrativo e solvente), além de verificar se há interação entre eles, na concentração de flavonoides e de compostos fenólicos foi utilizado o software Minitab18®. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor-p era menor ou igual que 0,05 ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

As análises referentes a quantificação de flavonoides nos diferentes extratos foram realizadas utilizando quercetina como padrão externo para a construção da curva padrão (figura 1). Após o cálculo pela equação da reta foram obtidos valores de flavonoides totais para cada extrato. Abaixo seguem os resultados (tabela 2).

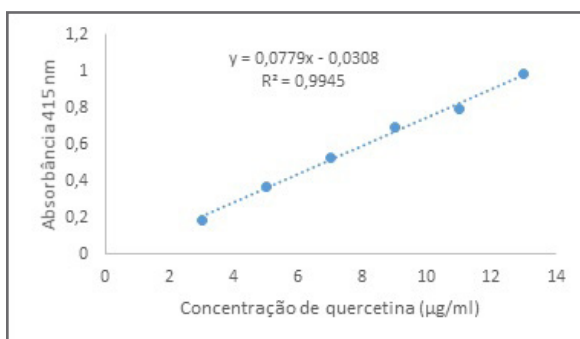


Figura 1 – Curva padrão utilizada para a quantificação de flavonoides totais nos diferentes extratos brutos de *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio de 2019).

Tabela 2 – Quantificação de flavonoides totais nos diferentes extratos brutos de *Phyllanthus niruri* utilizando $AlCl_3$ como agente complexante. Os resultados de flavonoides totais estão expressos como média seguida do seu desvio padrão. ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (São Paulo – SP, maio/junho de 2019).

Extrato	Flavonoides totais (mg/g extrato bruto) \pm DP
Maceração 50% etanol	35,67 \pm 6,139 ^{a,f}
Maceração 96% etanol	55,72 \pm 3,137 ^b
Percolação 50% etanol	29,65 \pm 4,813 ^{a,d}
Percolação 96% etanol	50,09 \pm 7,287 ^b
Ultrassom 50% etanol	25,30 \pm 2,087 ^d
Ultrassom 96% etanol	37,72 \pm 3,970 ^{e,f}

Os extratos que não compartilham a mesma letra indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A tabela 2 demonstra a quantidade de flavonoides nos diferentes extratos brutos de *P. niruri*. Com o auxílio do gráfico de Pareto foi possível verificar a importância dos fatores (processo extrativo e solvente) na concentração de flavonoides (figura 2).

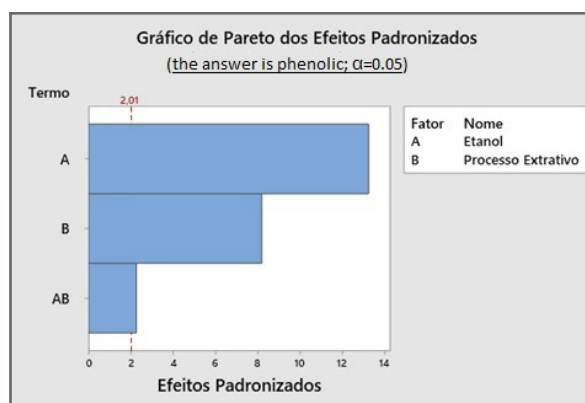


Figura 2 – Influência dos parâmetros concentração de solvente e processo extrativo na extração de flavonoides em *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio/junho de 2019).

Como foi constatada a interação entre os fatores avaliados, foi elaborado um gráfico de interação entre ambos (figura 3).

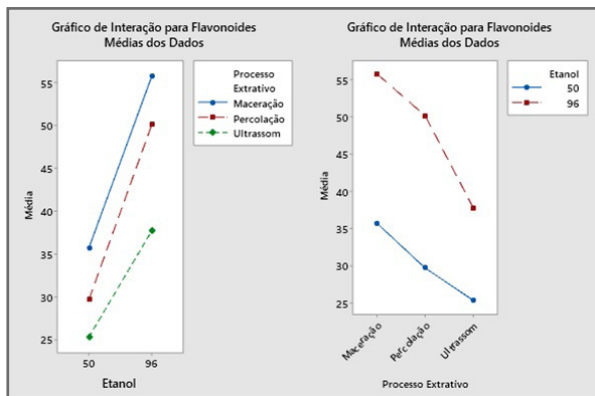


Figura 3 – Gráfico de interação entre os fatores (concentração de solvente e processo extrativo) na extração de flavonoides em *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio/junho 2019).

