



RAPHAELA GABRÍ BITENCOURT

**EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SAPONINAS
POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO
UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO
SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA**

CAMPINAS

2014

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

RAPHAELA GABRÍ BITENCOURT

**EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SAPONINAS
POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO
UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO
SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Coorientadora: Dra. Carmen Lucia Queiroga

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra, na área de Engenharia de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA RAPHAELA GABRÍ BITENCOURT E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO
ANTONIO CABRAL.**

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

B546e Bitencourt, Raphaela Gabrí, 1989-
Extração e fracionamento de saponinas por extração sequencial em leito fixo utilizando dióxido de carbono supercrítico, etanol e água / Raphaela Gabrí Bitencourt. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fernando Antonio Cabral.
Coorientador: Carmen Lucia Queiroga.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Extração supercrítica. 2. Saponinas. 3. Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). 4. Hebanthe eriantha. I. Cabral, Fernando Antonio. II. Queiroga, Carmen Lucia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extraction and fractionation of saponins by sequential extraction in a fixed bed using supercritical carbon dioxide, ethanol and water

Palavras-chave em inglês:

Supercritical extraction

Saponins

Pfaffia glomerata

Hebanthe eriantha

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Fernando Antonio Cabral [Orientador]

Losiane Cristina Paviani

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Data de defesa: 20-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Orientador

DEA - FEA / UNICAMP

Dra. Losiane Cristina Paviani

Membro Titular

DEA - FEA / UNICAMP

Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Membro Titular

CPQBA – UNICAMP

Prof. Dr. Julian Martínez

Membro Suplente

DEA - FEA / UNICAMP

Dra. Vera Lucia Garcia Rehder

Membro Suplente

CPQBA – UNICAMP

RESUMO

Saponinas são compostos que se destacam por apresentarem ações farmacológicas, e também por serem empregadas nas indústrias de alimentos e de cosméticos devido às suas propriedades físico-químicas, tais como agentes de superfície. Processos de extração com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), como substituto de solventes orgânicos tóxicos representam uma boa opção para extração de compostos bioativos, pois produzem extratos e resíduos isentos de solventes indesejáveis sendo, portanto, tecnologias limpas. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo extrair e fracionar saponinas a partir de três fontes vegetais, sendo elas raízes de *Pfaffia glomerata* e de *Hebanthe eriantha*, conhecidas como ginseng brasileiro, e frutos de *Melia azedarach*, utilizando um processo sequencial em leito fixo usando scCO₂, etanol e água como solventes. As extrações foram realizadas a 50 °C e 300 bar e em quatro etapas sequenciais. Na primeira etapa utilizou-se como solvente scCO₂, na segunda escoou-se pelo leito fixo uma mistura scCO₂ + etanol na proporção 70:30 (m/m) e, etanol puro e uma mistura etanol/água (70:30 v/v) foram usados nas terceira e quarta etapas, respectivamente. A eficiência do processo de extração e fracionamento foi avaliada com base: 1) nos valores de rendimento de extração, 2) na presença de saponinas, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e 3) pela capacidade de redução da tensão superficial de soluções aquosas. Os extratos de *M. azedarach* ainda foram avaliados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais, perfil químico de compostos voláteis por CG-EM e por espectrometria de massas (ESI-EM). As raízes estudadas apresentaram curvas de extração (cinética) e rendimento semelhantes entre si nas três primeiras etapas. Os rendimentos de extração para as quatro etapas de extração foram 0,16; 0,55; 1,00 e 6,9 % para raízes de *P. glomerata* e 0,17; 0,58; 0,89 e 28 % para raízes de *H. eriantha*, respectivamente, indicando presença majoritária de compostos de maior polaridade nestas espécies. Os rendimentos de extração a partir de frutos de *M. azedarach* apresentaram-se maiores (7,6; 6,4; 19 e 12,3 %) que os de raízes de ginseng brasileiro. As análises por CCD mostraram que o processo de extração foi seletivo de acordo com a polaridade do solvente utilizado, fornecendo frações enriquecidas em diferentes compostos. Os extratos das três matrizes vegetais obtidos pela mistura de dióxido de carbono e etanol (SCEE) apresentaram a maior redução da tensão superficial, apresentando valores de 25,0; 25,0 e 26,9 mN.m⁻¹ para

P. glomerata, *H. eriantha* e *M. azedarach*, respectivamente, contra 36,3 mN.m⁻¹ para solução de surfactante sintético (dodecil sulfato de sódio). Este resultado sugere que esta capacidade está associada a presença de saponinas de menor polaridade. E, ainda, verificou-se que as saponinas de ginseng brasileiro apresentam concentração micelar crítica (CMC) ≤ 20 g.L⁻¹. Os maiores teores de compostos fenólicos dos extratos de *M. azedarach* foram obtidos nos extratos hidroalcoólico (21,6 mg de EAG/g de extrato) e SCEE (20,6 mg de EAG/g de extrato). Não foi verificada presença significativa de compostos voláteis em frutos de *M. azedarach* por CG-EM. Análises de EM identificaram ácidos graxos (linoleico, palmítico e mirístico) e azedaraquina C (limonoide) no extrato supercrítico e compostos fenólicos (ácido cafeico e ácido málico) nos demais extratos. Por fim, o dióxido de carbono supercrítico mostrou-se seletivo às saponinas com maior capacidade de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas, quando utilizado com etanol como cossolvente e, no geral, o processo de extração sequencial em leito fixo utilizando o solventes “verdes” apresentou-se como uma boa alternativa ao uso de solventes orgânicos para extrair e fracionar saponinas presentes em diferentes fontes vegetais.

Palavras-chave: Extração supercrítica, saponinas, *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha*, *Melia azedarach*.

ABSTRACT

Saponins are compounds that stand out due to their pharmacological actions, and also because they are employed by food and cosmetics industry due to its physicochemical properties, such as surfactants. Extraction processes with supercritical carbon dioxide (scCO₂) as a substitute of toxic organic solvents represent a good option for extracting biocompounds since they obtain free of undesirable solvents extracts and residues thus being a green technology. Therefore, this study aimed to extract and fractionate saponins of three plant sources: roots of *Pfaffia glomerata* and *Hebanthe eriantha* (Brazilian ginseng) and fruits of *Melia azedarach*, by a sequential process in fixed bed using scCO₂, ethanol and water as solvents. The extractions were performed at 50 °C and 300 bar in four sequential steps. In the first step scCO₂ was used as solvent; in the second scCO₂/ethanol mixture, mass ratio 70:30 (w/w); pure ethanol and ethanol/water mixture 70:30 (v/v) were used in the third and fourth stages, respectively. The efficiency of extraction and fractionation process was evaluated based on: 1) the extraction yield, 2) presence of saponins, which were monitored by thin layer chromatography (TLC) and 3) the potential of extracts to reduce the surface tension of aqueous solutions. The extracts of *Melia azedarach* also were evaluated for their content of total phenols and flavonoids, chemical profile by GC-MS and mass spectrometry (ESI-MS). The roots studied presented similar overall extraction curves (kinetic) and yields in the first three steps. The extraction yields for the four stages of extraction were 0.16, 0.55, 1.00 and 6.9 % for roots of *P. glomerata* and 0.17, 0.58, 0.89 and 28 % for *H. eriantha* roots, respectively, showing predominant presence of polar compounds in these species. The extraction yields from fruits of *M. azedarach* were higher (7.6, 6.4, 19 and 12.3 %) than roots of Brazilian ginseng. Analyses by TLC indicated that process was selective in accordance with the polarity of the solvent used providing fractions enriched in different compounds. The extracts of three plant matrices obtained by carbon dioxide and ethanol mixture (SCEE) presented highest ability to reduce surface tension, with values of 25.0, 25.0 and 26.9 mN.m⁻¹ for *P. glomerata*, *H. eriantha* and *M. azedarach*, respectively, against 36.3 mN.m⁻¹ for a synthetic surfactant solution (sodium dodecyl sulphate). This result suggests that ability is associated with the presence of less polar saponins. And further, Brazilian ginseng saponins have critical micelle concentration (CMC) ≤ 20 g.L⁻¹. The highest levels of phenolic

compounds of *M. azedarach* were obtained in hydroalcoholic extract (21.6 mg EAG/g extract) and SCEE (20.6 mg EAG/g extract). It was not observed a significant presence of volatile compounds in fruits of *M. azedarach* by GC-MS. ESI-MS analyses identified fatty acids (linoleic, palmitic and myristic acid) and azedarachin C (limonoid) in supercritical extract (SCE) and the presence of phenolic compounds (caffeic and malic acid) in the other extracts. Finally, the supercritical carbon dioxide has shown to be selective for saponins with the highest capacity to reduce the surface tension of water when used with ethanol as cosolvent. In general, process of sequential fixed bed extraction with green solvents represents a great alternative instead of using organic solvents to extract and fractionate saponins present in different plant sources.

Keywords: Supercritical extraction, saponins, *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha*, *Melia azedarach*.

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
Agradecimentos.....	xvii
Lista de Figuras.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxv
Lista de Abreviaturas/Siglas/Símbolos	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 10bjetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Saponinas.....	5
3.1.1 Estrutura	5
3.1.2 Atividades Biológicas e Aplicações	6
3.1.3 Métodos de Extração	7
3.2 Tecnologia Supercrítica	10
3.2.1 Fluidos Supercríticos	10
3.2.2 Utilização de Cossolventes	12
3.2.3 Extração em Leito Fixo	13
3.2.4 Curva Global de Extração.....	14
3.3 Matrizes Vegetais.....	16
3.3.1 <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	16
3.3.2 <i>Hebanthe eriantha</i> (Poir.) Pedersen	18
3.3.3 <i>Melia azedarach</i> L.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Seleção e Preparo das Matérias-Primas	26
4.2 Caracterização das Matérias-Primas.....	27
4.2.1 Voláteis totais	27

4.2.2	Umidade	28
4.2.3	Diâmetro médio das partículas	28
4.2.4	Densidade real das partículas	29
4.2.5	Densidade aparente.....	29
4.2.6	Porosidade do leito de partículas	29
4.3	Extração em Sistema Soxhlet.....	29
4.4	Extração Sequencial em Leito Fixo.....	30
4.4.1	Cinética de Extração	36
4.5	Métodos de Análises dos Extratos.....	37
4.5.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
4.5.2	Tensão Superficial	38
4.5.3	Fenóis Totais	38
4.5.4	Flavonoides Totais.....	39
4.5.5	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	40
4.5.6	Espectrometria de Massas (EM).....	41
4.6	Análises Estatísticas.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Resultados Preliminares	43
5.2	Caracterização das Matérias-Primas.....	44
5.3	Rendimentos e Cinéticas de Extração.....	46
5.3.1	Rendimentos de Extração	46
5.3.2	Cinéticas de Extração	52
5.4	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	58
5.5	Tensão Superficial	66
5.6	Fenóis e Flavonoides Totais	75
5.7	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).....	77
5.8	Espectrometria de Massas por ESI.....	81
6.	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICES	103
	Apêndice A - Estrutura de Compostos Químicos.....	105

Apêndice B - Resultados Preliminares	108
Apêndice C - Análises Granulométricas	110
Apêndice D - Dados de Extração	113
Apêndice E - Cromatogramas (CCD).....	122
Apêndice F - Curvas Analíticas.....	132
Apêndice G - Cromatogramas obtidos por CG-EM	135
Apêndice H - Espectros de Massas	137

Aos meus pais Izabel e Antônio

Por sempre me apoiarem e por incentivarem a realização deste trabalho.

Por serem exemplos de força e determinação.

Agradeço pelo amor incondicional.

Com amor, dedico-lhes esta Dissertação de Mestrado.

Agradecimentos

*Ao **Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral** pela orientação, confiança, oportunidades oferecidas e ensinamentos. Enfim, pelo exemplo de profissional;*

*À **Dra. Carmen Lucia Queiroga**, pela coorientação, ensinamentos e dedicação a este trabalho;*

*À **FAPESP**, pelo suporte financeiro e bolsa de estudo concedidos;*

*Ao **CNPQ**, pela bolsa de estudos;*

*Aos **professores da banca examinadora**, pelas valiosas correções e sugestões que foram imprescindíveis para a redação final da tese;*

*Ao meu namorado **Augusto** pelo companheirismo, paciência nos momentos difíceis e por tornar essa caminhada muito mais tranquila;*

*Aos **meus familiares**, em particular meus pais e minha irmã Isabela por me apoiarem na realização deste trabalho;*

*Aos **amigos do DEA**, pelas tardes de estudo, pelos momentos de desespero e descontração divididos;*

*Aos **amigos do ExTrAE**, pelos momentos compartilhados que tornaram os dias no laboratório muito mais alegres;*

*À **Tábata**, pela ajuda, paciência e disposição demonstradas no início do desenvolvimento deste projeto;*

*Ao **funcionários do DEA**, pela atenção e disponibilidade;*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Lista de Figuras

Figura 3.1 Estrutura de uma saponina triterpênica de <i>Kochia scoparia</i> L. (a) (Matsuda et al., 1999) e uma saponina nor-triterpênica de <i>Pfaffia paniculata</i> Kuntze (b). Adaptado de Nishimoto et al. (1984).	6
Figura 3.2 Estrutura de uma saponina esteroidal bidesmosídica de <i>Asparagus officinalis</i> L. (Dawid e Hofmann, 2014).	6
Figura 3.3 Diagrama Pressão-Temperatura para um componente puro (Roca, 2009).	11
Figura 3.4 Diagrama esquemático de um sistema de extração supercrítica (Martinez-Correa, 2010).	14
Figura 3.5 Curva de extração supercrítica com suas etapas: etapa de taxa de extração constante (CER); etapa de taxa de extração decrescente (FER) e período difusional (DC). Adaptado de Campomanes (2012).	15
Figura 3.6 Aspecto geral das raízes e partes aéreas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Marques, 1998).	17
Figura 3.7 Raízes expostas de <i>Pfaffia paniculata</i> (a) e após limpeza (b) (Marchioretto, 2008).	19
Figura 3.8 Árvore e frutos de <i>Melia azedarach</i> (Ferreiro et al., 2010).	21
Figura 4.1 Procedimento experimental para raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Hebanthe eriantha</i>	24
Figura 4.2 Procedimento experimental para frutos de <i>Melia azedarach</i>	25
Figura 4.3 Fotos das matrizes vegetais secas e moídas: <i>Pfaffia glomerata</i> (a), <i>Hebanthe eriantha</i> (b) e <i>Melia azedarach</i> (c).	27
Figura 4.4 Esquema da unidade experimental de extração em leito fixo.	31
Figura 4.5 Fluxograma do processo de extração sequencial em leito fixo.	32
Figura 5.1 Comparação entre os rendimentos de extração para <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Hebanthe eriantha</i> e <i>Melia azedarach</i>	49
Figura 5.2 Análises estatísticas dos rendimentos de extração para raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Hebanthe eriantha</i> e <i>Melia azedarach</i> . Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).	51
Figura 5.3 Curva global de extração para raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO ₂ ; etapa 2: mistura scCO ₂ /etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).	52
Figura 5.4 Curvas de extração para raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO ₂ ; etapa 2: mistura scCO ₂ /etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).	53

- Figura 5.5** Curva global de extração para raízes de *Hebanthe eriantha* em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v). 54
- Figura 5.6** Curvas de extração para raízes de *Hebanthe eriantha* em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v). 55
- Figura 5.7** Curva global de extração para frutos de *Melia azedarach* em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v). 56
- Figura 5.8** Curvas de extração para frutos de *Melia azedarach* em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v). 57
- Figura 5.9** Extratos de *Pfaffia glomerata* (a), *Hebanthe eriantha* (b) e *Melia azedarach* (c). 58
- Figura 5.10** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 60
- Figura 5.11** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha*. Aplicação: 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 62
- Figura 5.12** Cromatogramas (CCD) dos extratos de *Melia azedarach*. Aplicação: 1: extrato acetato de etila por Soxhlet (referência); 2: extrato metanólico por Soxhlet (referência) 3: SCE – extrato supercrítico; 4: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 5: EE – extrato etanólico; 6: HE: extrato hidroalcoólico; 7: resíduo final; 8: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 9: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 10: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 11: extrato metanólico bruto de *Pfaffia glomerata* (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 64
- Figura 5.13** Gráfico de tensão superficial vs. concentração para soluções aquosas de dodecil sulfato de sódio (SDS). 68
- Figura 5.14** Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de raízes de *Pfaffia glomerata*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais (p < 0,05). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio 1,0 g.L⁻¹ (surfactante sintético). 69

Figura 5.15 Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de raízes de <i>Hebanthe eriantha</i> . Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio 1,0 g.L ⁻¹ (surfactante sintético).	71
Figura 5.16 Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de frutos de <i>Melia azedarach</i> . Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio (surfactante sintético).	72
Figura 5.17 Comparação entre tensões superficiais de extratos de <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Hebanthe eriantha</i> e <i>Melia azedarach</i> a 20 g.L ⁻¹ . SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio 1,0 g.L ⁻¹ (surfactante sintético).	73
Figura 5.18 Comparação das concentrações e rendimentos de fenóis e flavonoides totais em extratos de <i>Melia azedarach</i> . Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).	76
Figura 5.19 Cromatograma (CG-EM) do extrato retido no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de <i>Melia azedarach</i>	78
Figura 5.20 Cromatograma (CG-EM) dos constituintes químicos do extrato supercrítico (SCE) de frutos de <i>Melia azedarach</i>	80
Figura 5.21 Espectros de massas ESI-MS do extrato supercrítico (SCE) de <i>Melia azedarach</i> : (a) ESI(-)-MS e (b) ESI(+)-MS.	82
Figura 5.22 Espectro de massas ESI(-)-MS do extrato supercrítico com etanol (SCEE) de <i>Melia azedarach</i>	84
Figura 5.23 Espectro de massas ESI(-)-MS do extrato etanólico (EE) de <i>Melia azedarach</i>	85
Figura 5.24 Espectro ESI(-)-MS/MS do íon m/z 521 do extrato etanólico (EE) de <i>Melia azedarach</i>	86
Figura 5.25 Espectro ESI(-)-MS/MS do íon m/z 683 do extrato etanólico (EE) de <i>Melia azedarach</i>	86
Figura A.1 Estrutura de alguns compostos presentes em raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> (Nakamura et al., 2010)	105
Figura A.2 Estrutura de alguns compostos presentes em raízes de <i>Hebanthe eriantha</i> (Takemoto et al., 1983; Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984).	106
Figura A.3 Estrutura de alguns compostos presentes em frutos de <i>Melia azedarach</i> (Aoudia et al., 2012; Orhan et al., 2012b).	107
Figura B.1 Cinética de extração em leito fixo em etapas sequenciais (SCE, SCEE, EE, HE) a partir do extrato metanólico convencional de <i>Pfaffia glomerata</i>	108

- Figura B.2** Cromatograma (CCD) das frações obtidas pela extração sequencial em etapas sequencias a partir do extrato metanólico convencional de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: EB: extrato metanólico bruto; 1 a 8: extrato supercrítico (SCE); 9 a 21: extrato supercrítico com etanol como cossolvente (SCEE); 22 a 35, 49 e 50: extrato etanólico (EE); 36 a 470: extrato hidroalcoólico (HE); 48: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 109
- Figura C.1** Distribuição das partículas de raízes moídas de *Pfaffia glomerata*. 110
- Figura C.2** Distribuição das partículas de raízes moídas de *Hebanthe eriantha*. 111
- Figura C.3** Distribuição das partículas de frutos moídos de *Melia azedarach*. 112
- Figura E.1** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 1). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-32: EE – extrato etanólico; 33-45: HE – extrato hidroalcoólico; 46: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 122
- Figura E.2** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 2). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-32: EE – extrato etanólico; 33-45: HE – extrato hidroalcoólico; 46: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 123
- Figura E.3** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 3). 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 124
- Figura E.4** Cromatograma (CCD) dos padrões de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: 1: extrato metanólico bruto (referência); 2: β -ecdisona 2 mg.mL⁻¹ (1 μ L); 3: e β -ecdisona 2 mg.mL⁻¹ (2 μ L). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 125
- Figura E.5** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha* (Corrida 1). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-33: EE – extrato etanólico; 34-46: HE – extrato hidroalcoólico; 47: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 126
- Figura E.6** Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha* (Corrida 2). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-33: EE – extrato etanólico; 34-46: HE – extrato hidroalcoólico; 47: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído. 127

Figura E.7 Cromatograma (CCD) dos extratos de <i>Hebanthe eriantha</i> (Corrida 3). 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.	128
Figura E.8 Cromatograma (CCD) dos extratos de <i>Melia azedarach</i> (Corrida 1). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: extrato metanólico bruto de <i>Pfaffia glomerata</i> (referência); 4-12: SCE – extrato supercrítico; 13-25: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 26-38: EE – extrato etanólico; 39-51: HE: extrato hidroalcoólico; 52: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.	129
Figura E.9 Cromatograma (CCD) dos extratos de <i>Melia azedarach</i> (Corrida 2). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: extrato metanólico bruto de <i>Pfaffia glomerata</i> (referência); 4-12: SCE – extrato supercrítico; 13-25: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 26-38: EE – extrato etanólico; 39-51: HE: extrato hidroalcoólico; 52: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.	130
Figura E.10 Cromatograma (CCD) dos extratos de <i>Melia azedarach</i> (Corrida 3). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: SCE – extrato supercrítico; 4: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 5: EE – extrato etanólico; 6: HE: extrato hidroalcoólico; 7: resíduo final; 8: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 9: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 10: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 11: extrato metanólico bruto de <i>Pfaffia glomerata</i> (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.	131
Figura F.1 Curva analítica de Ácido Gálico.	132
Figura F.2 Curva analítica de Catequina.....	133
Figura F.3 Curva Analítica de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).....	134
Figura G.1 Cromatograma (CG) da amostra retida no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de <i>Melia azedarach</i> utilizando método 1. O pico 1 ($t_r = 59,14$ min, MM =336) corresponde ao pico 5 ($t_r = 28,28$ min, MM = 336) da Figura 5.19, identificado como um éster derivado do ácido linoleico.	135
Figura G.2 Cromatograma (CG) da amostra retida no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de <i>Melia azedarach</i> utilizando método 2.	135
Figura G.3 Cromatograma (CG) do extrato supercrítico (SCE) de frutos de <i>Melia azedarach</i> utilizando método 2.....	136
Figura H.1 Espectros de massas (ESI-MS) de extratos de <i>Melia azedarach</i> . Extrato supercrítico (SCE): ESI(+)-MS (a) e ESI(-)-MS (a'). Extrato supercrítico com etanol (SCEE): ESI(+)-MS (b) e ESI(-)-MS (b').	137