Já as análises referentes a quantificação de compostos fenólicos nos diferentes extratos de *P. niruri* foram realizadas utilizando ácido gálico como padrão externo para a construção da curva padrão (figura 4). Após o cálculo realizado utilizando a equação da reta, foram obtidos os valores de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Abaixo seguem os resultados (tabela 3).

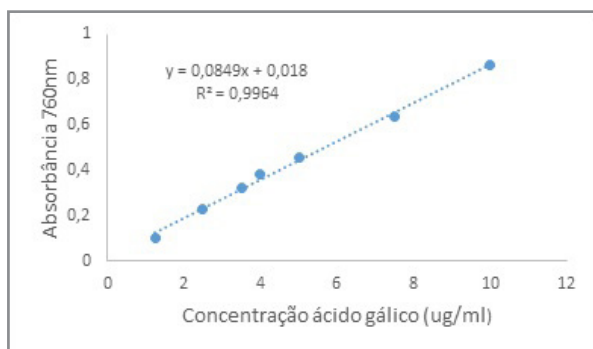


Figura 4 – Curva padrão utilizada para a quantificação de compostos fenólicos totais nos diferentes extratos brutos de *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio de 2019).

Tabela 3 – Quantificação de compostos fenólicos totais nos diferentes extratos brutos de *P. niruri* utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do seu desvio padrão. ANOVA seguido do teste de Tukey, ($p \leq 0,05$). (São Paulo - SP, maio/junho de 2019).

Extrato	Compostos fenólicos totais (mg/g extrato bruto) \pm DP
Maceração 50% etanol	281,0 \pm 12,33 ^a
Maceração 96% etanol	70,49 \pm 32,79 ^b
Percolação 50% etanol	355,4 \pm 58,75 ^c
Percolação 96% etanol	43,70 \pm 6,712 ^b
Ultrassom 50% etanol	327,5 \pm 17,36 ^c
Ultrassom 96% etanol	117,5 \pm 32,63 ^d

Os extratos que não compartilham a mesma letra indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

A tabela 3 mostra a quantidade de compostos fenólicos totais nos diferentes extratos brutos de *P. niruri*.

Analisando o Diagrama de Pareto, representado na figura 5, verificou-se a importância de cada fator e a interação entre eles no valor de compostos fenólicos totais presentes nos diferentes extratos. Como houve interação entre os fatores avaliados, foi construído um gráfico de interações (figura 6).

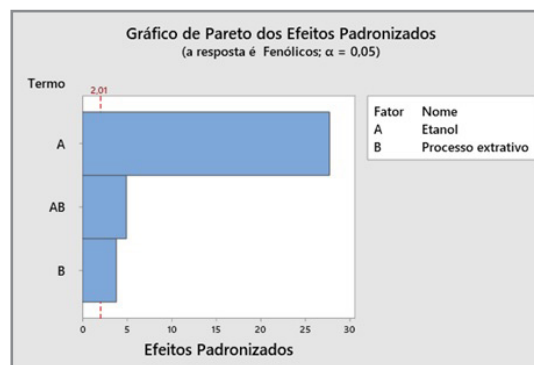


Figura 5 – Influência dos parâmetros concentração de solvente e processo extrativo na extração de compostos fenólicos em *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio/junho de 2019).

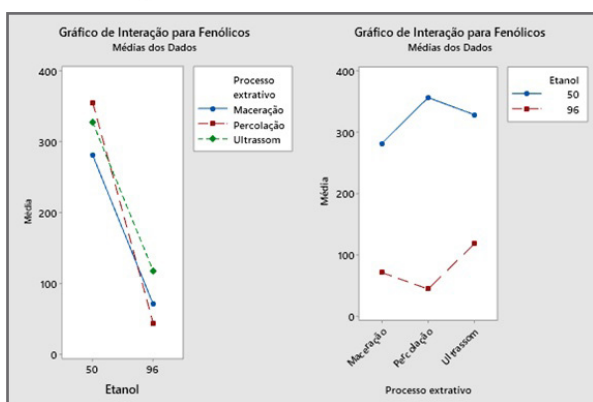
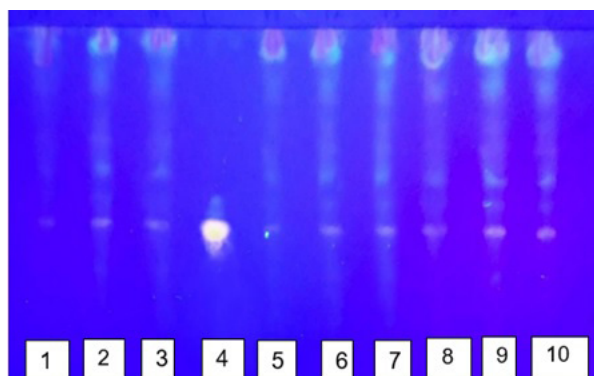


Figura 6 – Gráfico de interação entre os fatores (concentração de solvente e processo extrativo) na extração de compostos fenólicos em *Phyllanthus niruri* (São Paulo – SP, maio/junho de 2019).

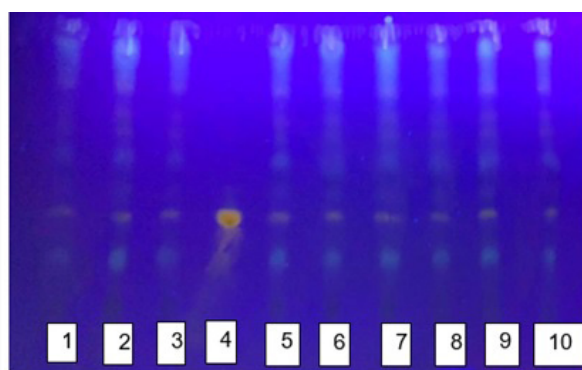
Determinação do Perfil Cromatográfico

O perfil cromatográfico para os diferentes extratos produzidos com etanol 96% e 50% seguem abaixo (figura 7 e figura 8).



Legenda 1. Extrato bruto elaborado por maceração (M1); 2. Extrato bruto elaborado por maceração (M2); 3. Extrato bruto elaborado por maceração (M3); 4. Rutina 0,5% em metanol; 5. Extrato bruto elaborado por percolação (P1); 6. Extrato bruto elaborado por percolação (P2); 7. Extrato bruto elaborado por percolação (P3); 8. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U1); 9. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U2); 10. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U3). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com difenilboriloxietilamina (NP) a 1% em metanol. Distância percorrida pela fase móvel: 10 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

Figura 7 – Cromatoplaqueta comparativa dos extratos brutos de *Phyllanthus niruri* elaborados por diferentes processos extrativos com etanol 96% (São Paulo – SP, novembro/dezembro de 2018).



Legenda 1. Extrato bruto elaborado por maceração (M1); 2. Extrato bruto elaborado por maceração (M2); 3. Extrato bruto elaborado por maceração (M3); 4. Rutina 0,5% em metanol; 5. Extrato bruto elaborado por percolação (P1); 6. Extrato bruto elaborado por percolação (P2); 7. Extrato bruto elaborado por percolação (P3); 8. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U1); 9. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U2); 10. Extrato bruto elaborado por ultrassom (U3). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com difenilboriloxietilamina (NP) a 1% em metanol. Distância percorrida pela fase móvel: 10 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

Figura 8 – Cromatoplaqueta comparativa dos extratos brutos de *Phyllanthus niruri* elaborados por diferentes processos extrativos com etanol 50% (São Paulo – SP, novembro/dezembro de 2018).

DISCUSSÃO

O método de extração de metabólitos ativos possui uma crítica influência nos estudos farmacológicos. Assim, a otimização e o desenvolvimento de um novo procedimento é relevante¹⁸. Diversos processos podem ser utilizados na extração de drogas vegetais tais como: os convencionais, como a decocção, infusão, maceração, percolação e extração por Soxhlet e os métodos considerados modernos, como extração assistida por ultrassom, micro-ondas, turbo-extração, entre outros^{19,20}. Um outro fator que influencia em um processo extrativo é o tipo de solvente utilizado, pois o solvente irá difundir para o interior do material vegetal e solubilizar

compostos com polaridade semelhante²¹. Alguns trabalhos publicados relatam a extração de *P. niruri* com metanol e água^{22,23}. Embora o metanol facilite a extração de compostos fenólicos de *P. niruri*, seu uso não é recomendado para a produção de produtos farmacêuticos²⁴. Desta maneira, etanol e mistura hidroalcoólica foram utilizados neste trabalho.