Figura H.2 Espectros de massas (ESI-MS) de extratos de *Melia azedarach*. Extrato etanólico (EE): ESI(+)-MS (c) e ESI(-)-MS (c'). Extrato hidroalcoólico (HE): ESI(+)-MS (d) e ESI(-)-MS (d').
..... 138

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Métodos de extração de saponinas descritos em literatura.	9
Tabela 3.2 Condições críticas para alguns solventes (Sun, 2002).	12
Tabela 4.1 Dados de coleta das matérias-primas empregadas neste estudo.	26
Tabela 4.2 Especificações técnicas dos equipamentos ou instrumentos da unidade de extração em leito fixo.	31
Tabela 4.3 Etapas da extração sequencial em leito fixo.	33
Tabela 4.4 Métodos de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas utilizados para análises de extratos de frutos de <i>Melia azedarach</i>	40
Tabela 5.1 Rendimento de extração obtido a partir do extrato metanólico convencional de <i>Pfaffia glomerata</i>	43
Tabela 5.2 Caracterização das matrizes vegetais após pré-processamento.	45
Tabela 5.3 Rendimentos de extração em leito fixo a 300 bar e 50 °C para extratos de <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Hebanthe eriantha</i> e <i>Melia azedarach</i>	47
Tabela 5.4 Análises de tensão superficial de soluções aquosas de extratos de <i>Pfaffia glomerata</i> , <i>Hebanthe eriantha</i> e <i>Melia azedarach</i>	66
Tabela 5.5 Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (Nitschke e Pastore, 2002).	70
Tabela 5.6 Concentração e rendimento de fenóis e flavonoides totais para extratos de <i>Melia azedarach</i>	75
Tabela 5.7 Compostos identificados no extrato retido na armadilha Porapak-Q (SCE-V) de frutos de <i>Melia azedarach</i> por CG-EM.	79
Tabela 5.8 Compostos identificados no extrato supercrítico (SCE) de frutos de <i>Melia azedarach</i> por CG-EM.	80
Tabela C.1 Análise granulométrica de raízes moídas de <i>Pfaffia glomerata</i>	110
Tabela C.2 Análise granulométrica de raízes moídas de <i>Hebanthe eriantha</i>	111
Tabela C.3 Análise granulométrica de frutos moídos de <i>Melia azedarach</i>	112
Tabela D.1 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,0926 g).	113

Tabela D.2 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0708 g).	114
Tabela D.3 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0405 g).	115
Tabela D.4 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Hebanthe eriantha</i> – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,3319 g).	116
Tabela D.5 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Hebanthe eriantha</i> – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0556 g).	117
Tabela D.6 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de <i>Hebanthe eriantha</i> – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0620 g).	118
Tabela D.7 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de <i>Melia azedarach</i> – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,0759 g).	119
Tabela D.8 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de <i>Melia azedarach</i> – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0824 g).	120
Tabela D.9 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de <i>Melia azedarach</i> – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0869 g).	121

Lista de Abreviaturas/Siglas/Símbolos

ASE - *Accelerated Solvent Extraction* (extração acelerada por solvente)

b.s. - base seca

b.u. - base úmida

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CER - *Constant Extraction Rate* (período de taxa constante de extração)

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CMC – *Critical Micelle Concentration* (concentração micelar crítica)

CPQBA - Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DC - *Diffusion Controlled* (etapa controlada pela difusão)

d_{gw} - Diâmetro Médio das Partículas

EAG – Equivalente em Ácido Gálico

EC – Equivalente em Catequina

EE - Extrato Etanólico

EM - Espectrometria de Massas

ESI(-)-MS - Ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massas no modo negativo

ESI(+)-MS - Ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massas no modo positivo

ExTrAE - Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio

FER - *Falling Extraction Rate* (período de taxa decrescente de extração)

GC/EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

GRAS - *Generally Recognized As Safe* (geralmente reconhecido como seguro)

HE - Extrato Hidroalcoólico

HRE - *Heat Reflux Extraction* (extração por refluxo sob aquecimento)

MAE - *Microwave-assisted Extraction* (extração assistida por micro-ondas)

m/z - massa/carga

OEC - *Overall Extraction Curve* (curva global de extração)

P_c - Pressão crítica

PLE - *Pressurized Liquid Extraction* (extração com líquido pressurizado)

PLPW - *Pressurized Low Polarity Water Extraction* (extração com água pressurizada de baixa polaridade)

R_f – Fator de Retenção

scCO₂ - Dióxido de carbono supercrítico

SAE - *Supercritical Antisolvent Extraction* (Extração com anti-solvente supercrítico)

SCE - Extrato Supercrítico

SCE-V – Fração Volátil do Extrato Supercrítico

SCEE - Extrato da Mistura Supercrítico + Etanol

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SF - *Supercritical Fluid* (Fluido supercrítico)

SFE - *Supercritical Fluid Extraction* (Extração com fluidos supercríticos)

TLC - *Thin Layer Chromatography* (Cromatografia em camada delgada)

T_c - Temperatura crítica

U – Teor de Umidade (%)

UAE - *Ultrasound-assisted Extraction* (extração assistida por ultrassom)

UPE - *Ultrahigh Pressure Extraction* (extração sob alta pressão)

VT - Teor de Voláteis Totais (%)

λ - Comprimento de Onda

ρ_r - Densidade Real das Partículas

ρ_a - Densidade Aparente do Leito

ε - Porosidade do Leito

1. Introdução

Nos últimos anos, extratos vegetais contendo substâncias bioativas estão sendo amplamente estudados, uma vez que podem ser usados na formulação de alimentos funcionais, como matéria-prima para a produção de medicamentos e cosméticos ou como substitutos de produtos sintéticos nas indústrias de alimentos.

A separação de compostos polares, como as saponinas de origem vegetal, é de grande interesse industrial devido à sua aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Sua abundância na natureza resulta em uma grande variedade de produtos naturais que podem ser exploradas para sua produção comercial.

Saponinas são compostos bioativos que geralmente são produzidos por plantas para neutralizar agentes patogênicos e herbívoros. Além de seu papel na defesa da planta, as saponinas possuem grande interesse por serem componentes ativos de medicamentos e por suas propriedades farmacológicas valiosas. Dentre as ações biológicas atribuídas às saponinas há relatos de propriedades imunoestimulantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antivirais (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007). Consequentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas para desvendar os modos de ação das saponinas, bem como na exploração de seu potencial para processos industriais (Augustin et al., 2011).

Devido à diversidade de suas aplicações e evidências dos seus benefícios à saúde, diversos métodos de extração destes compostos vêm sendo estudados, inclusive em escala industrial. Neste contexto, destaca-se a utilização da tecnologia supercrítica. Extrações envolvendo fluidos supercríticos para a obtenção de produtos naturais têm sido amplamente exploradas por, geralmente, fornecer bons rendimentos de extração e extratos enriquecidos em componentes de interesse. Dentre os solventes facilmente utilizados no estado de fluido supercrítico encontra-se o dióxido de carbono, pois quando aplicado a alimentos e fármacos, este produz extratos limpos, sem geração de resíduos tóxicos.

No entanto, a extração com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) puro está restrita à extração de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade. Diante desta situação, uma opção para empregar o scCO₂ na extração de compostos de maior polaridade, como as saponinas, é utilizar etanol ou água como cossolvente do scCO₂ para aumentar a polaridade do solvente. A água e o etanol possuem polaridades diferentes à do scCO₂ e não há restrições de órgãos governamentais e ambientais quanto ao seu uso, desde que com qualidade adequada às normas vigentes.

Técnicas de extração que envolvem diversas etapas sequenciais com scCO₂ e combinações entre scCO₂, etanol e água têm obtido grande sucesso para extração e fracionamento de antocianinas e compostos fenólicos no geral (Seabra et al., 2010; Paula et al., 2013). Além desses estudos, Martinez-Correa et al. (2012) estudou a influência da extração supercrítica prévia às extrações convencionais com água e etanol, obtendo extratos mais enriquecidos nos compostos de interesse.

As espécies *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen são plantas encontradas no Brasil e bastante utilizadas na medicina popular, há anos, devido às suas propriedades medicinais. Elas são popularmente conhecidas como ginseng brasileiro e as saponinas são apontadas como seus constituintes ativos (Rates e Gosmann, 2002). Dentre os diversos estudos relacionados às propriedades biológicas de *Pfaffia glomerata* há relatos de propriedades antioxidante (De Souza Daniel et al., 2005), anti-hiperglicemiante (Sanches et al., 2008), antimicrobiana (Alcântara, 1994; Neto et al., 2004) e tônica (Marques et al., 2002).

Dentre os estudos relacionados aos efeitos terapêuticos de raízes de *Hebanthe eriantha* observa-se que a principal atividade atribuída a esta espécie é a atividade antineoplásica (Watanabe et al., 2000; Da Silva et al., 2005; Matsuzaki et al., 2006; Nagamine et al., 2009; Da Silva et al., 2010). Além disso, há também confirmação de atividade analgésica e anti-inflamatória (Mazzanti e Braghiroli, 1994).

A *Melia azedarach* L. é uma árvore conhecida como cinamomo e, assim como *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, possui ampla utilização popular e já teve muitos princípios

ativos isolados e várias ações farmacológicas testadas e comprovadas. Dentre estas ações, destacam-se a atividade antiviral (Wachsman et al., 1982; Andrei et al., 1986; Wachsman et al., 1998), antimicrobiana (Khan et al., 2011; Orhan et al., 2012a), inseticida (Carpinella et al., 2007; Mckenna et al., 2013; Scapinello et al., 2013), citotóxica (Akihisa et al., 2013; Yuan et al., 2013) e anti-inflamatória (Aoudia et al., 2013). Seus frutos, quando verdes, apresentam saponinas, porém, diferentemente das raízes de ginseng brasileiro, estes apresentam outras classes de compostos de importância biológica, como limonoides e compostos fenólicos.

Neste contexto, este projeto visou extrair e fracionar saponinas de raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* e de frutos de *Melia azedarach* utilizando um processo de extração sequencial em leito fixo no qual se utilizava scCO₂ e combinações dos solventes scCO₂, etanol e água, para se obter extratos fracionados e enriquecidos em saponinas de interesse.

A escolha das plantas foi realizada com base em estudos já realizados no CPQBA-UNICAMP que verificaram atividade anti-inflamatória, associada à presença de saponinas, em raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* (Fapesp – proc. N° 06/06059-3) e de projetos do CPQBA em colaboração com o IB-UNICAMP, nos quais se estuda a propriedade antiviral de frutos de *Melia azedarach*. Além disso, como o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da utilização de uma nova metodologia para extração de saponinas, era importante verificar se o processo seria eficiente quando fosse realizado a partir de matrizes vegetais que apresentam algumas similaridades quanto à composição química, como a *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*; e, ainda, se a metodologia proposta permitiria extrair saponinas presentes em outras matrizes vegetais com composição química bem diversificada e diferente das demais espécies testadas, como no caso de frutos de *Melia azedarach*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar a viabilidade técnica do uso de scCO₂, etanol e água como solventes em processo sequencial em leito fixo para extrair e fracionar saponinas presentes em raízes de *Pfaffia glomerata* e de *Hebanthe eriantha* e em frutos de *Melia azedarach*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as matérias-primas secas e moídas: raízes de *Pfaffia glomerata* e de *Hebanthe eriantha* e frutos de *Melia azedarach*, quanto ao teor de umidade, voláteis totais, diâmetro médio das partículas, densidade real, densidade aparente e porosidade do leito;
- Extrair e fracionar saponinas por extração sequencial em leito fixo utilizando como solventes combinações de scCO₂, etanol e água a partir de raízes de *Pfaffia glomerata* e de *Hebanthe eriantha* e de frutos de *Melia azedarach*;
- Avaliar a cinética de extração sequencial em leito fixo e a eficiência do processo com base nos dados de rendimento de extração;
- Caracterizar e avaliar os extratos obtidos quanto ao perfil de saponinas por cromatografia em camada delgada e por análises de tensão superficial;
- Analisar extratos de *Melia azedarach* por espectrometria de massas e quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais por espectrofotometria;
- Analisar as frações apolares de *Melia azedarach* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Saponinas

Saponinas ou saponosídeos são compostos bioativos geralmente produzidos por plantas para neutralizar agentes patogênicos e herbívoros (Augustin et al., 2011). Elas são encontradas em mais de 100 famílias de plantas e em algumas espécies marinhas (Hostettmann e Marston, 1995).

A palavra saponina é originária do latim *sapo* (em português: sabão), refletindo a grande capacidade das saponinas para formar espumas estáveis em soluções aquosas (Augustin et al., 2011).

3.1.1 Estrutura

As saponinas são glicosídeos de alta massa molecular e representam um conjunto de compostos que apresentam um núcleo fundamental denominado aglicona ou sapogenina. Esta pode ser constituída de um triterpeno ou esteroide, e está covalentemente ligada a diferentes números e tipos de unidades de açúcar.

A classificação destes saponosídeos geralmente é feita de acordo com a aglicona, podendo ser denominados saponinas triterpênicas ou saponinas esteroidais. Exemplos de estruturas de saponinas triterpênicas e esteroidais podem ser visualizados nas Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente. Além disso, as saponinas são classificadas de acordo com o número de cadeias de açúcar em sua estrutura como mono-, di- ou tridesmosídicas, sendo que os monossacarídeos mais comumente encontrados em suas estruturas incluem: D-glucose, D-galactose, D-ácido galacturônico, D-ácido glucurônico, L-arabinose, D-xilose, e D-fucose.

Como a natureza da aglicona, os grupos funcionais no esqueleto da aglicona, o número e a natureza dos açúcares podem variar muito, resulta em um grupo diversificado de compostos (Hostettmann e Marston, 1995).

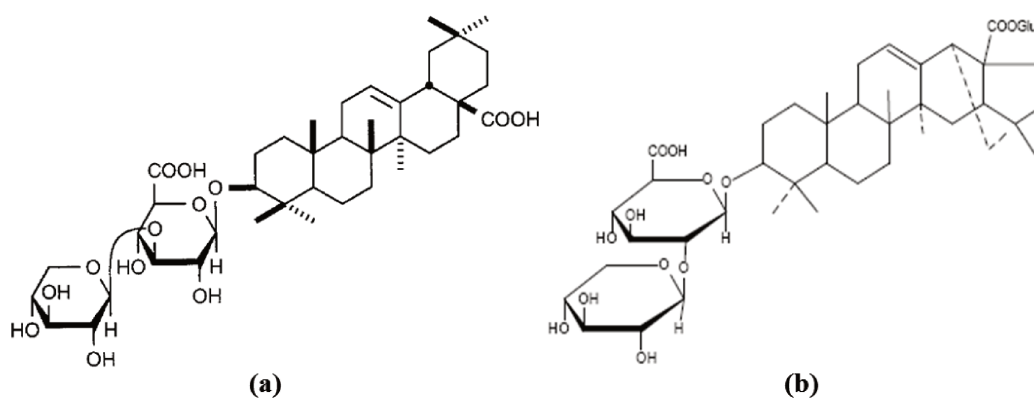


Figura 3.1 Estrutura de uma saponina triterpênica de *Kochia scoparia* L. (a) (Matsuda et al., 1999) e uma saponina nor-triterpênica de *Pfaffia paniculata* Kuntze (b). Adaptado de Nishimoto et al. (1984).

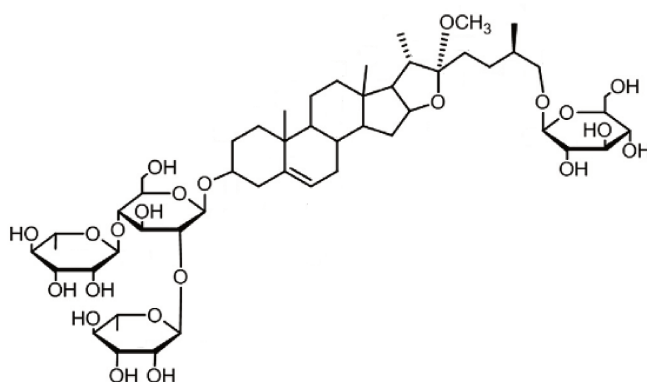


Figura 3.2 Estrutura de uma saponina esteroidal bidesmosídica de *Asparagus officinalis* L. (Dawid e Hofmann, 2014).

3.1.2 Atividades Biológicas e Aplicações

Além de seu papel na defesa de plantas, as saponinas possuem grande importância comercial por suas propriedades farmacológicas valiosas (Augustin et al., 2011). Elas são amplamente exploradas nos setores alimentício, farmacêutico e da agricultura, principalmente, como agentes de espuma e devido sua atividade superficial (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007). Porém, de acordo com Ceyhun Sezgin e Artik (2010) elas apresentam aplicação limitada para alimentos por apresentarem gosto amargo.

A ação lipofílica das saponinas facilita a complexação das mesmas com esteroides, proteínas e fosfolipídeos das membranas celulares alterando a permeabilidade das mesmas, ou causando sua destruição. Baseado nesta ação sobre as membranas observam-se as atividades hemolíticas e espermicidas (Schenkel et al., 1999). Além disso, outros efeitos biológicos já foram atribuídos às saponinas. Há relatos de propriedade imunoestimulante, anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antialérgica e antioxidante, dentre outras (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007). Apesar das ações benéficas descritas, elas também são responsáveis por afetar significativamente o crescimento, o consumo de ração e a capacidade de reprodução em animais (Francis et al., 2002).

Nas indústrias de alimentos, em geral, as saponinas são utilizadas como agentes de espuma na forma de aditivos, principalmente em bebidas como refrigerantes e cervejas (San Martín e Briones, 1999). Devido à sua capacidade de complexação com colesterol, as saponinas também são utilizadas para remoção de colesterol de produtos lácteos, porém este processo consiste em uma etapa do processamento, ou seja, após complexação com colesterol elas são removidas por filtração (Jimenez-Flores e Richardson, 1994).

Nos Estados Unidos e Japão extratos de algumas fontes naturais contendo saponinas são classificados como aditivos de alimentos. No Japão, extratos de *Quillaia* (*Quillaja saponaria* Mol Fla) ricos em saponinas são usados como emulsificante em preparações contendo corantes e aromas lipofílicos para refrigerantes, vegetais fermentados e molhos (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007).

3.1.3 Métodos de Extração

Devido à diversidade de suas aplicações e evidências dos seus benefícios à saúde, diversos métodos de extração de saponinas vêm sendo estudados.

A extração e isolamento das saponinas constituem um desafio para os pesquisadores devido às diferenças estruturais resultantes da variedade de substituições como grupos OH, CH₃ ou COOH na porção aglicona. Isto é, além do número, da disposição e orientação das unidades de açúcar, o tipo da cadeia de açúcar ligada à porção aglicona também influencia a

eficiência da extração. Além disso, as saponinas possuem elevada polaridade, são química e termicamente instáveis, não voláteis, e geralmente encontradas em baixas concentrações em plantas (Majinda, 2012).

De acordo com Majinda (2012), o solvente utilizado para a extração, as condições de extração (temperatura, pH e a razão de solvente e matriz vegetal) e as propriedades do material vegetal (composição e tamanho de partículas) são os fatores mais importantes na determinação da eficiência do processo de extração de saponinas.

Os métodos tradicionais de extração de materiais vegetais com solvente são, em sua maioria, baseados na escolha dos solventes, uso de calor e/ou agitação para aumentar a solubilidade do material e a taxa de transferência de massa (Wu et al., 2001). As extrações em Soxhlet e extrações por refluxo sob aquecimento são exemplos destas metodologias. Para extração de saponinas, utiliza-se o material vegetal em pó e metanol, etanol, água ou soluções hidroalcoólicas como solvente. Porém, estas metodologias apresentam algumas desvantagens: elas requerem longo tempo de extração, maiores quantidades de solvente, e em alguns casos fornecem menor eficiência de extração (Majinda, 2012).

Visando melhorar a eficiência do processo, reduzir o tempo de extração e o consumo de solventes sem comprometer a qualidade da amostra, novos métodos de extração vêm sendo estudados, como extrações com fluidos supercríticos (SFE) e extrações assistidas por micro-ondas (MAE) e ultrassom (UAE), que representam alternativas relativamente baratas, simples e eficientes (Majinda, 2012).

Sun et al. (2010) realizaram extrações de saikosaponinas a, c e d utilizando fluidos supercríticos a partir de raízes de *Bupleurum falcatum*. O rendimento obtido por SFE foi menor, comparado aos métodos tradicionais, devido ao fato de saikosaponinas serem substâncias de caráter polar. Assim, a utilização de solventes orgânicos fornece maiores rendimentos de extração, comparada à metodologia SFE. No entanto, por ser um método seletivo, a SFE não deve ser descartada dentre as opções para extração de saponinas em fontes vegetais.

Tabela 3.1 Métodos de extração de saponinas descritos em literatura.

Metodologia	Planta	Referência
Soxhlet	<i>Panax ginseng</i> <i>Panax notoginseng</i> <i>Panax quinquefolium</i>	Lee et al. (2002) Vongsangnak et al. (2004) Zhang et al. (2006)
Extração por refluxo sob aquecimento (HRE)	<i>Bupleurum falcatum</i> <i>Panax notoginseng</i> <i>Panax quinquefolium</i>	Li et al. (2010c) Vongsangnak et al. (2004) Zhang et al. (2006)
Extração acelerada por solvente (ASE)	<i>Bupleurum falcatum</i>	Li et al. (2010c)
Extração com fluido supercrítico (SFE)	<i>Bupleurum chinense</i> <i>Bupleurum falcatum</i> <i>Panax quinquefolium</i>	Ge et al. (2000) Sun et al. (2010) Zhang et al. (2006)
Extração assistida por micro-ondas (MAE)	<i>Ganoderma atrum</i> <i>Xanthoceras sorbifolia</i> <i>Panax notoginseng</i>	Chen et al. (2007) Li et al. (2010b) Vongsangnak et al. (2004)
Extração assistida por ultrassom (UAE)	<i>Bupleurum falcatum</i> <i>Panax notoginseng</i> <i>Panax ginseng</i> , <i>Panax quinquefolium</i>	Li et al. (2010c) Vongsangnak et al. (2004) Wu et al. (2001)
Extração com líquido pressurizado (PLE)	<i>Panax ginseng</i>	Lee et al. (2002)
Extração sob alta pressão (UPE)	<i>Panax quinquefolium</i>	Zhang et al. (2006)
Extração com água pressurizada de baixa polaridade (PLPW)	<i>Vaccaria segetalis</i> , <i>Saponaria vaccaria</i> , <i>Vaccaria pyramidata</i>	Güçlü-Üstündağ and Mazza (2008)
Campo Elétrico Pulsado	<i>Panax ginseng</i>	Hou et al. (2010)

Em outro estudo, realizado por Zhang et al. (2006), foi utilizada a metodologia conhecida por *ultrahigh pressure extraction* (UPE) para extrair ginsenosídeos de raízes de ginseng americano (*Panax quinquefolium*), e comparando-a com a SFE, MAE, UAE, extração em Soxhlet e extração por refluxo sob aquecimento foi verificado que a UPE apresenta excelentes vantagens como menor tempo de extração e teor de impurezas, maior rendimento e menor consumo de energia. A Tabela 3.1 apresenta uma lista de metodologias já utilizadas para extração de saponinas.

3.2 Tecnologia Supercrítica

A tecnologia envolvendo fluidos supercríticos ganhou destaque no final da década de 70 e no começo da década de 80, especialmente com o início das publicações em revistas como Chemical Engineering, Chemical Week, Business Week e Chemical & Engineering News, e com a construção, na Alemanha, da primeira planta de extração, que visava a remoção de cafeína de grãos de café (Mchugh e Krukonis, 1986).

Extrações com fluidos supercríticos (SFE) são utilizadas na indústria de alimentos, petroquímica, farmacêutica e no controle de poluição. Ela possui algumas vantagens em relação às técnicas tradicionais de extração: é um processo flexível, devido à possibilidade de alteração na propriedade de solvatação/seletividade do fluido supercrítico, por permitir fácil eliminação do solvente evitando o pós-processamento de custo elevado para remoção dos solventes nos extratos e por ser possível de ser ampliada para a escala industrial. Entretanto, um inconveniente deste modelo de extração é o aumento dos custos de investimento, comparando-o às técnicas tradicionais realizadas sob baixas pressões (Reverchon e De Marco, 2006).

3.2.1 Fluidos Supercríticos

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que se encontra em condições de temperatura e pressão acima dos valores críticos, ou seja, da temperatura crítica (T_c) e da pressão crítica (P_c). O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a

substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio. Este fenômeno pode ser visualizado através do diagrama de fases de um composto puro, apresentado na Figura 3.3, no qual são apresentadas as regiões onde um composto puro existe como gás, líquido, sólido ou como um fluido supercrítico. As curvas representam as condições de temperatura e pressão nas quais duas fases coexistem em equilíbrio (no ponto triplo as três fases coexistem).

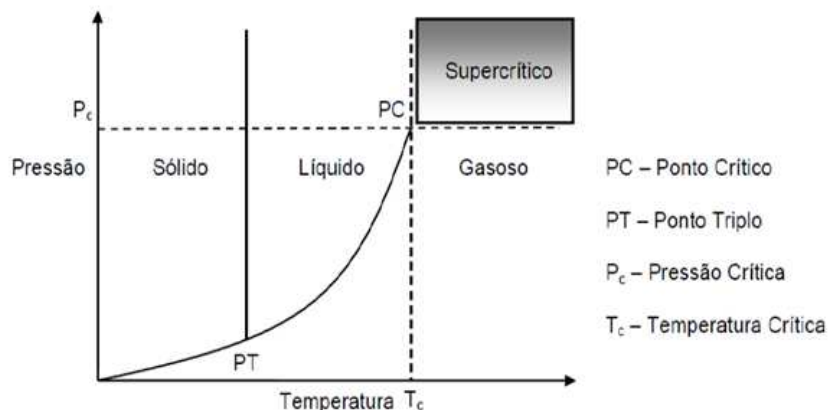


Figura 3.3 Diagrama Pressão-Temperatura para um componente puro (Roca, 2009).

Em condições de pressão e temperatura acima do ponto crítico, os fluidos apresentam densidade semelhante à de líquidos e difusividade e viscosidade como gases (Sun, 2002). A densidade semelhante à dos líquidos aumenta sua capacidade de solvatação (Mchugh e Krukoni, 1986) e sua alta difusividade, baixa viscosidade e tensão superficial favorecem a penetração e transporte do fluido supercrítico na matriz vegetal quando comparado com processos convencionais (Dunford et al., 2003).

As propriedades críticas de alguns solventes são apresentadas na Tabela 3.2. O fato do dióxido de carbono, etano e etileno apresentarem temperaturas críticas próximas às condições ambientes torna-os atrativos para extrações de compostos termossensíveis (Mchugh e Krukoni, 1986).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais comumente utilizado em SFE para aplicações alimentares. O CO₂ não é somente barato e prontamente disponível em alta pureza, mas também seguro de manusear, não tóxico, seguro (GRAS = *Generally recognized as safe*)

e não inflamável. Além disso, é facilmente removido por simples redução da pressão para valores próximos às condições ambientes. Portanto, seu uso é aprovado e liberado para processamento de alimentos (Uquiche et al., 2004; Brunner, 2005).

Tabela 3.2 Condições críticas para alguns solventes (Sun, 2002).

Solventes	Temperatura Crítica (°C)	Pressão Crítica (bar)
Dióxido de Carbono	31,1	73,8
Etano	32,2	48,8
Etileno	9,3	50,4
Propano	96,7	42,5
Propileno	91,9	46,2
Benzeno	289,0	48,9
Tolueno	318,6	41,1
Triclorofluormetano	196,6	44,1
Amônia	132,5	112,8
Água	374,2	220,5

3.2.2 Utilização de Cossolventes

Apesar de o dióxido de carbono ser o composto mais utilizado como solvente supercrítico, ele é apolar e solubiliza preferencialmente compostos apolares ou de baixa polaridade. Substâncias polares também podem ser extraídas com scCO_2 em altas densidades (altas pressões) e/ou pelo o emprego de cossolventes, como etanol e água, já que as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos podem ser modificadas facilmente pela adição de pequenas quantidades desses cossolventes (Pellerin, 1991; Vasapollo et al., 2004).

Um cossolvente pode ser definido como um componente que é adicionado em pequenas quantidades, com uma volatilidade intermediária entre a do solvente e a do soluto,

e que não altera significativamente as propriedades críticas nem a densidade do solvente (Esquivel et al., 1999).

Alguns dos cossolventes mais utilizados para extração de biocompostos são etanol e água, que apresentam polaridade maior que o dióxido de carbono e são solventes sem restrições de órgãos governamentais e ambientais quanto ao seu uso, desde que com qualidade adequada às normas vigentes.

O inconveniente na utilização de cossolventes é que um solvente com maior capacidade extrativa pode diminuir a seletividade do processo e, uma vez que, o cossolvente é líquido à pressão atmosférica, este será recolhido no separador juntamente com os compostos extraídos, sendo necessário um processo de eliminação deste solvente (Reverchon e De Marco, 2006).

3.2.3 Extração em Leito Fixo

A extração de matrizes sólidas com fluidos supercríticos ocorre basicamente em duas etapas. Primeiramente se dá a extração dos componentes de interesse da matriz sólida e em seguida ocorre a separação do extrato, ou seja, a separação dos compostos desejáveis do solvente utilizado (Brunner, 1994; Raventós et al., 2002).

Um esquema do processo de extração com fluidos supercríticos é apresentado na Figura 3.4, na qual se visualiza um extrator de leito fixo (3), formado pelo próprio material vegetal, sendo alimentado pelo solvente previamente comprimido (1) e aquecido (2) até condições acima do seu ponto crítico. O solvente se distribui uniformemente pelo leito e solubiliza componentes presentes na matriz vegetal pela transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida. A corrente de saída do extrator contendo a mistura soluto/solvente é expandida por meio da válvula de expansão (4) e conduzida ao separador (5), onde finalmente os componentes são separados (Brunner, 1994; Martinez-Correa, 2010).

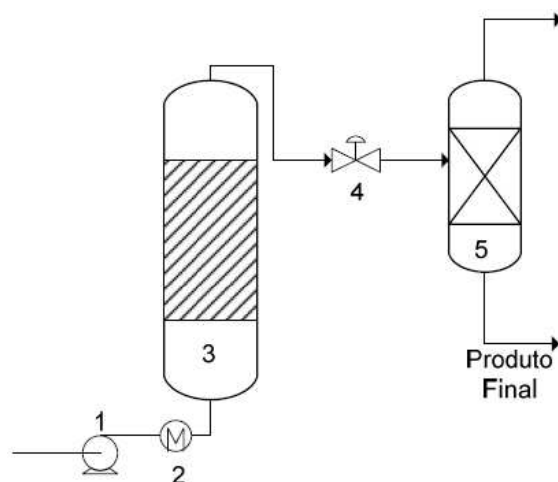


Figura 3.4 Diagrama esquemático de um sistema de extração supercrítica (Martinez-Correa, 2010).

3.2.4 Curva Global de Extração

Para um melhor conhecimento do processo de extração a partir de matrizes vegetais, frequentemente faz-se uso de curvas globais de extração, também conhecidas como OEC (*overall extraction curve*). Esta curva, apresentada na Figura 3.5, descreve a cinética de uma extração e é obtida pela quantidade total de extrato em função do tempo ou da quantidade de solvente consumido (Brunner, 1994).

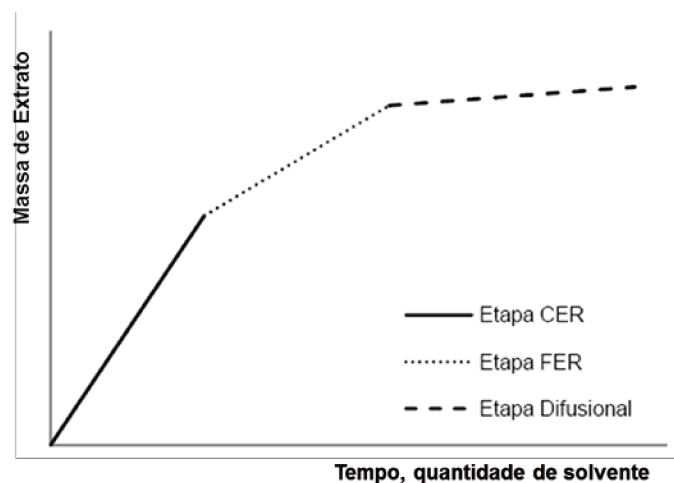


Figura 3.5 Curva de extração supercrítica com suas etapas: etapa de taxa de extração constante (CER); etapa de taxa de extração decrescente (FER) e período difusional (DC). Adaptado de Campomanes (2012).

De acordo com Sovová (1994), uma OEC típica pode ser descrita por três etapas: **(1)** Período de taxa constante de extração ($CER = Constant\ Extraction\ Rate$), na qual a retirada de extrato da superfície externa da partícula ocorre a uma velocidade aproximadamente constante, predominando o fenômeno de convecção. Na etapa CER ocorre extração do soluto mais facilmente acessível e geralmente corresponde à cerca de 50 a 90 % do rendimento total da extração; **(2)** Etapa com taxa de extração decrescente ($FER = Falling\ Extraction\ Rate$), na qual a resistência à transferência de massa aumenta incluindo, além do efeito convectivo na fase fluída, o efeito difusional na fase sólida devido ao esgotamento do extrato em sua superfície; **(3)** Etapa controlada pela difusão ($DC = Diffusion\ Controlled$), onde a taxa de transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo na parte interna da partícula sólida. Nesta etapa não há soluto na superfície da partícula sólida.

3.3 Matrizes Vegetais

3.3.1 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

O gênero *Pfaffia*, pertencente à família *Amaranthaceae*, é neotropical e representado por cerca de 20 espécies no Brasil, porém a diferenciação entre as espécies não é simples, e muitas vezes são vendidas no comércio espécies identificadas incorretamente. Espécies pertencentes a este gênero se encontram principalmente em formações vegetais como cerrados, campo rupestre, campos limpos, orla de matas e borda de rios (Marchioretto, 2008). Muitas das espécies brasileiras deste gênero são comercializadas como ginseng brasileiro, uma vez que são considerados substitutos do ginseng asiático (*Panax* spp. *Araliaceae*) (Neto et al., 2004).

A *Pfaffia glomerata* é uma planta arbustiva e perene encontrada em todo território nacional, porém cresce principalmente entre a Região Centro-Oeste brasileira e o norte do Estado do Paraná (Smith e Downs, 1972). Na América do Sul, esta espécie também é cultivada no Equador e Panamá (Nakamura et al., 2010). A Figura 3.6 mostra um arbusto de *Pfaffia glomerata* e suas raízes. As raízes desta espécie caracterizam-se por serem tuberosas, outras longas e grossas que podem atingir até 2 metros de comprimento e entre 2,0 e 2,5 cm de diâmetro (Gosmann et al., 2003).

Todas as partes desta planta são consideradas um elemento complementar para a medicina alternativa, porém a raiz é considerada a parte mais valiosa. Dentre as espécies de *Pfaffia*, as raízes de *Pfaffia glomerata* apresentam grande interesse comercial, sendo empregadas contra esgotamento físico e mental, falta de memória, para auxiliar no tratamento de irregularidades circulatórias, estresse, anemia, diabetes, e ainda no tratamento da impotência sexual. Em relação aos efeitos adversos do seu uso, o ginseng apresenta baixa incidência, porém estes efeitos não podem ser ignorados, sendo considerados como principais a hipertensão e o potencial efeito estrogênico (Rates e Gosmann, 2002).



Figura 3.6 Aspecto geral das raízes e partes aéreas de *Pfaffia glomerata* (Marques, 1998).

Dentre os diversos estudos relacionados às propriedades biológicas de *Pfaffia glomerata* há relatos de propriedades antioxidante (De Souza Daniel et al., 2005), anti-hiperglicemiante (Sanches et al., 2008), antimicrobiana (Alcântara, 1994; Neto et al., 2004) e tônica (Marques et al., 2002).

Estudos comprovaram que o extrato hidroalcoólico das partes subterrâneas de *P. glomerata* comercializado no Brasil apresentou atividade depressora do sistema nervoso central (De-Paris et al., 2000). De acordo com Neto et al. (2005), o extrato hidroalcoólico de raízes *Pfaffia glomerata* também apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica. Freitas et al. (2004) mostraram que um extrato aquoso bruto de *Pfaffia glomerata* foi capaz de proteger a mucosa gástrica e de inibir a secreção de ácido gástrico em ratos, validando o uso popular desta espécie no tratamento de distúrbios gástricos.

Os principais compostos isolados das raízes de *Pfaffia glomerata* são ácido pfamérico, ácido glomérico, ácido oleanólico, ecdisterona (ou β -ecdisona) e rubrosterona e β -D-glicopiranosil-oleanolato (Shiobara et al., 1993).

Saponinas, conhecidas como ginsenosídeos, também são encontradas nas raízes desta espécie, podendo seu teor variar de 0,5 a 3,0 % nesta parte da planta. Estes compostos são considerados os constituintes ativos deste ginseng brasileiro promovendo crescente interesse

em sua caracterização e investigação farmacológica (Rates e Gosmann, 2002). Atualmente, Nakamura et al. (2010) isolaram um novo tipo de triterpeno noroleanano (pfaffianol A) dois novos tipos de triterpeno noroleanano glicosilados (pfaffiaglicosídeos A e B) e três compostos glicosilados derivados da ecdisterona (pfaffiaglicosídeos C, D e E). Algumas estruturas dos compostos citados são apresentadas no Apêndice A.

Estudos envolvendo extração supercrítica com raízes de *Pfaffia glomerata* são recentes e foram, provavelmente, motivados pelos estudos com ginseng coreano (*Panax ginseng*) e norte americano (*Panax quinquefolius*) (Wang et al., 2001; Wood et al., 2006). Foi relatada, em extratos obtidos por scCO₂ com estas espécies, atividade antiobesidade (Woo et al., 2011), pesticida (Quan et al., 2004) e antioxidante (Leal et al., 2010).

3.3.2 *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen

A espécie *Hebanthe eriantha* (família *Amaranthaceae*) foi recentemente reclassificada ganhando esta denominação, porém foi conhecida por muitos anos como *Pfaffia paniculata* (Marchioretto et al., 2010). Por ter pertencido ao gênero *Pfaffia*, esta espécie é também conhecida como ginseng brasileiro. Além deste, seus nomes populares incluem paratudo e corango-açu.

As espécies do gênero *Hebanthe* apresentam-se como arbusto e subarbusto. A *Hebanthe eriantha* possui ampla distribuição, sendo a única das 6 (seis) espécies do gênero no Brasil encontrada em todas as regiões brasileiras, ocorrendo em bordas de rios, orlas de matas e matas ciliares (Marchioretto, 2008). São mais frequentes nos estados de São Paulo e Paraná (Mazzanti e Braghiroli, 1994). Além do Brasil, são encontradas também na Bolívia, Argentina, Paraguai, Peru, Colômbia e Guiana Francesa (Smith e Downs, 1972; Marchioretto, 2008).

Os efeitos terapêuticos desta planta são atribuídos aos constituintes presentes nas suas raízes. As raízes de *Hebanthe eriantha*, que podem ser visualizadas na Figura 3.7, possuem entre 3,0 e 4,0 cm de diâmetro (Gosmann et al., 2003).

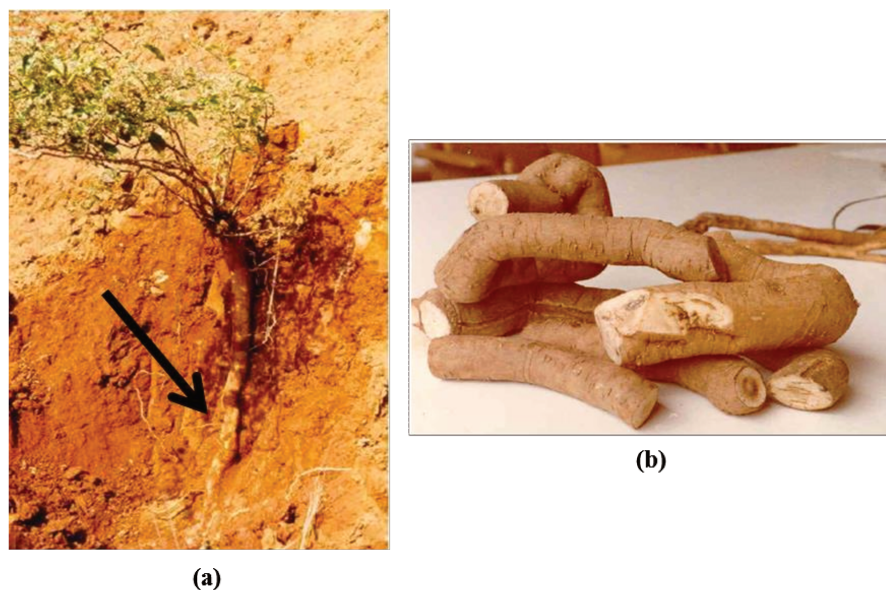


Figura 3.7 Raízes expostas de *Pfaffia paniculata* (a) e após limpeza (b) (Marchioretto, 2008).

Dentre os estudos relacionados aos efeitos terapêuticos de raízes de *Hebantheriantha* observa-se que a principal atividade atribuída a esta espécie é a atividade antineoplásica, ou seja, a capacidade de diminuir a proliferação (multiplicação) de células cancerígenas (Watanabe et al., 2000; Da Silva et al., 2005; Matsuzaki et al., 2006; Nagamine et al., 2009; Da Silva et al., 2010). Entretanto, também há confirmação de que extratos desta espécie apresentam atividade analgésica e anti-inflamatória (Mazzanti e Braghiroli, 1994), são agentes adaptógenos (Rates e Gosmann, 2002), promovem aumento do nível hormonal (Oshima e Gu, 2003) e auxiliam no tratamento de pacientes com anemia falciforme (Ballas, 2000).

Dentre os compostos isolados de raízes de *Pfaffia paniculata* estão o ácido pfáffico, alantoína, sitosterol, estigmasterol e os pfaffosídeos A, B, C, D, E e F, saponinas derivadas do ácido pfáffico (Takemoto et al., 1983; Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984). Dois novos nor-triterpenóides chamados pfaffino A e B foram recentemente identificados (Li et al., 2010a). As estruturas de alguns compostos citados são apresentadas no Apêndice A.

Os pfaffosídeos A, C, D, E e F constituintes das espécies de *Pfaffia paniculata* possuem potencial atividade antitumoral, e foram isolados apenas nesta espécie (Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984). Segundo Mazzanti e Braghiroli (1994), o extrato etanólico de raízes de *Pfaffia paniculata* apresentou atividade anti-inflamatória em camundongos, porém, não foi verificado qual composto foi responsável por esta atividade.

Leal et al.(2010) obtiveram extratos supercríticos de raízes de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata*. Os rendimentos de extração foram semelhantes para as duas espécies estudadas e em diferentes condições de temperatura e pressão. Foi constatada presença de β -ecdisona nos extratos de *Pfaffia glomerata* e flavonoides em extratos provenientes das duas espécies. Porém, a atividade antioxidante relatada não foi associada a presença de compostos fenólicos nos extratos.

3.3.3 *Melia azedarach* L.