Durante o desenvolvimento de um extrato vegetal padronizado várias decisões devem ser tomadas para se obter um produto com uma quantidade adequada de compostos bioativos, assim como para economia geral de materiais e solventes, o que torna válido conhecer as melhores condições de extração de princípios ativos²⁵.

Na montagem da matriz de delineamento experimental, o objetivo do trabalho foi avaliar dois processos extrativos, sendo dois tradicionais (maceração e percolação) e outro não convencional (ultrassom), conjuntamente com variações na concentração de solvente (etanol), a fim de otimizar o processo de extração de flavonoides e de compostos fenólicos.

Vários autores estudaram a influência do processo extrativo de plantas medicinais com o intuito de otimizar a extração de princípios ativos^{25,6,26}. Migliato e colaboradores²⁷ avaliaram a influência do processo extrativo e do solvente na produção de extrato bruto de frutos de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) no teor de resíduo seco e na determinação da atividade antimicrobiana. Oliveira et al.²⁶ também realizaram a otimização da extração de ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico, substâncias que possuem atividade antioxidante, encontradas em *Rosmarinus officinalis* L. O monitoramento da eficiência das variáveis testadas (tempo de extração, concentração de etanol e taxa sólido-líquido) foi determinado pelas

concentrações de ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico, e também pelo rendimento do processo extrativo.

Em relação a *P. niruri* há poucos trabalhos na literatura relatando o efeito do solvente e do método extrativo na extração de componentes ativos^{28,24}, apesar de serem encontrados diversos trabalhos reportando estudos farmacológicos, bem como a identificação, isolamento e análise fitoquímica de compostos presentes nos extratos de *P. niruri*^{4,29}.

No ensaio de quantificação de flavonoides observou-se que a combinação do processo extrativo maceração com etanol 96% exibiu a maior concentração de flavonoides (tabela 2). Houveram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos valores de flavonoides totais nos extratos produzidos quando foram utilizados diferentes processos extrativos, bem como diferentes concentrações de etanol. A maior concentração de flavonoides foi observada nos extratos brutos produzidos por maceração e percolação com etanol 96%. Isso porque não foi observado diferença estatística na concentração desse metabólito secundário quando foram utilizados os referidos processos extrativos com etanol 96% ($p \geq 0,05$). Já a menor concentração de flavonoides nos extratos brutos foi verificada no processo extrativo ultrassom com etanol 50% como líquido extrator.

Amin e colaboradores³⁰ também observaram uma alta concentração de flavonoides quando utilizou etanol 96% para produzir extratos de *P. niruri* quando comparado com o extrato aquoso. Considera-se que a maioria desses compostos são antioxidantes, importante característica para prevenção de diversas doenças crônicas que acometem o homem³¹.

O gráfico de Pareto (figura 2) demonstrou que a concentração do solvente e o processo

extrativo são estatisticamente significativos, sendo que o efeito que mais contribui na extração de flavonoides é o solvente ($p \leq 0,05$). Além disso, foi verificada diferença estatística na interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores solvente (etanol 50% e etanol 96%) e processo extrativo (maceração, percolação e ultrassom) na extração desse metabólito secundário. Observou-se, por meio do gráfico de interação, que o efeito de interação indica que a relação entre processo extrativo e a concentração de flavonoides nos extratos brutos de *P. niruri* depende da concentração de etanol, ou seja, verificou-se que o etanol 96% influenciou positivamente na extração de flavonoides no material vegetal.

Com o experimento de quantificação de compostos fenólicos verificou-se que o etanol 50% influenciou positivamente na extração de compostos fenólicos totais.