A *Melia azedarach* pertence à família *Meliaceae* e é conhecida popularmente como cinamomo, lírio, lilás da Índia e árvore-de-santa-bárbara. Internacionalmente, também é conhecida como *chinaberry tree*. A planta é nativa da China e da Índia (Orhan et al., 2012a), porém se encontra na maior parte dos trópicos e países subtropicais. Foi introduzida nas Filipinas, Estados Unidos, Brasil, Argentina, e muitos países africanos e árabes (Al-Rubae, 2009). No Brasil, esta espécie é bastante cultivada, sendo sub-espontânea na Região Sul e Sudeste (Lorenzi, 2003).

Na Figura 3.8 podem ser visualizados a árvore de *Melia azedarach* e seus frutos. A árvore do cinamomo atinge facilmente altura superior a 10 m. Suas flores são pequenas, cheirosas e de cor lilás (Braga, 1976). Seus frutos são globosos, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e inicialmente verdes e lisos que se transformam em um amarelo pálido (Ferreiro et al., 2010).



Figura 3.8 Árvore e frutos de *Melia azedarach* (Ferreiro et al., 2010).

Esta planta tem ampla utilização popular e já teve muitos princípios ativos isolados e várias ações farmacológicas comprovadas. Dentre estas ações, destacam-se a atividade antiviral (Wachsman et al., 1982; Andrei et al., 1986; Wachsman et al., 1998), antimicrobiana (Khan et al., 2011; Orhan et al., 2012a), inseticida (Carpinella et al., 2007; Mckenna et al., 2013; Scapinello et al., 2013), citotóxica (Akihisa et al., 2013; Yuan et al., 2013) e anti-inflamatória (Aoudia et al., 2013).

Especificamente em relação aos seus frutos maduros, o extrato etanólico apresentou ação fungistática e fungicida contra alguns fungos patogênicos (Carpinella et al., 1999). As propriedades da *Melia azedarach* como a atividade repelente e inseticida dos extratos das suas folhas e frutos contra os ovos e ninfas do *Triatoma infestans* foram estudadas por Valladares et al. (1999), que verificou que o extrato do fruto verde apresentou efeito superior ao do extrato do fruto maduro e ainda, que o extrato das folhas foi ineficaz.

Também foram realizadas pesquisas nas quais se analisou o efeito dos extratos obtidos das folhas e dos frutos da *Melia azedarach* sobre o mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti* L.) e verificou-se atividade larvicida e ovicida (Wandscheer et al., 2004; Coria et al., 2008).

Dentre os compostos presentes nos frutos de *Melia azedarach*, destacam-se os limonoides, maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida. Estes são triterpenóides conhecidos como meliacinas devido ao seu sabor amargo e por suas principais

fontes incluem espécies pertencentes à família *Meliaceae* (Viegas Júnior, 2003). Zhou et al. (2005) isolaram e identificaram quatro limonoides do extrato metanólico de frutos de *Melia azedarach* dos quais dois apresentaram atividade citotóxica significativa contra uma linhagem celular responsável por câncer epitelial humano. Recentemente, outras dezenas de limonoides foram identificados de diferentes partes desta planta (Liu et al., 2011; Akihisa et al., 2013; Yuan et al., 2013).

Porém, além dos limonoides, outras classes de metabólitos como os esteroides, alcalóides, proteínas, fenóis e fitoesteróis também estão presentes nos órgãos dessa espécie, bem como compostos voláteis (Matias et al., 2002; Yang et al., 2011).

Recentemente, estudos com *Melia azedarach* têm chamado atenção para os compostos fenólicos presentes nesta espécie. Dentre os compostos fenólicos encontrados em seus frutos pode-se citar o ácido nicotínico, ácido málico, ácido gálico, ácido *para*-cumárico, ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido ferúlico e rutina (Aoudia et al., 2012; Orhan et al., 2012b). Chiffelle et al. (2009) identificaram a presença de catequina e campferol em frutos de *Melia azedarach*. De acordo com Aoudia et al. (2013), extratos aquosos e etanólicos de folhas de *Melia azedarach* apresentaram atividades antioxidante e anti-inflamatória associadas à presença de compostos fenólicos.

A composição de frutos de *Melia azedarach* também inclui ácidos graxos, dentre os quais se encontram o ácido capríico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoleico e ácido linolênico (Orhan et al., 2012b). A presença de saponinas em espécies de *Melia azedarach* é citada por Seffrin et al. (2011), porém não há evidências de seu isolamento.

Extratos de partes de *Melia azedarach* utilizando fluidos supercríticos ainda foram pouco avaliados. Scapinello et al. (2013) estudaram a influência da temperatura, pressão, tempo estático, tempo de extração e do tamanho de partícula na obtenção de extratos de frutos de *Melia azedarach* com scCO₂ e obtiveram extratos com atividade biológica contra *Spodoptera frugiperda*, causando deformações morfológicas na fase adulta desta espécie.

4. Material e Métodos

Neste capítulo são apresentados e descritos os materiais e métodos utilizados para extração e fracionamento de saponinas provenientes de três diferentes fontes vegetais (*Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*) através de tecnologia supercrítica.

Como foi abordado no Capítulo 3, os frutos de *Melia azedarach*, apresentam diversas classes de compostos químicos de importância biológica. Por isso, os extratos provenientes desta matéria prima foram submetidos a outros métodos analíticos, além das análises específicas para saponinas.

Um esquema da metodologia aplicada às raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, assim como o procedimento experimental aos quais os frutos de *Melia azedarach* foram submetidos podem ser visualizados nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente.

Os experimentos foram realizados no ExTrAE - Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio - DEA/FEA/UNICAMP e na Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA/UNICAMP.

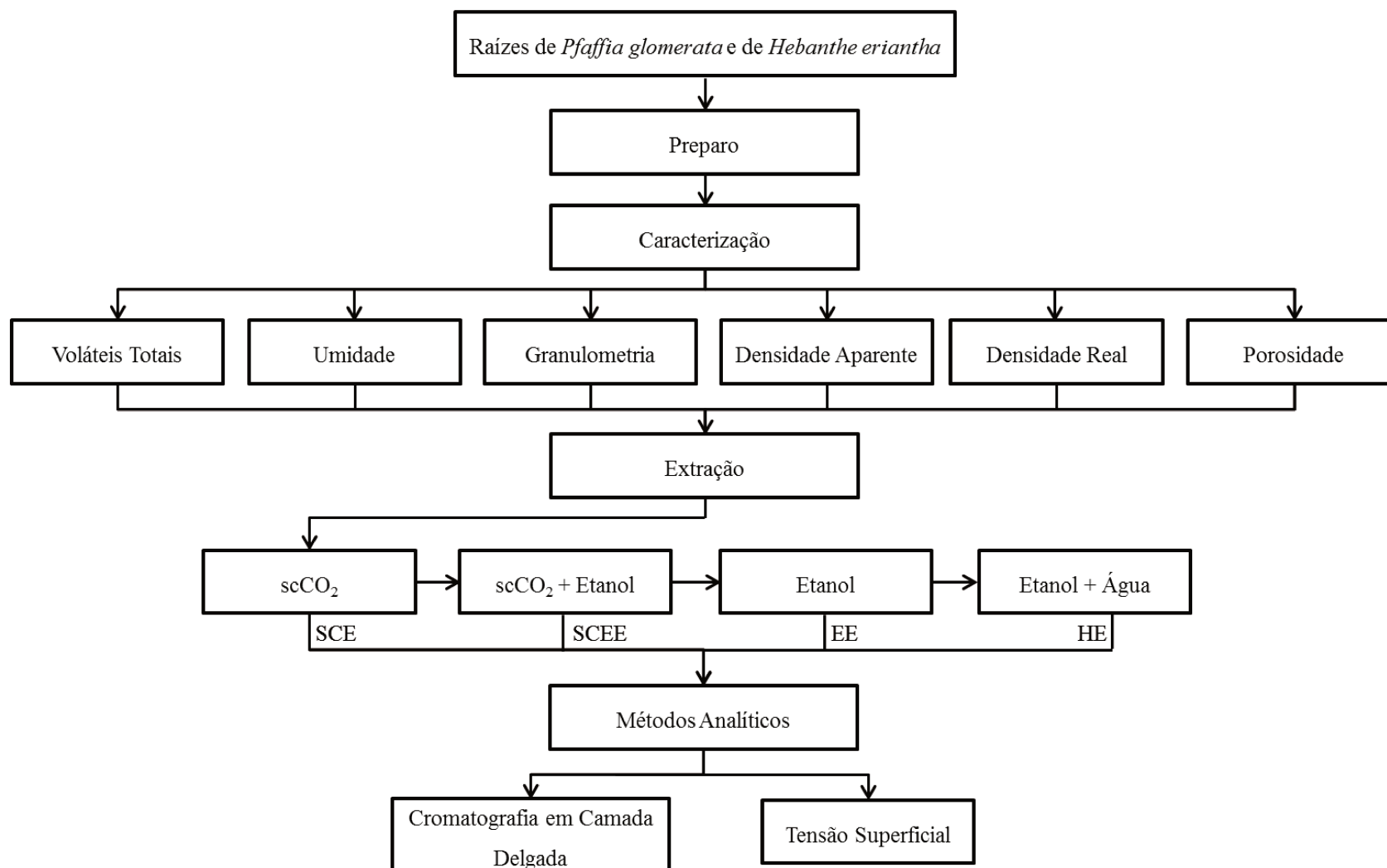


Figura 4.1 Procedimento experimental para raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*.

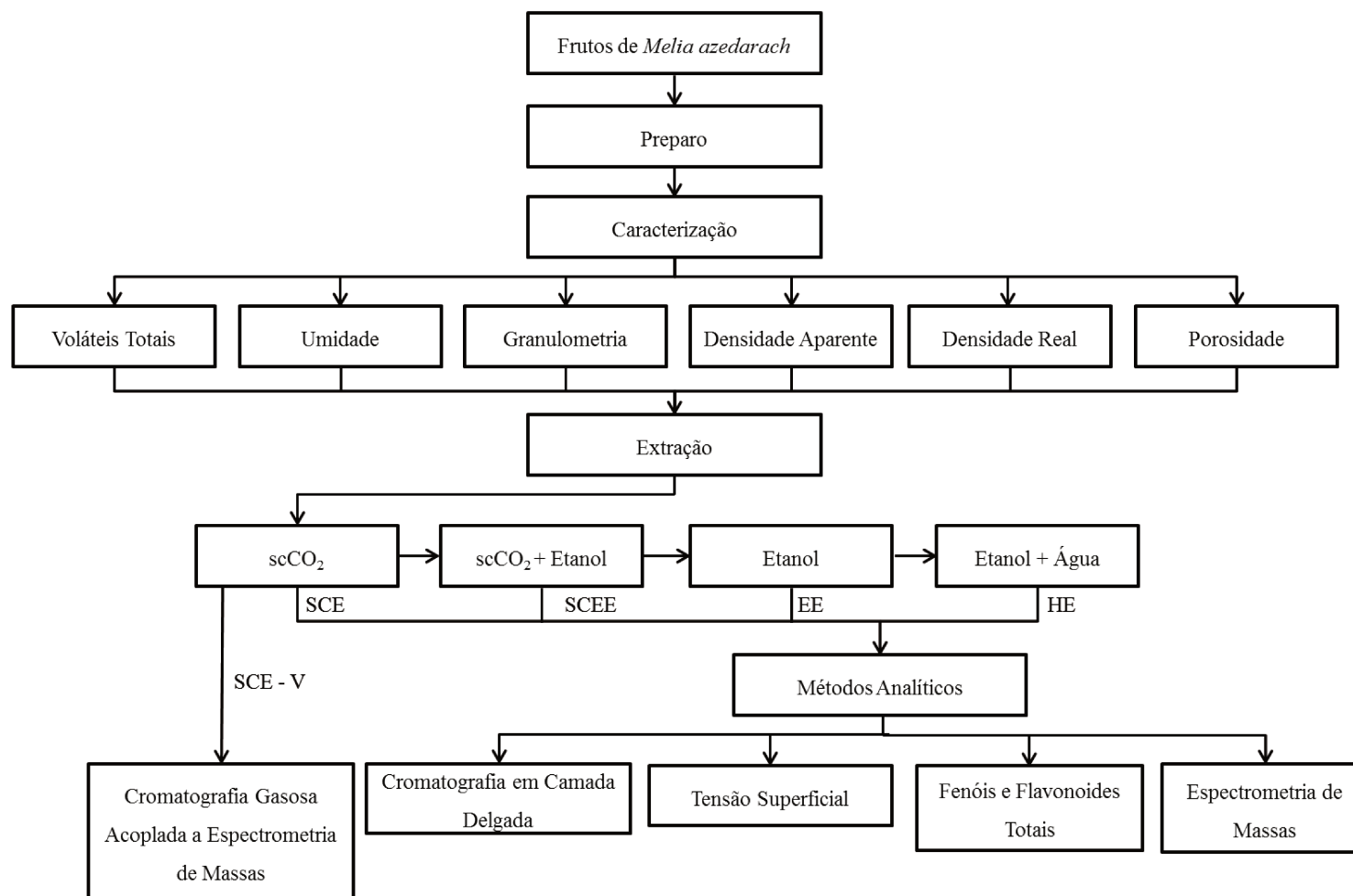


Figura 4.2 Procedimento experimental para frutos de *Melia azedarach*.

4.1 Seleção e Preparo das Matérias-Primas

Neste trabalho foram utilizadas raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* cultivadas no campo experimental do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), e frutos de *Melia azedarach* coletados na cidade de Campinas-SP.

A Tabela 4.1 apresenta os dados das matrizes vegetais utilizadas neste trabalho. As matérias-primas, após coleta, foram previamente picotadas (TRAPP) e colocadas em bandejas e secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por quatro dias. Em seguida, as raízes foram moídas (Moinho 114584, Ametek) com gelo seco.

Para uma melhor distribuição e uniformidade no tamanho das partículas, as amostras foram novamente moídas (Moinho MA 340, Marconi, Brasil) antes de serem estudadas. Após as etapas de secagem e todas as etapas de moagem, as matérias primas apresentavam-se de acordo com a Figura 4.3. Estas matrizes foram armazenadas em frascos de vidro com tampa em freezer (Brastemp Flex, Brasil) a – 26 °C.

Tabela 4.1 Dados de coleta das matérias-primas empregadas neste estudo.

Espécie	Coleta		Exsicata
	Data	Coordenadas	
<i>Pfaffia glomerata</i>	Agosto/2011	Latitude: 22°48' S Longitude: 47°07' W	567
<i>Hebanthe eriantha</i>	Dezembro/2009	Latitude: 22°48' S Longitude: 47°07' W	565
<i>Melia azedarach</i>	Agosto/2011	Latitude: 23°32' S Longitude: 47°08' W	-

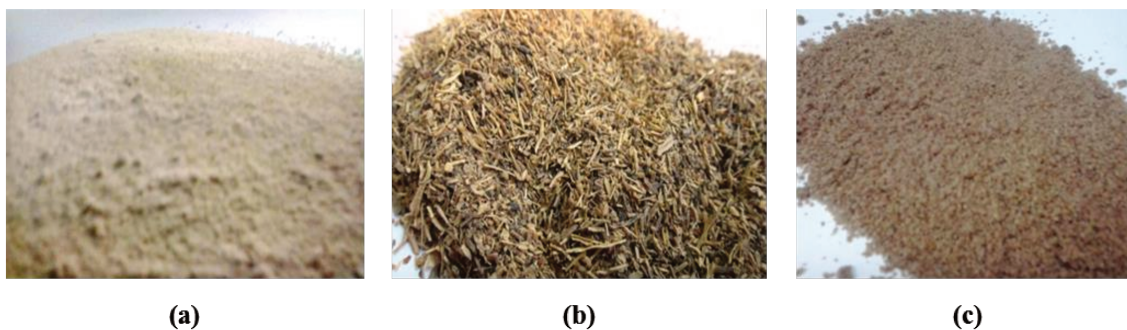


Figura 4.3 Fotos das matrizes vegetais secas e moídas: *Pfaffia glomerata*(a), *Hebanthe eriantha* (b) e *Melia azedarach* (c).

4.2 Caracterização das Matérias-Primas

De forma geral, para permitir a penetração do solvente o material deve estar seco e triturado adequadamente, de forma que ocorra um bom processo de extração. Portanto, é importante conhecer e monitorar algumas propriedades das matérias-primas a serem estudadas, assim como as propriedades do leite que estas irão formar.

As matérias-primas foram caracterizadas quanto à quantidade de voláteis totais e umidade, densidade aparente, densidade real, diâmetro médio das partículas e porosidade do leite formado. Tais análises são descritas a seguir:

4.2.1 Voláteis totais

Aproximadamente 2 g da amostra foram pesadas (Balança analítica, Precisa XT 220A) em cadinho de porcelana e secas em estufa (Marconi, MA030/12, Brasil) a 105 °C sob vácuo (Bomba de vácuo Marconi, MA057/1, Brasil) até peso constante ou variação de ± 3 mg, conforme descrito em AOAC 930.04 (1997). O teor de voláteis totais (VT) é representado pela perda de massa da amostra, como mostrado na Equação 4.1.

$$VT(\%) = \frac{(\text{massa inicial} - \text{massa final})}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.2 Umidade

O teor de umidade (U) foi estimado pelo método da AOCS Ca 23-55 (1998) a partir de aproximadamente 0,15 g de amostra (Balança Analítica AAA 160/L, Adam Equipament, EUA) utilizando um Karl-Fisher (Metrohm 701 KF Titrino) equipado com forno (832 KF Thermoprep) A amostra foi pré-tratada a 105 °C durante 600 segundos utilizando uma vazão de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

Este é um método volumétrico e baseia-se na quantidade de reagente de Karl Fisher (com seu respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra.

4.2.3 Diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio das partículas (d_{gw}) foi obtido pela metodologia ASAE (1997). Aproximadamente 50 g da amostra foram utilizadas em um conjunto de peneiras variando de 12 a 270 Mesh (1,40 a 0,053 mm). O conjunto de peneiras, com a amostra na peneira superior, foi agitado por 15 minutos (Agitador Eletromagnético de Peneiras, Bertel, Brasil). Em seguida, pesou-se, em balança semi-analítica (Marte Balanças e Instrumentos de Precisão LTDA, AS5500C, Brasil), a amostra retida em cada uma das peneiras.

O d_{gw} foi calculado de acordo com a Equação 4.2.

$$d_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (W_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n W_i} \right] \quad (4.2)$$

Onde:

W_i é a massa retida na peneira i, em gramas;

n é o número de peneiras +1;

$\bar{d}_i$ é o diâmetro médio geométrico ou tamanho médio das partículas na peneira, em mm;

$$\bar{d}_i = (d_i \times d_{i+1})^{1/2}$$

d_i é o tamanho da abertura nominal da peneira i , em mm;

d_{i+1} é o tamanho da abertura nominal da próxima (maior) peneira, em mm;

4.2.4 Densidade real das partículas

A densidade real (ρ_r) das partículas foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, utilizando-se a técnica de picnometria em gás hélio. O método utilizou um picnômetro gasoso (Picnômetro Automático Quantachrome Ultrapyc 1200e), equipamento que indica a densidade real das partículas sólidas através da técnica de deslocamento de gás.

4.2.5 Densidade aparente

A densidade aparente (ρ_a) do leito de partículas foi calculada a partir da massa da amostra necessária para completar um volume de 10 cm³ (Uquiche et al., 2004).

4.2.6 Porosidade do leito de partículas

A porosidade do leito (ε) de partículas foi obtida a partir dos dados de densidade real (ρ_r) e aparente (ρ_a), de acordo com a Equação 4.3.

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{\rho_a}{\rho_r} \right) \quad (4.3)$$

4.3 Extração em Sistema Soxhlet

Raízes secas e moídas de *Pfaffia glomerata* e de *Hebanthe eriantha* foram extraídas com metanol em sistema Soxhlet por 3 horas.

Os frutos secos e moídos de *Melia azedarach* também foram extraídos em sistema Soxhlet (3 horas), porém utilizando solventes na ordem crescente de polaridade: hexano,

acetato de etila e metanol. Após filtração todos os extratos foram concentrados em rotaevaporador (Fisaton 802, Brasil).

Estes extratos foram utilizados como referência nas análises de Cromatografia em Camada Delgada, descritas em 4.5.1.

4.4 Extração Sequencial em Leito Fixo

Para determinação das melhores condições da extração sequencial em leito fixo foram realizados testes com a *Pfaffia glomerata*. Alguns destes resultados foram apresentados em Resultados Preliminares (item 5.1).

As extrações foram realizadas de forma sequencial em um extrator de leito fixo em uma unidade experimental (Laboratório ExTrAE, UNICAMP, Brasil) conforme esquematizado na Figura 4.4. A unidade consiste basicamente, de um cilindro de CO₂, um banho termostatizado, manômetros do tipo Bourdon, trocador de calor (banho refrigerado), bomba de alta pressão, tanque pulmão, extrator, frasco coletor, medidor de vazão, totalizador de volume, válvulas e uma bomba para etanol ou água. A lista de equipamentos e instrumentos utilizados nesta unidade, com suas respectivas marcas e modelos, encontram-se na Tabela 4.2.

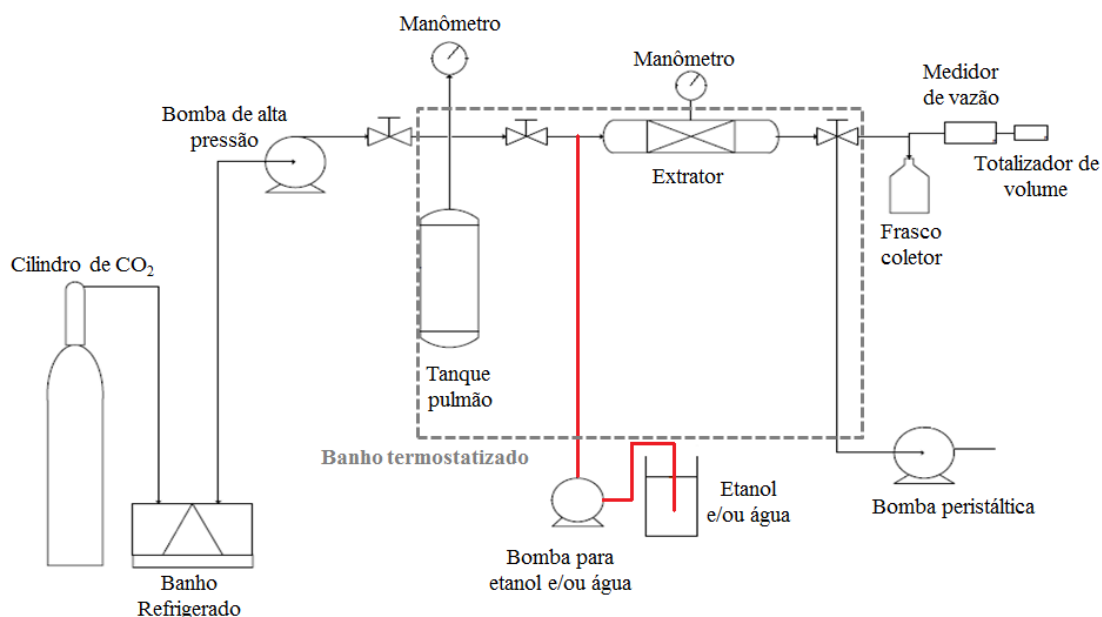


Figura 4.4 Esquema da unidade experimental de extração em leito fixo.

Tabela 4.2 Especificações técnicas dos equipamentos ou instrumentos da unidade de extração em leito fixo.

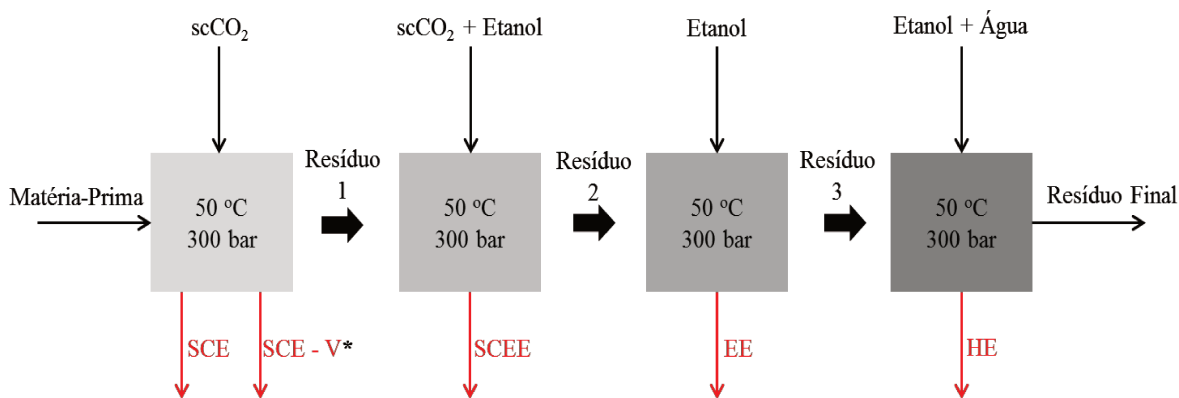
Equipamento/Instrumento	Marca/Modelo
Banho refrigerado	Cole-Parmer, 12101-31,EUA
Banho termostatzado	Sulab, Brasil
Bombas	Eldex Laboratories, PN 1018 AA-100-S, EUA
Extrator em aço inox AISI 316	50 mL, Suprilab, Brasil
Manômetro	Record, Brasil
Medidor de vazão	Cole-Parmer, 32908-69, EUA
Tanque pulmão em aço inox AISI 316	500 mL, Suprilab, Brasil
Totalizador de volume	Lao-G1, Brasil
Válvulas	Autoclave Engineers, EUA

Basicamente, o processo de extração foi realizado da seguinte forma: o extrator foi inicialmente empacotado com a matéria-prima juntamente a esferas de vidro. O banho termostatzado foi ajustado na temperatura desejada e a pressão desejada foi alcançada bombeando-se o solvente utilizado para o extrator. A extração se iniciou escoando o solvente ou uma mistura destes através do leito (extrator) e coletando-se o extrato no frasco coletor.

Especificamente para as extrações que envolvem scCO_2 , este foi conduzido a um medidor para o controle da vazão de CO_2 e para um totalizador de volume para quantificar o dióxido de carbono usado.

As extrações foram realizadas em quatro etapas sequenciais, todas realizadas a 50 °C e 300 bar. Basicamente, os solventes utilizados foram CO_2 (99,5 % m/m) (White Martins Gases Industriais, Brasil), álcool etílico absoluto P.A (Êxodo Científica, AE09700RA, Brasil) e água ultra pura Milli-Q (Millipore direct-Q3 UV, Millipore Corporation, EUA).

Na primeira etapa utilizou-se como solvente o scCO_2 , que escoou por um leito fixo formado pelas partículas e esferas de vidro. O resíduo (1) da primeira etapa de extração permaneceu no interior do extrator e a segunda etapa iniciou-se com o escoamento de etanol, como cossolvente, juntamente ao scCO_2 . Em seguida, a partir do resíduo 2 realizou-se a etapa 3, na qual utilizou-se somente etanol como solvente e, por fim, o resíduo 3 foi extraído com uma solução hidroalcoólica. A Figura 4.5 esquematiza o processo de extração sequencial descrito. O material remanescente no extrato após a realização das quatro etapas de extração foi denominado resíduo final.



* Somente para extrações de frutos de *Melia azedarach*.

Figura 4.5 Fluxograma do processo de extração sequencial em leito fixo.

Como resultado das quatro etapas de extração foram obtidos quatro tipos de extratos denominados SCE (extrato supercrítico), SCEE (extrato supercrítico + etanol), EE (extrato etanólico) e HE (extrato hidroalcoólico), respectivamente.

No caso específico de extrações com *Melia azedarach*, conectou-se uma armadilha “Porapak”, juntamente ao sistema de coleta de CO₂. A armadilha Porapak é um artifício montado a partir de um tubo de vidro contendo Porapak-Q (80-100 Mesh, Supelco Analytical, EUA) e lã de vidro (Êxodo Científica, Brasil), formando um cartucho, para reter os compostos voláteis presentes na amostra. O extrato obtido a partir deste processo foi denominado SCE-V (extrato supercrítico-voláteis).

As condições operacionais de pressão (300 bar) e temperatura (50 °C) nas quais as extrações foram realizadas representam valores médios das condições geralmente descritas em literatura para extrações com scCO₂ (Pansuriya e Singhal, 2009).

As vazões dos solventes utilizados para extração e as proporções dos solvente nas misturas realizadas são apresentadas na Tabela 4.3. A escolha destes parâmetros de extração foi realizada a partir de alguns testes preliminares nos quais observou-se, através de monitoramento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a extração de saponinas.

Tabela 4.3 Etapas da extração sequencial em leito fixo.

Etapa	Solventes	Proporção dos Solventes	Vazão
1	scCO ₂	-	1,65 g.min ⁻¹
2	scCO ₂ e Etanol	70:30 (m:m)	scCO ₂ : 1,65 g.min ⁻¹ / Etanol: 0,71 g.min ⁻¹
3	Etanol	-	0,71 g.min ⁻¹
4	Etanol e Água	70:30 (v:v)	0,71 g.min ⁻¹

O cálculo da proporção da mistura scCO₂ e etanol, em massa, foi realizado considerando as condições ambientais como 25 °C e 710 mmHg. Desta forma, as densidades

do etanol e do dióxido de carbono foram consideradas iguais a $0,78 \text{ g.cm}^{-3}$ e $1,65 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Os valores da densidade dos solventes utilizados também foram úteis para se obter a quantidade de solvente (em massa) utilizada em cada etapa de extração. A densidade da solução etanol/água (70:30 v/v) foi considerada $0,85 \text{ g.cm}^{-3}$.

A seguir é descrita, detalhadamente, a sequência de procedimentos para a realização das quatro etapas sequenciais de extração.

Procedimento Experimental de Extração Sequencial em Leito Fixo

- 1) Misturar aproximadamente 7 gramas da matriz vegetal a esferas de vidro (aproximadamente 5 mm de diâmetro) e empacotar o extrator (50 mL) de forma homogênea, para que não haja formação de caminho preferencial para o solvente;
- 2) Ligar banho refrigerado na temperatura de $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 3) Ligar banho termostatizado na temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 4) Atingidas as condições de temperatura, utilizar a bomba de alta pressão para bombear scCO_2 para o sistema (extrator) até atingir a pressão de 300 bar;
- 5) Atingidas as condições de pressão desejada adotar um período de 20 minutos para estabilização do sistema;
- 6) Conectar um frasco previamente tarado à saída do sistema, juntamente ao sistema de coleta de dióxido de carbono;
- 7) Ligar medidor de vazão e anotar volume inicial de CO_2 indicado no totalizador de volume;
- 8) **Etapas 1:** Após 20 minutos de estabilização, ligar a bomba de alta pressão e abrir a válvula de saída, de forma com que se escoar scCO_2 pelo leito fixo (extrator) na vazão de 1 L.min^{-1} (a pressão do sistema deve ser mantida constante em 300 bar);
- 9) Após o tempo de extração, fechar válvula de saída e bombear etanol (n-hexano no caso da *Melia azedarach*) através da bomba peristáltica para remoção do extrato que possa ter ficado aderido na tubulação;
- 10) Conectar um novo frasco, previamente tarado, para dar início a etapa 2;

- 11) **Etapa 2:** abrir a válvula de saída e, utilizando a bomba peristáltica, bombear etanol na vazão de $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ concomitantemente ao scCO_2 a $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$;
- 12) Após o tempo de extração, trocar de frasco e, mantendo a válvula de saída aberta, despressurizar o sistema lentamente;
- 13) Ao fim da segunda etapa o medidor de vazão de CO_2 e o banho refrigerado podem ser desligados;
- 14) **Etapa 3:** pressurizar, utilizando a bomba peristáltica, o sistema com etanol até pressão de 300 bar (manter válvula de saída fechada);
- 15) Conectar um novo frasco à saída do sistema e proceder a extração pelo tempo determinado, escoando-se etanol pelo extrator na vazão de $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- 16) Despressurizar o sistema lentamente;
- 17) Trocar frasco;
- 18) **Etapa 4:** pressurizar, utilizando a bomba peristáltica, o sistema com etanol/água até pressão de 300 bar;
- 19) Proceder a extração pelo tempo determinado;
- 20) Despressurizar o sistema lentamente;
- 21) Desligar banho termostatizado;
- 22) Coletar amostra (resíduo final) remanescente no extrator.

Após a etapa 1, os cartuchos provenientes da extração com *Melia azedarach* foram pesados, lacrados com parafilme e armazenados a -26°C , assim como os demais extratos.

Os extratos SCE, SCEE, EE e HE foram concentrados em rotaevaporador (Evaporador rotativo Marconi, MA-120, Brasil) e mantidos em estufa (Marconi, MA030/12, Brasil) sob vácuo (Bomba de vácuo Marconi, MA057/1, Brasil) à 50°C até peso constante (Balança analítica, Precisa XT 220A). Os rendimentos das extrações, em base úmida, foram calculados de acordo com a Equação 4.4.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa extrato}}{\text{massa matéria-prima}} \times 100 \quad (4.4)$$

4.4.1 Cinética de Extração

Curvas cinéticas de extração (massa de extrato vs. tempo de extração) foram construídas coletando-se, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, amostras de extratos. A construção dessas curvas é de fundamental importância para conhecer o comportamento da extração ao longo do tempo.

A metodologia de extração é a mesma descrita no **Procedimento Experimental de Extração Sequencial em Leito Fixo**, porém ocorre a substituição dos frascos coletores durante o período de extração.

Os intervalos de tempo para coleta dos extratos variou de acordo com a etapa de extração. Para a etapa 1 (extração com scCO₂), amostras de extrato foram coletadas a cada 20 minutos na primeira hora e nas duas horas seguintes a cada 30 minutos de extração. A partir da terceira hora de extração procedeu-se a coleta de amostras em intervalos de 60 minutos. Para as demais etapas (scCO₂ + etanol; etanol; etanol + água), procedeu-se da seguinte forma: na primeira hora, extratos foram coletados de 15 em 15 minutos; na segunda, de 20 em 20 minutos; na terceira, de 30 em 30 minutos e nas horas seguintes foi coletada uma amostra por hora de extração.

Os extratos obtidos foram concentrados, secos e pesados nas mesmas condições descritas no item anterior. O rendimento acumulado, em base úmida, foi calculado de acordo com a Equação 4.5.

$$\text{Rendimento Acumulado (\%)} = \frac{\text{massa extrato acumulado}}{\text{massa matéria-prima}} \times 100 \quad (4.5)$$

As extrações foram realizadas em triplicata sendo que, das 3 extrações feitas para cada matriz vegetal, duas foram de forma a se obter curvas de extração (ensaio 1 e 2) e a outra como uma extração total (ensaio 3) para se obter um único extrato, ou seja, exatamente como descrito no **Procedimento Experimental de Extração Sequencial em Leito Fixo**.

4.5 Métodos de Análises dos Extratos

4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os perfis cromatográficos dos extratos foram obtidos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 F₂₅₄ (1.05554.0001, Merck, Alemanha) e a fase móvel foi uma solução de clorofórmio (Synth, Brasil): metanol (Synth, Brasil): ácido trifluoracético 0,5% (Vetec, Brasil) (60:40:5). Como revelador foi utilizada uma solução de p-anisaldeído (revelador inespecífico), preparada como descrito a seguir.

Preparo do Revelador

A solução de p-anisaldeído foi preparada adicionando, na ordem descrita, os seguintes reagentes: 50 mL de ácido acético glacial (Synth, Brasil), 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Synth, Brasil) e 0,5 mL de p-anisaldeído (A0519, Sigma Aldrich, EUA).

Extratos secos foram previamente solubilizados (8 a 10 mg.mL⁻¹) em uma mistura de n-hexano e gotas de diclorometano, metanol ou uma solução de metanol:água:n-butanol (70/30/gotas), de acordo com a polaridade do extrato obtido. O resíduo da extração, material remanescente no extrator, também foi analisado misturando-se uma pequena quantidade de amostra com a mesma solução de metanol, n-butanol e água.

Como referências foram utilizados a β -ecdisona (20-hydroxyecdysone, Sigma-Aldrich H5142, pureza de 93 %) e extratos fornecidos pela Dr. Carmen Queiroga, obtidos por extração convencional em sistema Soxhlet, conforme descrito em 4.3.

As amostras solubilizadas foram aplicadas com um capilar de vidro no ponto de partida. Após aplicação das amostras, as placas foram colocadas em cubas já saturadas contendo o eluente (fase móvel) para o desenvolvimento cromatográfico. Após a eluição, a cromatoplaça foi aquecida em estufa a 105 °C, avaliada sob luz UV a λ 254 nm e λ 366 nm e, após borrifar o revelador, a placa foi novamente aquecida em estufa (105 °C) por 5 minutos (Wagner et al., 1984).

4.5.2 Tensão Superficial

Para a avaliação do potencial de redução da tensão superficial dos extratos contendo saponinas os resultados obtidos foram comparados com os dados de tensão superficial de um surfactante sintético, dodecil sulfato de sódio (solução referência).

Soluções aquosas de dodecil sulfato de sódio (Synth 90 % pureza, Brasil) em concentrações na faixa de 0,01 até 50 g.L⁻¹ foram preparadas. A tensão superficial das soluções foi determinada a 24 °C em um tensiômetro (Digital Tensiometer K10ST, Krüss, Alemanha), utilizando um anel de Pt-Ir.

Os extratos testados foram solubilizados em água deionizada de forma a se obter uma concentração de 20 g.L⁻¹. Estes foram avaliados quanto à tensão superficial nas mesmas condições descritas para as soluções de dodecil sulfato de sódio. As análises foram realizadas em triplicata.

4.5.3 Fenóis Totais

A determinação quantitativa de fenóis totais nos extratos de *Melia azedarach* foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de Singleton et al. (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (mg EAG/g extrato).

Inicialmente, uma curva analítica de ácido gálico (Sigma Aldrich, EUA), foi preparada transferindo 9,0 mL de água deionizada e alíquotas de 1,0 mL das soluções aquosas de ácido gálico de concentração entre 0,03 e 0,18 mg/mL para balões volumétricos de 25,0 mL. O reagente de Folin-Ciocalteu (1,0 mL) (Dinâmica, Brasil) foi adicionado e a mistura agitada. Após 5 minutos foram adicionados 10,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 7,0 % m/v (Êxodo, Brasil) e o volume completado com água deionizada. Após permanecer 90 minutos a 23 °C na ausência de luz, a absorbância foi determinada a 750 nm em um espectrofotômetro (2800 UV/VIS Spectrophotometer, UNICO, EUA). A solução referência (branco) foi obtida a partir da mesma metodologia, sendo adicionados 1,0 mL de água

deionizada como substituto da solução de ácido gálico. A curva analítica foi construída em duplicata.

Para a quantificação de fenóis totais nas amostras dos extratos secos, estes foram inicialmente diluídos em etanol (Êxodo, Brasil). As análises foram realizadas em triplicata e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a curva analítica de ácido gálico.

4.5.4 Flavonoides Totais

Para a quantificação dos flavonoides totais foi empregado o método desenvolvido por Zhishen et al. (1999), no qual os resultados são expressos em equivalente de catequina (mg EC/g extrato).

Soluções aquosas padrão de catequina (Sigma Aldrich, EUA) em concentração variando de 0,03 a 0,18 mg/mL foram preparadas. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução e 0,3 mL de uma solução de nitrito de sódio 5,0 % (m/v) (Ecibra, Brasil) foram adicionados a um balão volumétrico de 10,0 mL contendo 4,0 mL de água deionizada. Após 5 minutos, adicionou-se 0,3 mL de uma solução de cloreto de alumínio 10,0 % (m/v) (Ecibra, Brasil) e, após 6 minutos, 2,0 mL de hidróxido de sódio 1,0 M (Êxodo, Brasil). O volume do balão foi completado com água deionizada. A absorbância da solução foi determinada a 510 nm em um espectrofotômetro (2800 UV/VIS Spectrophotometer, UNICO, EUA). A análise foi realizada em duplicata.

Para determinação do teor de flavonoides totais nas amostras de extrato seco, estas foram inicialmente diluídas em etanol (Êxodo, Brasil). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito para o preparo curva analítica de catequina e verificou-se se o valor obtido de absorbância estava dentro da faixa de absorbância da curva. Foram realizadas análises em triplicata.

4.5.5 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas no CPQBA/ UNICAMP pela Dra. Carmen Lucia Queiroga. As análises foram conduzidas em cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6890 com detector seletivo de massas 5975 por dois métodos distintos.

Os dois métodos utilizaram a coluna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) e injeção do modo split com razão 1:30. Hélio foi usado como gás de arraste na vazão de 1 mL.min⁻¹ e o sistema de ionização de elétrons foi de 70 eV. Os métodos diferem quanto ao programa de aquecimento e temperaturas do injetor e detector, como mostrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Métodos de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas utilizados para análises de extratos de frutos de *Melia azedarach*.

Parâmetros	Método 1	Método 2
Programa de Aquecimento	60 °C - (3 °C.min ⁻¹) - 240 °C	110 °C - (5 °C/min) - 280 °C
Temperatura do Injetor	220 °C	250 °C
Temperatura do Detector	250 °C	300 °C

O extrato SCE-V, retido na armadilha Porapak-Q, foi inicialmente lavado, por eluição, com 15 mL de diclorometano (Merck, Alemanha). A solução obtida foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C, seca em estufa, e pesada. O extrato seco obtido foi solubilizado em volume pré-determinado de acetato de etila de forma a se preparar uma solução de aproximadamente 20 mg.mL⁻¹.

Injetou-se 1,0 μ L da solução no equipamento e a identificação dos constituintes químicos foi realizada a partir de seus respectivos espectros de massas, por comparação com os espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST.

4.5.6 Espectrometria de Massas (EM)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas pelo aluno Gustavo Duarte no *ThomSon Mass Spectrometry Laboratory*, localizado no Instituto de Química (UNICAMP) e coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Eberlin.

Inicialmente, uma solução estoque 7 % de ácido fórmico (Merck, Alemanha) em água deionizada e metanol (Tedia, Fairfield, OH, EUA) (1:1) foi preparada. As soluções das amostras foram preparadas diluindo-se uma alíquota de 5 μL de cada amostra em microtubos de polipropileno (Eppendorf®) contendo 1 mL da solução estoque (ácido fórmico/metanol/água). Em seguida cada microtubo foi agitado num misturador Vortex durante 1 minuto.

As soluções das amostras foram diretamente infundidas a uma taxa de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para a fonte de ionização por ESI (*Electrospray Ionization*) do espectrômetro de massas Citius - HRT (Leco, St. Joseph, EUA). A sonda foi operada com 2,8 kV de tensão de pulverização, 20 psi de pressão do gás de nebulização, vazão de dessolvatação de 5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de dessolvatação de 300 °C e a temperatura do injetor de 120 °C. Os espectros no modo positivo e negativo foram adquiridos na faixa de razão massa/carga (m/z) de 100 a 1000 e acumulados por 60 s via software Chroma-TOF.

Os experimentos de Dissociação Induzida por Colisão foram realizados em LCMS-8040 (Shimadzu, JP), com uma interface de eletropulverização numa energia de colisão de 10 V, temperatura de dessolvatação de 250 °C, vazão do gás de nebulização de 3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do bloco de aquecimento de 400 °C e fluxo de secagem de 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de gás foram adquiridos por 60 s usando um software LabSolutions.

4.6 Análises Estatísticas

Todos os resultados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para comparação entre médias. Essas comparações foram realizadas pelo teste de

Tukey a 5 % de significância empregando o software estatístico Minitab 16 (versão 16.2.1, 2011, Minitab Inc.).

5. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos, assim como as discussões pertinentes em cada item. Os resultados são mostrados de acordo com a análise em questão apresentando-se, simultaneamente, os resultados para as diferentes matrizes vegetais.