Foi observado que os extratos brutos produzidos por percolação e ultrassom com etanol 50% foram mais eficientes na extração desses metabólitos, já que não foi observado diferença estatística na concentração desse metabólito secundário, quando foram utilizados os referidos processos extrativos com etanol 50% ($p \geq 0,05$). Já a menor concentração de compostos fenólicos totais nos extratos brutos foi verificada quando se utilizou o processo extrativo maceração e percolação com etanol 96% como líquido extrator (tabela 3).

Nguang, et al.²⁴ verificaram que a maior extração de compostos fenólicos presentes na espécie foi evidenciada quando se utilizou mistura hidroetanólica a 40%, fato coerente já que a espécie apresenta como compostos majoritários taninos hidrolisáveis. Markom et al.²⁸ também constataram um rendimento mais eficiente na extração de

taninos em extratos hidroetanólicos e que alguns compostos bioativos, tais como ácido gálico, ácido elágico e corilagina, presentes em *P. niruri*, apresentaram uma extração mais eficiente quando se faz o uso de solventes polares (água e mistura hidroetanólica) sugerindo que o solvente possui uma grande interferência na extração de substâncias ativas.

O gráfico de Pareto (figura 5) indicou que o solvente foi o fator que mais influenciou na eficiência das extrações ($p \leq 0,05$) de compostos fenólicos. Além disso, foi observado que o fator processo extrativo, bem como a interação entre ambos os fatores foram significantes ($p \leq 0,05$). Já o gráfico de interação (figura 6) sugere que utilizando o solvente adequado (etanol 50%) e selecionando-se o processo extrativo percolação ou ultrassom resulta no método mais eficiente para a extração de compostos fenólicos presentes em *P. niruri*.

Por fim, a análise dos perfis químicos dos diferentes extratos brutos, produzidos com etanol 50% e 96% por CCD foram semelhantes. Além disso, foi possível visualizar diversas manchas intensas nas cromatoplacas sugerindo grande concentração de flavonoides. Também foi visualizada a presença de uma banda de coloração intensa comum a todas as amostras testadas. Esta banda possui fator de retenção ($R_f = 0,4$) e coloração semelhante a rutina, padrão utilizado. Este flavonoide foi identificado na espécie utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear 1H e correlacionado com a atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH)³². Outros flavonoides também foram identificados na espécie em estudo, como quercetina e apigenina³³.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem a importância da escolha do método de extração e do solvente extrator para a obtenção da melhor eficiência da extração de compostos bioativos. Assim, o planejamento fatorial aplicado ao processo extrativo de *P. niruri* evidenciou que a extração de flavonoides

de *P. niruri* pode ser realizada com eficiência por métodos extrativos tradicionais, maceração ou percolação, utilizando como solvente o etanol 96%. Já as condições otimizadas para a extração de compostos fenólicos de *P. niruri* é a percolação ou o ultrassom com 50% de etanol.