Inicialmente são discutidos os resultados preliminares que, de alguma forma, contribuíram para o andamento deste projeto.

5.1 Resultados Preliminares

O objetivo deste trabalho consistiu em fracionar saponinas presentes em extratos metanólicos brutos obtidos de forma convencional. Inicialmente, foram realizadas extrações, de forma a se obter uma curva cinética (procedimento descrito no item 4.3.1), a partir de um extrato metanólico bruto de raízes de *Pfaffia glomerata* obtido por sistema Soxhlet. Os rendimentos de extração em cada uma das etapas estão apresentados na Tabela 5.1 e os demais resultados envolvendo este experimento (cinética de extração e cromatogramas) encontram-se no Apêndice B.

Tabela 5.1 Rendimento de extração obtido a partir do extrato metanólico convencional de *Pfaffia glomerata*.

Etapas	Fração	Rendimento (%)
1	SCE	0,38
2	SCEE	0,92
3	EE	22,65
4	HE	31,86
	Global	55,81

As etapas 1 (SCE) e 2 (SCEE) apresentaram rendimentos bem inferiores aos rendimentos das etapas 3 (EE) e 4 (HE). Como a matriz vegetal, neste caso, é um extrato obtido por Soxhlet utilizando metanol como solvente, este resultado era esperado, uma vez que o metanol apresenta alta polaridade e o CO₂ de característica oposta.

Por outro lado, pelo processo de extração sequencial utilizar solventes (na última etapa) de polaridade alta, similar ao metanol, esperava-se um rendimento de extração acumulado próximo a 100 % fornecendo, portanto, um fracionamento completo do extrato metanólico.

De acordo com os cromatogramas apresentados no Apêndice B (Figura B.2), observa-se a presença de quatro manchas no extrato bruto inicial (EB). Comparando-o com as frações obtidas neste trabalho é importante ressaltar que algum grau de fracionamento dos extratos foi alcançado, pois observa-se uma mancha de baixa polaridade nas frações recolhidas por scCO₂. Já em SCEE outros compostos polares e apolares estão presentes. As frações etanólica e hidroalcoólica apresentaram-se com perfil similar ao extrato bruto.

Entretanto, é notória a presença significativa de compostos de interesse no resíduo final, indicando que uma massa expressiva de extrato não conseguiu ser fracionada. Assim, pensando na viabilidade econômica do processo, decidiu-se testá-lo, nas mesmas condições, com raízes de *Pfaffia glomerata* secas e trituradas. Os resultados (descrito nos itens subsequentes) foram satisfatórios, sendo este procedimento adotado como padrão e realizado para as demais matrizes vegetais.

5.2 Caracterização das Matérias-Primas

Os resultados das análises de caracterização das matérias-primas estão listados na Tabela 5.2.

Os resultados indicam que as três amostras utilizadas apresentaram teores similares de umidade (em torno de 10 %). A presença de água na matéria-prima aumenta a resistência à transferência de massa e dificulta o contato entre o solvente supercrítico e os solutos de

interesse. Além disso, a água presente pode atuar como cossolvente no processo, levando a extração de outros compostos (Mchugh e Krukoniš, 1994).

Tabela 5.2 Caracterização das matrizes vegetais secas e moídas.

Propriedade	Matriz vegetal		
	<i>Pfaffia glomerata</i>	<i>Hebanthe eriantha</i>	<i>Melia azedarach</i>
Voláteis Totais, VT (%)	10,20 ± 0,15	9,77 ± 0,34	10,89 ± 0,23
Umidade, U (%)	9,96 ± 0,35	8,83 ± 0,60	9,50 ± 0,14
Diâmetro Médio das Partículas, d_{gw} (mm)	0,21*	0,41 ± 0,01	0,72 ± 0,04
Densidade Real, ρ_r (g/cm ³)	1,49 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,46 ± 0,01
Densidade Aparente, ρ_a (g/cm ³)	0,78 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,60 ± 0,01
Porosidade, ε	0,48 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,59 ± 0,01

* A análise foi realizada sem repetição por quantidade insuficiente de amostra.

A diferença entre os resultados de voláteis totais e umidade indicaram a quantidade de compostos voláteis (exceto água) presente nas amostras. Portanto, o percentual de voláteis para *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach* foi $0,24 \pm 0,50$, $0,94 \pm 0,94$ e $1,39 \pm 0,37$, respectivamente. Observa-se que, devido à incerteza dos valores, não se pode confirmar a presença de compostos voláteis em *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*.

O diâmetro médio das partículas é uma propriedade de fundamental importância em processos de extração com fluidos supercríticos. Diversos autores estudaram a influência do tamanho das partículas nos rendimentos de extração e, em geral, menores diâmetros de partículas geram rendimentos mais elevados. Estes incrementos nos rendimentos de extração podem ser explicados em termos do efeito positivo da redução do tamanho de partícula sobre a resistência à transferência de massa interna em matriz sólida, ou seja, a taxa de extração

aumenta devido ao encurtamento do caminho de difusão. Além disso, partículas menores provocam um aumento na área de superfície específica deixando o soluto mais acessível ao solvente supercrítico (Scapinello et al., 2013). As materiais vegetais de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach* apresentaram diâmetros médios de 0,21; 0,41 e 0,72 mm, respectivamente, e suas distribuições de tamanho são apresentadas no Apêndice C.

Vale ressaltar que partículas menores de raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* foram utilizadas devido ao poder de penetração dos solventes depender, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, ou seja, é necessário considerar que quanto mais rígido o material (como raízes), menor deve ser a sua granulometria (Vasconcelos et al., 2005).

A porosidade medida para as espécies de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach* foram 0,48; 0,62 e 0,59, respectivamente. Em testes preliminares foi observado que a porosidade do leito formado pela amostra de *Pfaffia glomerata* era excessivamente pequena, não permitindo a passagem do solvente (líquido) pelo leito. Este resultado foi confirmado pelo valor obtido a partir das análises de densidade realizadas no material (0,48 g.cm⁻³). Por outro lado, utilizando amostras com maior valor de diâmetro médio das partículas verificou-se redução de aproximadamente 50 % do rendimento na primeira etapa extração (SCE). A partir desta observação, decidiu-se utilizar esferas de vidro de aproximadamente 5 mm misturadas ao material vegetal para empacotar o extrator, adotando-se este procedimento para todas as extrações, independente da espécie em estudo.

5.3 Rendimentos e Cinéticas de Extração

5.3.1 Rendimentos de Extração

Na Tabela 5.3 são apresentados os rendimentos de extração, em base úmida, para cada uma das etapas de extração e para as três matrizes vegetais em estudo. Os menores rendimentos de extração foram obtidos para os extratos supercríticos (SCE) de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, os quais apresentaram rendimentos de 0,16 % e 0,17 %, respectivamente. Comparando estes resultados com dados de rendimento por LPSE (*low*

pressure solvent extraction) obtidos por Leal et al. (2010) a 0,1 bar com hexano (0,1 % (b.s)), verifica-se baixa presença de compostos apolares nestas espécies, uma vez o scCO₂, assim como o hexano, extraem substâncias apolares e/ou de baixa polaridade.

Tabela 5.3 Rendimentos de extração em leito fixo a 300 bar e 50 °C para extratos de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*.

Extrato	Rendimento (%)		
	<i>Pfaffia glomerata</i>	<i>Hebanthe eriantha</i>	<i>Melia azedarach</i>
SCE	0,16 ± 0,07	0,17 ± 0,03	7,6 ± 1,3
SCE-V	-	-	0,63 ± 0,31
SCEE	0,55 ± 0,09	0,58 ± 0,04	6,4 ± 1,1
EE	1,00 ± 0,09	0,89 ± 0,09	19 ± 2
HE	6,9 ± 3,3*	28 ± 11*	12,3 ± 0,4
Global	8,6 ± 3,5	30 ± 11	46 ± 2

SCE: Extrato supercrítico; SCE-V: Fração volátil do SCE; SCEE: Extrato supercrítico com etanol; EE: Extrato etanólico; HE: Extrato hidroalcoólico.

*Desvios-padrão altos devido à instabilidade do sistema nesta etapa da extração.

Estes resultados são similares aos encontrados por Leal et al. (2010), que obtiveram, nas mesmas condições de pressão e temperatura (300 bar e 50 °C), rendimentos globais de 0,16 % (b.s.) para *Pfaffia glomerata* e 0,21 % (b.s.) para *Hebanthe eriantha*. Leal et al. (2010) também realizaram extrações com raízes de *Pfaffia glomerata* utilizando scCO₂ e etanol como cossolvente. Para extratos supercríticos obtidos a 200 bar e 30 °C com 10 % (v/v) de etanol foi obtido um rendimento de 0,56 % (b.s.). Vale ressaltar que as partículas utilizadas por Leal et al. (2010) apresentavam 7,89 µm de diâmetro e as usadas neste estudo, 0,2 mm. No entanto, os resultados foram similares.

Extratos etanólicos (EE) de *Hebanthe eriantha* apresentaram um rendimento de extração de 0,89 %, resultado mais satisfatório que o obtido por Leal et al. (2010) sob baixa

pressão, no qual o rendimento para extratos etanólicos foi 0,4 % (b.s.). Este resultado mostra o efeito positivo do aumento da pressão no processo de extração de compostos de raízes de *Hebanthe eriantha* utilizando etanol como solvente.

O rendimento do extrato hidroalcoólico (HE) de *Hebanthe eriantha* (28 %) foi aproximadamente quatro vezes maior que o obtido a partir de raízes de *Pfaffia glomerata* (6,9 %). Este resultado sugere maior presença de substâncias polares na espécie de *Hebanthe eriantha*, quando comparada a *Pfaffia glomerata*.

Os extratos supercríticos (SCE) de *Melia azedarach* apresentaram rendimento de extração de 7,6 %, valor superior ao encontrado por Scapinello et al. (2013) (5,2 %). Porém, Scapinello et al. (2013) realizaram seus experimentos a 250 bar e 60 °C, condições operacionais diferentes das usadas neste trabalho (300 bar e 50 °C).

Os rendimentos de extração obtidos a partir de frutos de *Melia azedarach* foram 7,6; 6,4; 19 e 12,3 % (Tabela 5.3) para as quatro etapas de extração, respectivamente. Segundo Orhan et al. (2012a), utilizando extração clássica/maceração com solventes na ordem crescente de polaridade: n-hexano, acetato de etila, metanol e água, os rendimentos de extração foram 48,4; 0,7; 37,1 e 9,3 %, respectivamente. Entretanto, os rendimentos de extração não podem ser comparados devido à diferença no processo de obtenção dos extratos. No entanto, o processo em leito fixo proposto apresenta as vantagens de ser realizado por solventes “limpos” e tempo inferior (item 5.3.2) ao descrito por Orhan et al. (2012a). Ainda, é importante ressaltar que não se deve considerar a eficiência do processo somente com base nos dados de rendimento, devem ser realizadas análises para se verificar e quantificar os compostos de interesse em cada extrato. Por isso, análises de composição destes extratos são apresentadas a partir da seção 5.4.

O rendimento em compostos voláteis (SCE-V) de *Melia azedarach* foi 0,63 %. Não há na literatura resultados quantitativos sobre compostos voláteis em frutos de *Melia azedarach*. Jung et al. (2013) teve o intuito de avaliar a atividade inseticida do óleo volátil de folhas de *Melia azedarach*, porém a quantidade de óleo obtida por hidrodestilação foi muito baixa, impossibilitando a análise.

Na Figura 5.1 é apresentado um diagrama de barras comparando os rendimentos de extração entre as três matrizes vegetais estudadas. Observa-se que, em geral, os rendimentos de extração para extratos de *Melia azedarach* são maiores que os rendimentos de extratos de ginseng brasileiro, exceto para o extrato hidroalcoólico, que apresentou maior rendimento em extrações a partir de raízes de *Hebanthe eriantha*.

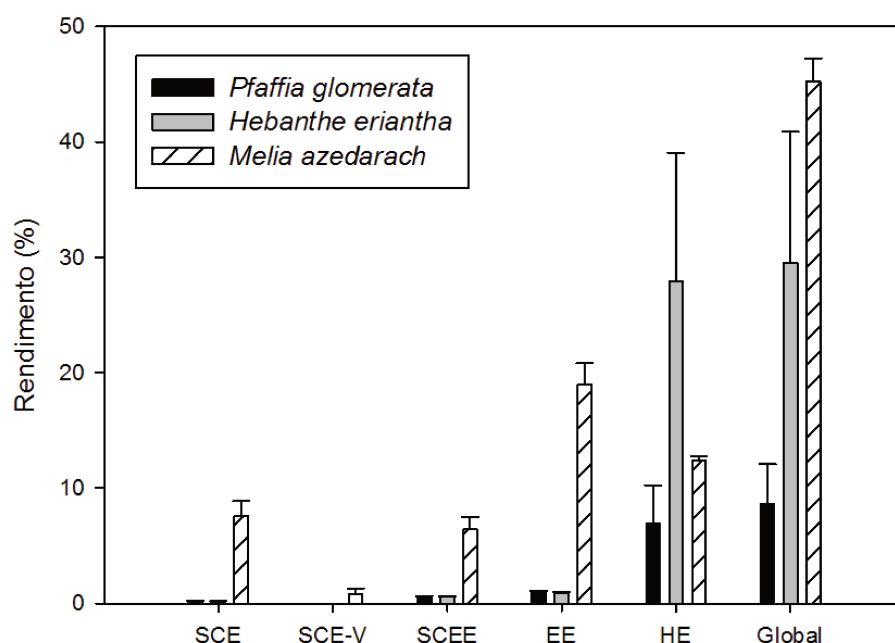


Figura 5.1 Comparação entre os rendimentos de extração para *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*.

Observou-se também que há maior presença de compostos de menor polaridade em frutos de *Melia azedarach*, como pode ser verificado pela estrutura dos compostos presentes nesta espécie apresentados no Apêndice A (Figura A.3).

As duas espécies de ginseng brasileiro apresentaram comportamento similar durante as três primeiras etapas de extração (SCE, SCEE e EE), ocorrendo uma diferença significativa somente na etapa de extração com solução hidroalcoólica (HE). Considerando os desvios padrões dos rendimentos de HE destas espécies, pode-se dizer que o rendimento

de extração a partir de *Hebanthe eriantha* é no mínimo 1,6 vezes maior que o de *Pfaffia glomerata*.

A partir das análises estatísticas (ANOVA, one-way) as médias dos rendimentos nas diferentes etapas foram comparadas para cada matriz vegetal, como pode ser visualizado na Figura 5.2, na qual letras iguais indicam igualdade de médias ($p < 0,05$). Os resultados mostram comportamentos diferentes do rendimento de extração em relação ao tipo de solvente utilizado na extração.

Para extrações a partir de raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* observa-se que quanto maior a polaridade do solvente ou mistura de solventes utilizados maiores rendimentos de extração são obtidos, sendo que a etapa com maior rendimento de extração foi realizada com uma mistura etanol/água (70:30 v/v) como solvente (extrato HE). Além disso, observa-se que não houve diferença significativa entre o rendimento de HE e o rendimento global, indicando que os rendimentos de extração das três primeiras etapas foram insignificantes diante do rendimento obtido na última etapa de extração.

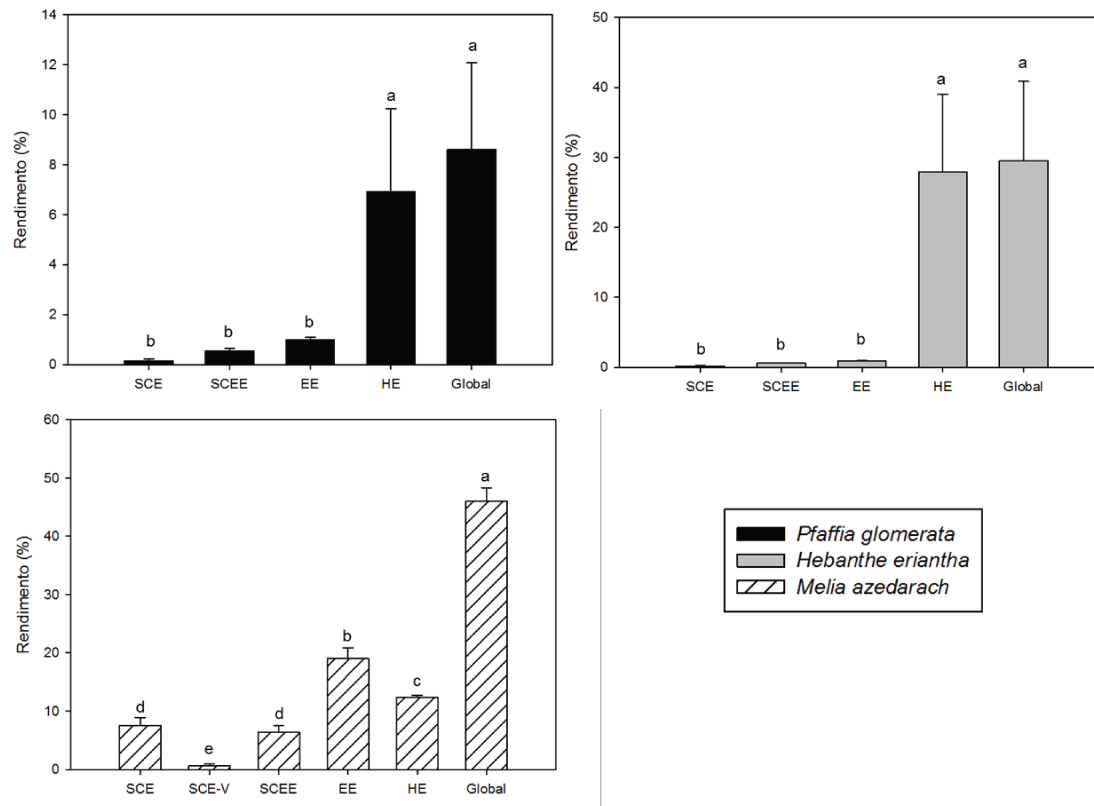


Figura 5.2 Análises estatísticas dos rendimentos de extração para raízes de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Extratos de frutos de *Melia azedarach* apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao rendimento de extração, indicando a influência significativa do solvente empregado na quantidade de material extraído. O maior rendimento de extração foi obtido para o extrato etanólico (EE), seguido do extrato hidroalcoólico (HE). Os extratos supercríticos (SCE e SCEE) apresentaram médias (rendimento) estatisticamente iguais, e a fração volátil (SCE-V) foi a obtida em menor quantidade.

Os resultados de extração obtidos sugerem que as plantas com composição química similar (*Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*) tiveram o mesmo perfil de extração. No entanto, extrações a partir dos frutos de uma planta de composição bastante diferenciada, como a *Melia azedarach*, apresentaram comportamento diferente das demais. Este fato pode estar associado à parte da planta em estudo e a sua composição química.

5.3.2 Cinéticas de Extração

A Figura 5.3 apresenta a curva global de extração sequencial em leito fixo representada pelo rendimento acumulado *versus* razão de massa de solvente por massa de amostra inicial (aproximadamente 7 g) para raízes de *Pfaffia glomerata*. Para uma melhor visualização da curva global, o gráfico encontra-se em escala logarítmica. Porém, pode-se observar, comparando-o com a Figura 5.4, que o comportamento das curvas é alterado, portanto para todas as espécies em estudo são apresentadas curvas individuais de cada etapa. Todos os dados de extração, para as três matrizes vegetais, encontram-se no Apêndice D.

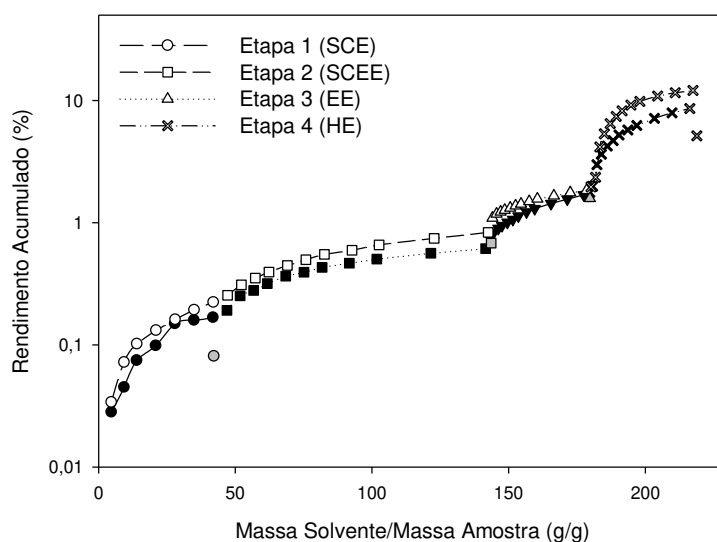


Figura 5.3 Curva global de extração para raízes de *Pfaffia glomerata* em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

O tempo de extração variou de acordo com as etapas da extração sequencial. Os experimentos foram realizados até que o período difusional aparentemente fosse atingido através da visualização da coloração do extrato, garantindo que os ensaios apresentassem resultados próximos ao esgotamento do leito de extração, ou até no máximo por 6 horas para cada etapa visto que houve limitações em algumas etapas, cuja coloração do extrato não se

apresentava bem característica e ainda porque as saponinas, compostos de interesse, são incolores.

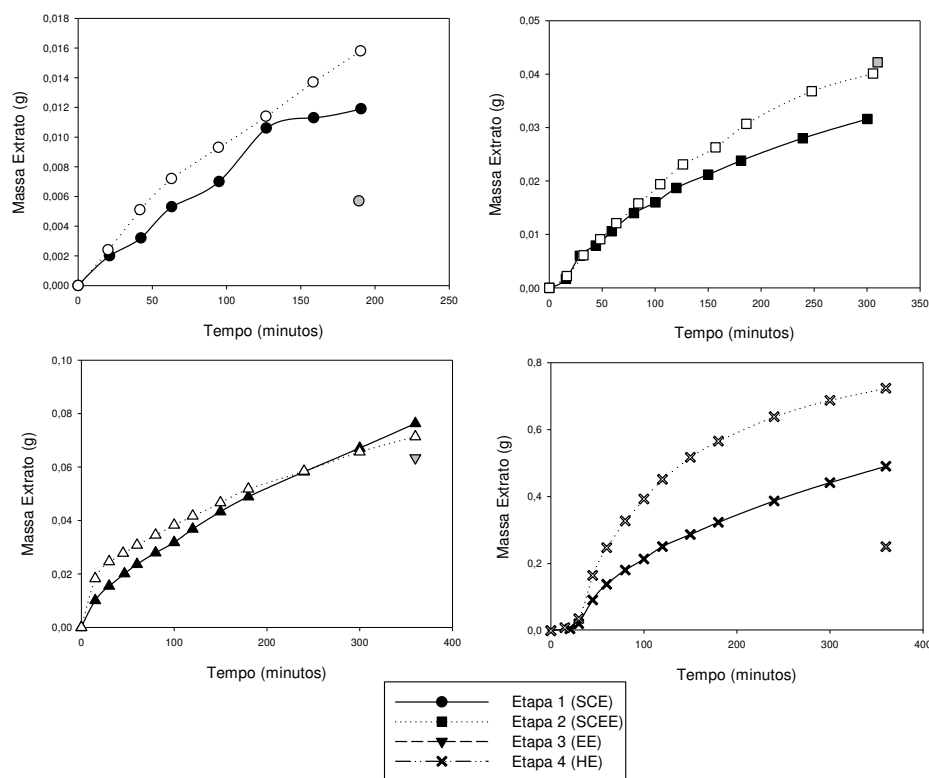


Figura 5.4 Curvas de extração para raízes de *Pfaffia glomerata* em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

O tempo de extração para raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* foram iguais em todas as etapas: 3, 5, 6 e 6 horas, respectivamente, totalizando 20 horas de extração. A extração supercrítica (etapa 1) foi realizada por 3 horas. Nesta etapa, as massas de extratos supercríticos (SCE) obtidos foram pequenas, o que dificultou suas pesagens. Este fato pode explicar a irregularidade nos pontos obtidos nesta etapa de extração, tanto para extratos supercríticos de *Pfaffia glomerata* quanto de *Hebanthe eriantha*, apresentados nas Figuras 5.4 e 5.6.

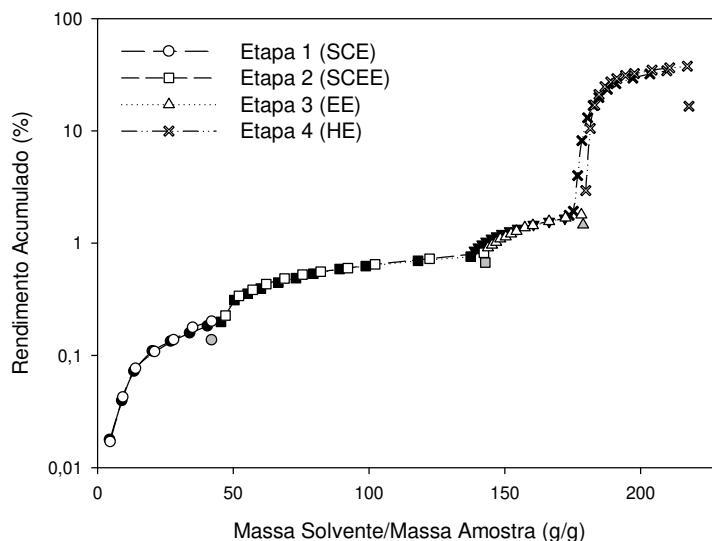


Figura 5.5 Curva global de extração para raízes de *Hebanthe eriantha* em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

Extratos SCEE (etapa 2) foram obtidos durante 5 horas. A curva de extração mostrou que houve uma queda na taxa de extração nas últimas horas do processo, pois aproximadamente 75 % do extrato SCEE foi extraído durante as 3 primeiras horas de extração. As duas últimas etapas (extração etanólica e hidroalcoólica) foram realizadas durante 6 horas cada e, neste caso, até as 3 primeiras horas foram extraídos, em média, 68 e 72 % dos extratos EE e HE, respectivamente.

As curvas de extração para raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* apresentaram-se semelhantes nas etapas 1 e 2. Na primeira etapa, não se observou queda significativa na taxa de extração durante as 3 horas de extração. E, aproximadamente 75 % dos extratos SCEE das duas matrizes vegetais foram extraídos nas 3 primeiras horas de extração com supercrítico + etanol como solvente.

O extrato etanólico (EE – etapa 3) (Figura 5.6) de raízes de *Hebanthe eriantha* mostrou ser o extrato que precisou de maior tempo de extração para esta espécie, visto que apresentou menor queda na taxa de extração ao longo do processo comparando com as demais etapas, extraindo apenas 64 % do total de extrato EE nas três primeiras horas de

extração. Por outro lado, o extrato hidroalcoólico (HE – etapa 4) apresentou maior queda na taxa de extração, extraindo aproximadamente 80 % do total com metade do tempo de extração.

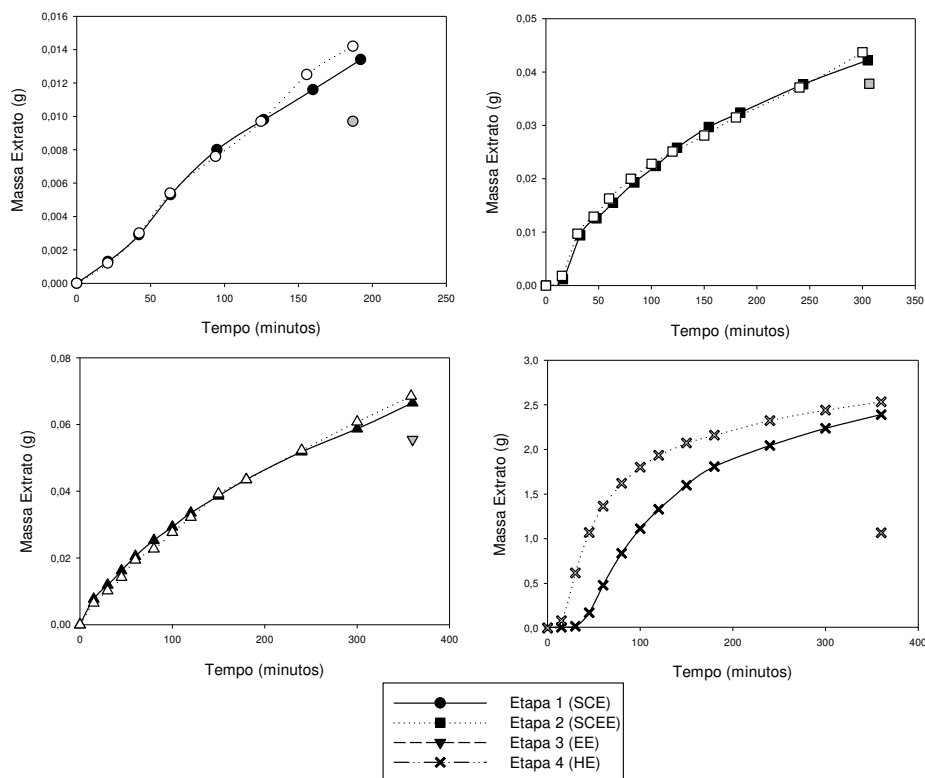


Figura 5.6 Curvas de extração para raízes de *Hebanthe eriantha* em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

Nas Figuras 5.7 e 5.8 estão representadas as curvas globais das quatro etapas de extração a partir de frutos de *Melia azedarach*. Diante dos valores relativamente próximos dos rendimentos em todas as etapas de extração, a curva cinética apresentada na Figura 5.7 não precisou ser apresentada em escala logarítmica.

Observou-se que as curvas de extração para essa matriz vegetal apresentaram reprodutibilidade bem melhor que as curvas de extração de raízes de ginseng brasileiro. Acredita-se que este fato tenha ocorrido pelo maior rendimento de extração com extratos de

Melia azedarach, diminuindo o erro associado a pesagem dos frascos e também devido à maior estabilidade do sistema durante a extração com esse tipo de matriz vegetal.

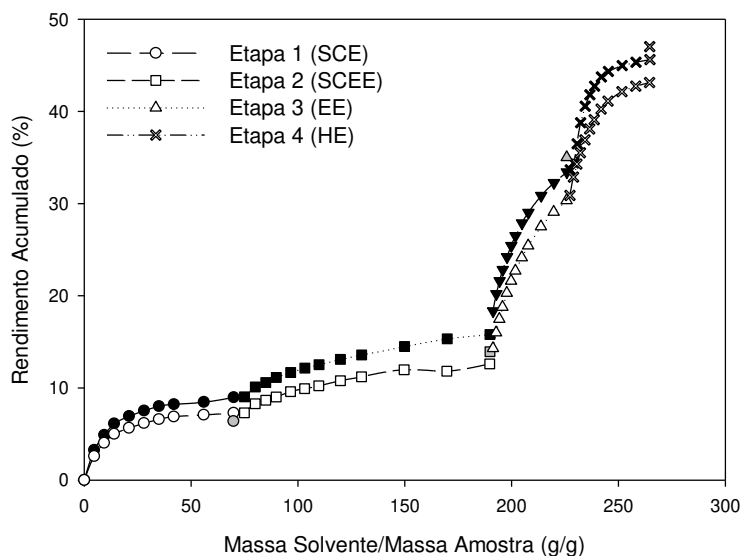


Figura 5.7 Curva global de extração para frutos de *Melia azedarach* em leito fixo a 300 bar e 50 °C. Etapa 1: scCO₂; etapa 2: mistura scCO₂/etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

Para extrações a partir de frutos de *Melia azedarach*, a etapa 1 (SCE) foi realizada durante 5 horas e as demais em 6 horas cada. Observou-se que extrações de extratos supercríticos (SCE – etapa 1) e hidroalcoólicos (HE – etapa 4) atingiram o período no qual a difusão controlou o processo de extração e a quantidade de extrato obtida foi muito pequena, sugerindo que o leito de partículas tendia para seu esgotamento.

Com 3 horas de extração supercrítica, quantidade maior que 90 % do total de extrato SCE obtido havia sido extraída e, da mesma forma, mais de 80 % do extrato hidroalcoólico (HE) total foi extraído com o mesmo tempo de extração. Este resultado sugere que, em escala comercial, seria mais viável economicamente realizar essas etapas de extração (etapas 1 e 4) durante apenas 3 horas pois, após esse período, a quantidade de extrato obtida é muito pequena comparado a quantidade de solvente utilizado.

Por outro lado, para as etapas 2 e 3 (realizadas com a mistura scCO_2 e etanol 70:30 (m/m) e etanol, respectivamente), a queda da taxa de extração não foi tão acentuada e após 3 horas de extração aproximadamente 68 e 74 % do total de extrato SCEE e EE, respectivamente, haviam sido extraídos, indicando que o processo de extração provavelmente se apresentava na etapa de taxa de extração decrescente.

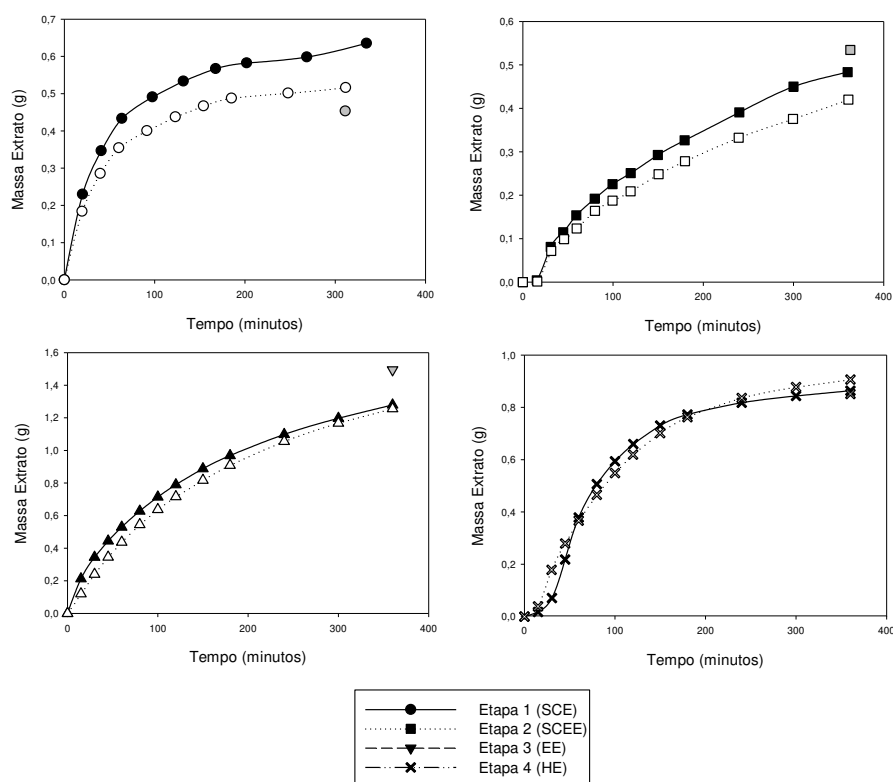


Figura 5.8 Curvas de extração para frutos de *Melia azedarach* em leito fixo a 300 bar e 50 °C representadas por etapas. Etapa 1: scCO_2 ; etapa 2: mistura scCO_2 /etanol (70:30 m/m); etapa 3: etanol; etapa 4: mistura etanol/água (70:30 v/v).

A maior facilidade de extração dos compostos presentes em frutos de *Melia azedarach* era esperada, visto que o poder de penetração dos solventes depende da histologia (estrutura) dos tecidos que formam o material a extrair. A estrutura de raízes é mais sólida e compactada, logo o solvente encontra maior resistência para penetrar, propiciando um maior tempo de extração.

5.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nesta seção os extratos obtidos foram avaliados qualitativamente, quanto as suas composições químicas. A Figura 5.9 ilustra fotos dos extratos obtidos para as três matrizes vegetais, solubilizados nos solventes das respectivas extrações. Observa-se, apenas pelas diferenças de coloração entre os extratos, a seletividade dos solventes utilizados, o que remete a diferenças na composição química dos mesmos.

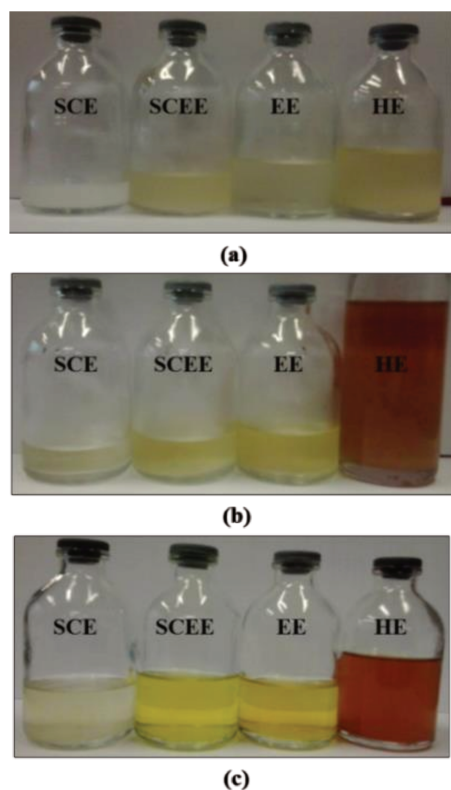


Figura 5.9 Extratos de *Pfaffia glomerata* (a), *Hebanthe eriantha* (b) e *Melia azedarach* (c).

A composição química das amostras, discutida a seguir, foi determinada com base nos extratos obtidos após o tempo total de extração para cada etapa, porém, análises por cromatografia em camada delgada também foram realizadas ao longo de cada extração, em diferentes tempos (ensaio 1 e 2, ver item 4.4.1). Os cromatogramas destas análises são apresentados no Apêndice E.

As Figuras 5.10, 5.11 e 5.12 apresentam os cromatogramas dos extratos provenientes de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*, respectivamente. São apresentados nos cromatogramas os extratos SCE, SCEE, EE e HE, assim como os extratos obtidos durante a despressurização do sistema ao final das etapas 2, 3, 4, o resíduo final remanescente no leito, e as amostras-referência utilizadas em cada uma das análises.

Para facilitar a avaliação da composição química, os compostos foram discutidos com base no seu fator de retenção (R_f), e codificados por números romanos.

A amostra-referência (aplicação 9), visualizada na Figura 5.10 consiste em um extrato metanólico enriquecido em saponinas de raízes de *Pfaffia glomerata* obtido por extração em sistema Soxhlet. Este apresenta cinco manchas distintas representadas por seus fatores de retenção (R_f). Com base no fator de retenção dos compostos e nas condições cromatográficas empregadas as quais foram anteriormente estudadas no CPQBA (Relatório Fapesp – proc. Nº 2006/06059-3, dados não publicados) sabe-se que o composto menos polar (I) representa a β -ecdisona (Apêndice E, Figura E.4), um esteroide, e os demais apontam saponinas de diferentes polaridades. Os compostos na região tracejada em destaque na Figura 5.10 não são de interesse deste trabalho.

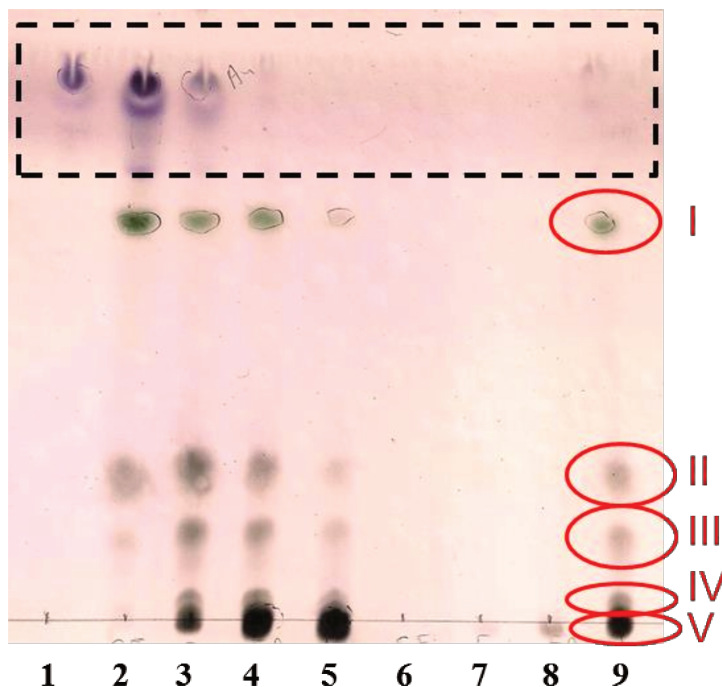


Figura 5.10 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como co-solvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

A localização das saponinas também puderam ser confirmadas neste trabalho a partir de análises de tensão superficial (item 5.5). Os extratos SCEE e EE apresentaram menor valor de tensão superficial indicando a presença de saponinas e como pode-se ver na Figura 5.10 há apenas 2 compostos (II e III) que estão presentes nestes dois extratos, além da β -ecdisona. Com isso, pode-se dizer que os compostos com maior capacidade de redução da tensão superficial são os compostos II e III, que representam as saponinas menos polares presentes nesta espécie.

A fase móvel empregada na separação cromatográfica dos diferentes extratos foi eficiente para o estudo com *Pfaffia glomerata* conforme visto na Figura 5.10, onde a aplicação 1 (amostra SCE) apresentou compostos apolares que não possuem interesse neste

estudo. O extrato SCEE (Figura 5.10, aplicação 2) apresentou, predominantemente, a β -ecdisona e as saponinas menos polares representadas por II e III.

O extrato obtido com etanol (EE, Figura 5.10, aplicação 3) possui uma mistura de β -ecdisona (I) com saponinas de diferentes polaridades, não podendo-se afirmar sobre a presença de algum composto majoritário neste tipo de extrato. Por fim, o extrato hidroalcoólico (HE, Figura 5.10, aplicação 4) difere-se do extrato EE por apresentar majoritariamente o composto V.

No resíduo final da extração (Figura 5.10, aplicação 5) observa-se a presença de saponinas, indicando que o processo de extração não conseguiu extrair todas as saponinas presentes na amostra inicial. Neste resíduo verificou-se predominância de compostos de alta polaridade, diferentemente do que foi observado no resíduo proveniente do fracionamento com extrato convencional de *Pfaffia glomerata* (Apêndice B, Figura B.2, fração 48), evidenciando um melhor fracionamento das saponinas nestas condições de trabalho.

Na Figura 5.11, é apresentado o cromatograma de extratos de raízes de *Hebanthe eriantha*, no qual o extrato padrão (aplicação 9) é um extrato enriquecido em saponinas obtido por extração em sistema Soxhlet com metanol. Algumas manchas provenientes dos extratos de *Hebanthe eriantha* foram visíveis somente sob luz ultravioleta a λ 254 nm. Estes compostos, juntamente como os compostos apolares nas condições empregadas não são de interesse deste trabalho e encontram-se na região tracejada da Figura 5.11. Portanto, para esta espécie, foram identificadas 5 manchas de interesse, com fatores de retenção de VI a X.