REFERÊNCIAS

1. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas exóticas. 2a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2008. 576 p.
2. Kaur N, Kaur B, Sirhindi G. Phytochemistry and pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: a review. *Phytother Res*. 2017 jul;31(7):980-1004.
3. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2009 [citado 2019 dez 5]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnprmf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>.
4. Mediani A, Abas F, Maulidiani M, Khatib A, Tan CP, Ismail IS, Shaari K, Ismail A. Characterization of metabolite profile in *Phyllanthus niruri* and correlation with bioactivity elucidated by nuclear magnetic resonance based metabolomics. *Molecule*. 2017 may;22(6):1-14.
5. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 oct;(112):4-29.
6. Noriega P, Mafud DF, Souza B, Soares-Scott M, Rivelli DP, Barros SBM, Bacchi EM. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. *Rev Bras Farmacogn*. 2012 oct;22(5):1119-1129.
7. Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines - a review. *Int J Biodivers Conserv*. 2012 mar;43(3):101-112.
8. Bezerra ANS, Massing LT, Oliveira RB, Mourão RHV. Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae). *J Ethnopharmacol*. 2017 apr;(202):234-240.
9. Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6a ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007. 1104 p.
10. Costa-Machado ARM, Bastos JK, Freitas LAP. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. *Rev Bras Farmacogn*. 2013 feb;23(1):79-85.
11. Wang J, van der Heijden R, Spruit S, Hankermeier T, Chan K, van der Greef J, Xu G, Wang M. Quality and safety of Chinese herbal medicines guided by a systems biology perspective. *J Ethnopharmacol*. 2009 oct;126(1):31-41.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Farmacopeia Brasileira: Plantas Medicinais. 6a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019. 739 p.
13. Cardoso IC, Pereira HMG, Tappin MRR, Behrens MD. Influência da técnica de extração e do tamanho do material vegetal no teor de compostos fenólicos da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. *Rev Fitos*. 2017 set;(7):62-68.
14. Ho YC, Yu HT, Su NW. Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoids content. *J Agric Food Chem*. 2012 mar;60(10):2674-2681.
15. Silva NC. Comparação do perfil de metabólitos secundários em diferentes órgãos de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) [Trabalho de Conclusão de Curso]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista; 2013.
16. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*. 1999 jan;299:152-178.
17. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: thin layer chromatography atlas. 2a ed. Berlin: Springer; 1996. 384p.
18. Khoza BS, Chimuka L, Mukwevho E, Steenkamp PA. The effect of temperature on pressurised hot water extraction of pharmacologically important metabolites as analysed by UPLC-qTOF-MS and PCA. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014 oct;2014:1-9.
19. Machado ARM. Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
20. Biagi M, Manca D, Barlozzini B, Miraldi E, Giachetti D. Optimization of extraction of drugs containing polyphenols using an innovative technique. *Agro Food Ind Hi Tech*. 2014 jan;25(1):60-65.
21. Sharapin N. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. Colômbia: Cyted; 2000. 284 p.
22. Shah RA, Khan S, Sonawane PD, Rehman W. Phytochemical finger printing and antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri*. *Int J Pharm*

- Sci Rev Res. 2017 jun;44(2):7-11.
23. Zain SNDM, Omar WAW. Antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of water and methanol extracts of *Phyllanthus* species from Malaysia. *Pharmacogn J*. 2018 jun;10(4):677-681.
24. Nguang SL, Yeong YL, Pang SF, Gim bun J. Ultrasonic assisted extraction on phenolic and flavonoid content from *Phyllanthus niruri* plant. *INDJSRT*. 2017 jan;10(2):1-5.
25. Souza CRF, Bott RF, Oliveira WP. Optimization of the extraction of flavonoids compounds from herbal material using experimental design and multi-response analysis. *Lat Am J Pharm*. 2007 jun;26(5):682-690.
26. Oliveira GA, Oliveira AE, Conceição EC, Leles MI. Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chem*. 2016 nov;211:465-473.
27. Migliato KF, Corrêa MA, Salgado HRN, Tognolli JO, Sacramento LVS, Mello JCP, et al. Planejamento experimental na otimização dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. *Quím Nova*. 2011 fev;34(4):695-699.
28. Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jahim JM. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods. *Sep Purif Technol*. 2007 jan;52(3):487- 496.
29. Klein-Júnior LC, Silva LM, Boeing T, Somensi LB, Beber AP, Rocha JA, Henriques AT, Andrade SF, Cechinel-Filho V. The protective potential of *Phyllanthus niruri* and corilagin on gastric lesions induced in rodents by different harmful agents. *Planta Med*. 2017 jan;83(2):30-39.
30. Amin ZA, Abdulla MA, Ali HM, Alshawsh MA, Qadir SW. Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. *J Sci Food Agric*. 2012 jul;92(9):1874-1877.
31. Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhoy Y, Li A, Xu DP, Li HB. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*. 2015 nov;20(12):21138-56.
32. Mediani A, Abas F, Khatib A, Tan CP, Ismail IS, Shaari K, Ismail A, Lajis NH. Phytochemical and biological features of *Phyllanthus niruri* and *Phyllanthus urinaria* harvested at different growth stages revealed by 1H NMR-based metabolomics. *Ind Crop Prod*. 2015 dec;77:602-613.
33. Mediani A, Abas F, Khatib A, Tan CP, Ismail IS, Shaari K, Ismail A, Lajis NH. Relationship between metabolites composition and biological activities of *Phyllanthus niruri* extracts prepared by different drying methods and solvents extraction. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015 jun;70(2):184-192.

Recebido em dezembro de 2019.

Aceito em janeiro de 2020 .