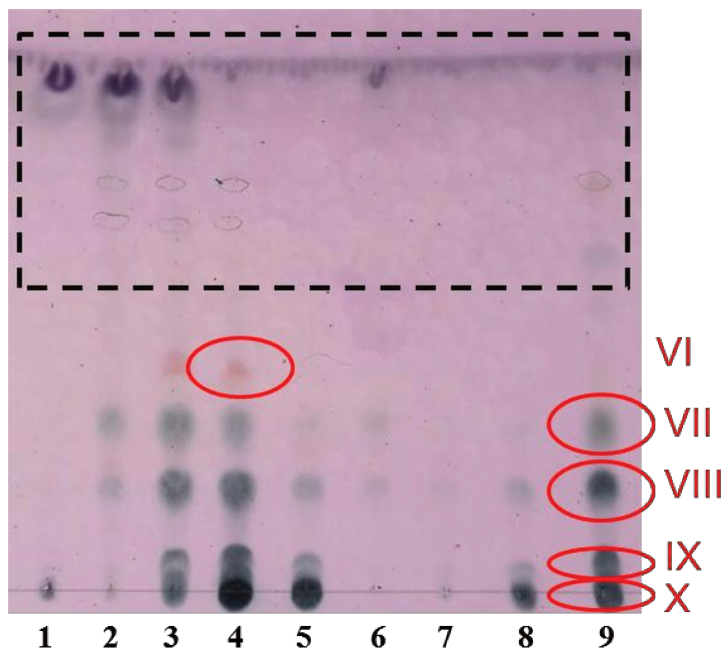


Figura 5.11 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha*. Aplicação: 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

O perfil dos extratos enriquecidos em saponinas de raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* apresentou importantes similaridades. Os dados de tensão superficial (item 5.5), para amostras de *Hebanthe eriantha*, indicaram que as saponinas com maior potencial de redução da tensão superficial encontram-se nos extratos SCE e EE (Figura 5.11, aplicações 2 e 3, respectivamente) portanto, para esta espécie as saponinas de interesse foram codificadas como VII e VIII. Estas saponinas estão em estudo por Espectrometria de massas (EM-ESI).

No extrato supercrítico (SCE, Figura 5.11, aplicação 1) observou-se a presença de compostos menos polares que as saponinas, provavelmente graxas, representados por uma mancha roxa na parte superior da cromatoplaça (Figura 5.11, composto na região tracejada). O extrato proveniente da etapa 2 (SCEE, Figura 5.11, aplicação 2) também apresentou

compostos que não são de interesse porém, nesta etapa, iniciou-se a obtenção das saponinas menos polares codificadas por VII e VIII.

O extrato etanólico (EE, Figura 5.11, aplicação 3) de raízes de *Hebanthe eriantha* apresentou, em relação às saponinas, um perfil cromatográfico similar aos extratos de *Pfaffia glomerata* (Figura 5.10, aplicação 3). Este extrato (EE), apesar de polar, ainda continham graxas e compostos apolares, demonstrando pouca seletividade.

O resíduo da extração, como se esperava, apresentou somente compostos mais polares, identificadas por VIII, IX e X. É importante salientar que o composto VI, de coloração vermelha (Figura 5.11) não pertence à classe das saponinas em estudo. Este fato é confirmado pela sua ausência no extrato metanólico de *Hebanthe eriantha* enriquecido em saponinas obtido por sistema Soxhlet (Figura 5.11, aplicação 9)

Segundo Wagner (1929) o *blood solvent* (solvente de sangue), é um revelador específico para saponinas cuja composição inclui solução citrato de sódio, sangue bovino fresco e tampão fosfato de pH 7,4. Utilizando este detector, zonas brancas são formadas na placa, devido à hemólise (quebra das hemácias), que pode ocorrer imediatamente ou após aquecimento. No entanto, este detector não foi usado neste trabalho devido a falta de estrutura laboratorial e das autorizações pertinentes necessárias para manuseio de material biológico.

Resumidamente, a partir da análise por CCD dos extratos provenientes de raízes de *Hebanthe eriantha* com foco nas saponinas, pode-se afirmar que houve um fracionamento parcial destes compostos, pois os extratos SCEE e EE carregaram as saponinas com maior potencial de redução da tensão superficial (VII e VIII).

Para extratos de *Melia azedarach* (Figura 5.12) as amostras-referência utilizadas como padrão foram o extrato metanólico de *Pfaffia glomerata* (Figura 5.10, aplicação 11) cujas saponinas foram anteriormente apresentadas e possuem valor de fator de retenção conhecido para este eluente, e amostras de extratos de *Melia azedarach* obtidas por sistema Soxhlet (a extração foi realizada com n-hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente). Vale ressaltar que foram utilizadas como referência os extratos obtidos na etapa com acetato de etila (Figura 5.12, aplicação 1) e metanol (Figura 5.12, aplicação 2).

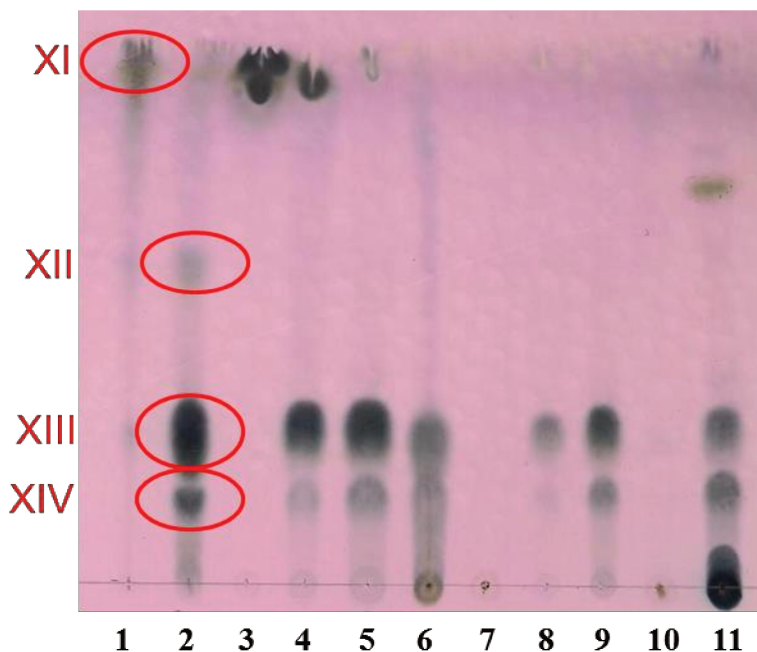


Figura 5.12 Cromatogramas (CCD) dos extratos de *Melia azedarach*. Aplicação: 1: extrato acetato de etila por Soxhlet (referência); 2: extrato metanólico por Soxhlet (referência) 3: SCE – extrato supercrítico; 4: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 5: EE – extrato etanólico; 6: HE: extrato hidroalcoólico; 7: resíduo final; 8: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 9: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 10: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 11: extrato metanólico bruto de *Pfaffia glomerata* (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

As aplicações das referências indicam presença de quatro manchas presentes em frutos de *Melia azedarach*, sendo elas XI, XII, XIII e XIV. Observa-se que as amostras-referência de *Melia azedarach* apresentaram manchas com fator de retenção similar (XIII e XIV) às saponinas presentes em *Pfaffia glomerata* (Figura 5.12, aplicação 11 ou Figura 5.10, aplicação 1), porém, não se pode afirmar que estes compostos são saponinas, apenas que são compostos que apresentaram comportamento semelhante às saponinas ao ser submetido às mesmas condições cromatográficas. Para essa confirmação outros testes devem ser

realizados como análises de tensão superficial e índice de espuma, parâmetros que auxiliam na confirmação da presença de saponinas em amostras.

Conforme dados de tensão superficial (Tabela 5.5) pode-se observar que os menores valores de tensão superficial foram dos extratos SCEE e EE (26,9 e 30,7 mN.m⁻¹, respectivamente), indicando os compostos XIII e XIV como as saponinas de interesse, para esta espécie.

O fracionamento sequencial em leito fixo proposto neste trabalho, para os compostos presentes na *Melia azedarach*, foi significativo e pode ser visto na Figura 5.12. Este resultado também foi obtido a partir das outras espécies estudadas indicando que o processo de extração proposto neste trabalho representa uma boa opção para fracionamento destes compostos, sendo eficiente a partir de diferentes fontes vegetais, sejam elas com similaridades em sua composição química como as raízes de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, quanto com espécies com perfis químicos bastante diferenciados como os frutos de *Melia azedarach*.

No extrato supercrítico (SCE) foi observada presença de compostos apolares e ausência de compostos com fator de retenção próximo às conhecidas saponinas de *Pfaffia glomerata* (Figura 5.12, aplicação 11). Os extratos SCEE, EE e HE (Figura 5.12, aplicações 4, 5 e 6) apresentaram manchas codificadas por XIII e XIV sendo que o extrato SCEE ainda continha compostos graxos (XI). Os extratos EE e HE apresentaram composição química similar, porém no extrato EE verificou-se predominância da mancha codificada XIII.

É importante salientar que ainda não há na literatura uma metodologia para quantificar saponinas destas espécies por HPLC. O desenvolvimento de uma ferramenta analítica é um trabalho laborioso e, por isso, além das análises por CCD estes extratos também foram avaliados através de medidas de tensão superficial, visto que saponinas são tensoativos naturais.

5.5 Tensão Superficial

Para a análise de extratos contendo saponinas previu-se a análise através de medidas de tensão superficial. Para melhor compreensão dos valores numéricos das medidas de tensão superficial obtidos, optou-se por usar como referência um tensoativo sintético, dodecil sulfato de sódio, de amplo uso comercial.

As análises de tensão superficial foram realizadas em amostras de extratos solúveis em água deionizada. Por isso, os extratos analisados, para todas as matrizes vegetais, foram SCEE, EE e HE. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Análises de tensão superficial de soluções aquosas de extratos de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach*.

Amostra	Concentração (g.L ⁻¹)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)		
		<i>Pfaffia glomerata</i>	<i>Hebanthe eriantha</i>	<i>Melia azedarach</i>
SCEE	20	25,0 ± 0,2	25,1 ± 0,5	42,1 ± 0,6
	40	-	-	26,9 ± 0,4
EE	20	29,5 ± 0,9	27,1 ± 0,7	43,5 ± 0,2
	40	-	-	30,7 ± 0,6
HE	20	41,8 ± 1,2	49,6 ± 0,6	43,1 ± 0,4
	40	41,6 ± 0,9	48,4 ± 0,6	37,7 ± 0,5
SDS	> CMC	36,3 ± 1,3*		
Água Deionizada	-	72,4 ± 0,4		

SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio (surfactante sintético);

*Média dos valores de tensão superficial para soluções aquosas de SDS, acima do seu CMC;

De acordo com a Tabela 5.4, nota-se que os extratos foram analisados em solução de 20 e 40 g.L⁻¹. Estes valores foram determinados com base na quantidade de amostra disponível e de forma que todos os extratos fossem analisados nas mesmas condições.

Sabe-se que os tensoativos, quando em solução, devido à presença do grupo lipofílico ocupam preferencialmente a superfície do líquido, diminuindo a força de coesão entre as moléculas do solvente e, conseqüentemente, diminuindo a tensão superficial (Behring et al., 2004). Além da capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, os surfactantes apresentam outra propriedade fundamental relacionada a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, se formam em baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo uma importante característica de um surfactante (Barros et al., 2007).

A curva padrão obtida para o dodecil sulfato de sódio está representada na Figura 5.13. Observa-se que para determinado valor de concentração não é possível aumentar a capacidade de reduzir a tensão superficial, ou seja, neste ponto a superfície se encontra saturada e as micelas ficam dispersas em toda a solução, não apresentando mais efeito sobre a tensão superficial (Behring et al., 2004). A menor tensão superficial verificada para soluções de dodecil sulfato de sódio foi em torno de 32 mN.m⁻¹. Os dados podem ser visualizados no Apêndice F.

Miles e Shedlovsky (1944) também observaram uma clara queda no valor da tensão superficial para a curva analítica de SDS. Acredita-se que esta irregularidade nos pontos da curva de tensão superficial vs. concentração seja devido às impurezas presentes na solução de SDS.

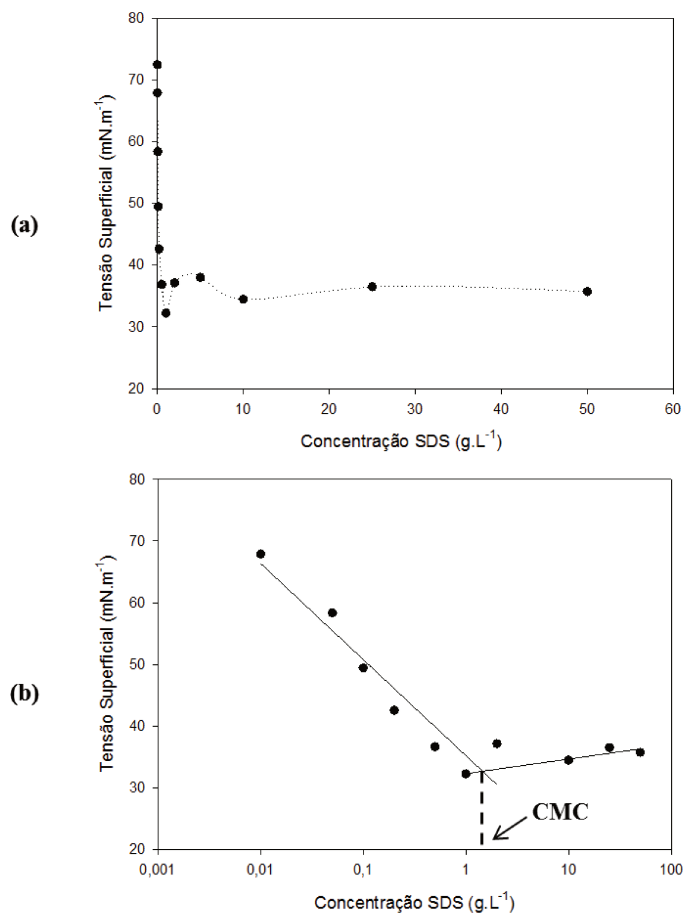


Figura 5.13 Gráfico de tensão superficial vs. concentração para soluções aquosas de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Extratos de *Pfaffia glomerata* (Figura 5.14) na concentração de 20 g.L^{-1} apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação à capacidade de redução da tensão superficial. O extrato supercrítico com etanol (SCEE) foi o extrato que apresentou menor tensão superficial ($25,0 \text{ mN.m}^{-1}$), seguido do extrato etanólico ($29,5 \text{ mN.m}^{-1}$) e extrato hidroalcoólico ($41,8 \text{ mN.m}^{-1}$).

Como discutido no item 5.4, sugere-se que os compostos com maior capacidade de redução da tensão superficial são as saponinas de menor polaridade. Este resultado é coerente com informações encontradas na literatura. De acordo com Decroos et al. (2006), a quantidade de cadeias de açúcares ligadas à aglicona afeta a CMC de saponinas, pois

saponinas monodesmosídicas (com uma cadeia de açúcares ligada à aglicona) isoladas de grãos de soja apresentaram melhor capacidade de redução da tensão superficial quando comparadas às saponinas bidesmosídicas (com duas cadeias de açúcares).

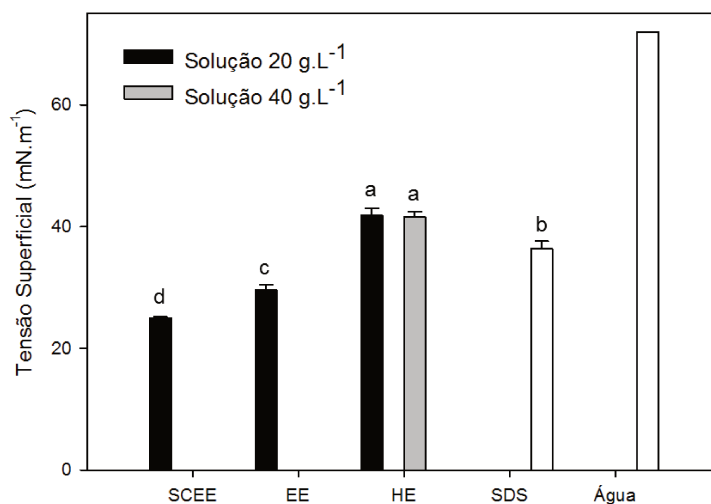


Figura 5.14 Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de raízes de *Pfaffia glomerata*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio 1,0 g.L⁻¹ (surfactante sintético).

Vale ressaltar que 70 a 75% dos surfactantes consumidos em países industrializados são de origem petroquímica, porém, há uma tendência para substituí-los por produtos naturais, biodegradáveis. Na Tabela 5.5 são apresentadas as principais classes de surfactantes. Dentre os surfactantes naturais listados somente as saponinas estão presentes nas espécies estudadas neste trabalho, indicando que o potencial de redução da tensão superficial encontrada nestes extratos é devido à presença de saponinas.

Os valores de tensão superficial das soluções 20 e 40 g.L⁻¹ do extrato hidroalcoólico (HE) apresentaram-se estatisticamente iguais, sugerindo que 20 g.L⁻¹ representa uma concentração igual ou superior a CMC destas saponinas. De acordo com Behring et al.

(2004), em valores acima da CMC, a superfície já se encontra saturada e as micelas ficam dispersas em toda a solução, não apresentando mais efeito sobre a tensão superficial.

Tabela 5.5 Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (Nitschke e Pastore, 2002).

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Dentre os extratos de *Hebanthe eriantha* (Figura 5.15) verificou-se comportamento similar ao de extratos de *Pfaffia glomerata*, ou seja, quanto maior a polaridade do solvente utilizado para a extração menor a capacidade de redução da tensão superficial do extrato obtido. Porém, não foi verificada diferença significativa ($p < 0.05$) entre os extratos SCEE e EE. Logo, para esta espécie, a tensão superficial de HE > EE = SCEE.

Nota-se, ainda, que os extratos SCEE e EE de ambas as espécies reduzem a tensão superficial à valores menores que o mínimo atingido pelo dodecil sulfato de sódio, surfactante sintético utilizado como padrão, portanto, apresentam um maior poder surfactante que este surfactante sintético.

Além disso, as médias dos valores de tensão superficial nas duas concentrações testadas não apresentaram diferença significativa ao nível de 5 % de significância, ou seja, a tensão superficial não foi reduzida com o aumento da concentração de extrato hidroalcoólico, sugerindo que as saponinas de *Hebanthe eriantha* também possuem $\text{CMC} \leq 20 \text{ g.L}^{-1}$. Apesar do alto valor de tensão superficial dos extratos hidroalcoólicos (HE), foi observada formação de espuma intensa nestes extratos. Com isso, verificou-se que neste caso não há, necessariamente, relação entre capacidade de formação de espuma e a capacidade de redução da tensão superficial.

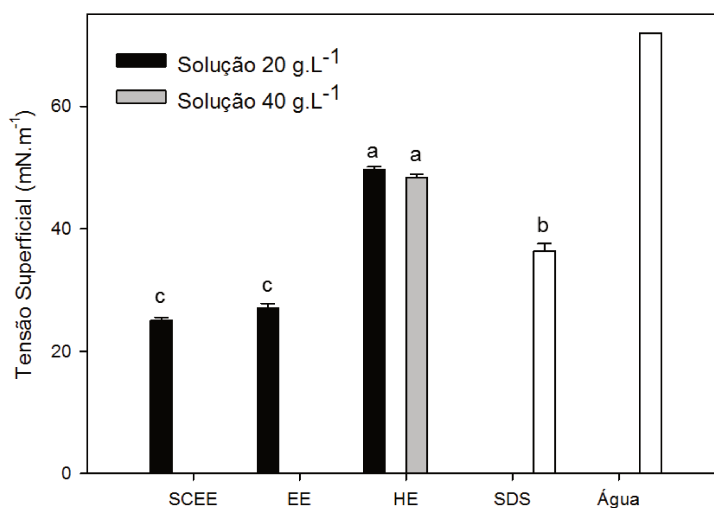


Figura 5.15 Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de raízes de *Hebanthe eriantha*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (surfactante sintético).

A influência da concentração na tensão superficial não pôde ser analisada para os demais extratos (SCEE e EE) de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* devido às quantidades de amostras disponíveis (baixo rendimento de extração). Porém, acredita-se que o mesmo comportamento seria obtido, ou seja, que a concentração micelar crítica já tenha sido atingida a 20 g.L^{-1} , não sendo possível obter valores menores de tensão superficial.

As análises de tensão superficial dos extratos de *Melia azedarach* foram realizadas em duas concentrações (20 e 40 g.L⁻¹) para todos os extratos estudados e os resultados estão representados na Figura 5.16. Observa-se a influência da concentração de todos os extratos na tensão superficial da solução, sugerindo que a superfície das soluções a 20 g.L⁻¹ ainda não se encontravam saturadas em micelas das saponinas (surfactantes naturais). Esta influência foi mais significativa no extrato SCE de *Melia azedarach*, pois verificou-se variação da tensão superficial de 42 mN.m⁻¹ para 27 mN.m⁻¹ ao aumentar-se a concentração do extrato de 20 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹.

Esta diferença nos valores de tensão superficial não permite prever o valor de CMC das saponinas presentes em frutos de *Melia azedarach*. Para tal, será necessário testar amostras de concentrações mais elevadas ou construir uma curva (tensão superficial vs. concentração) para obtenção da CMC das saponinas presentes nesta espécie.

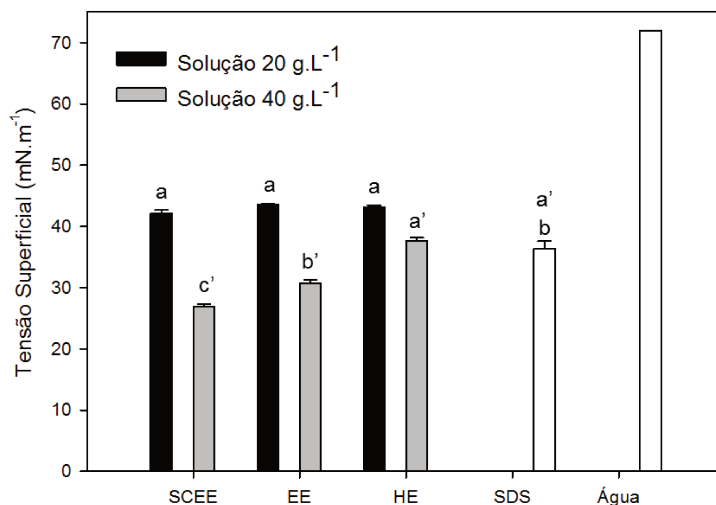


Figura 5.16 Análise estatística dos valores de tensão superficial de extratos de frutos de *Melia azedarach*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$). SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio (surfactante sintético).

Conforme apresentado na Figura 5.16, nas concentrações testadas o extrato supercrítico com etanol (SCEE) de *Melia azedarach* mostrou melhor capacidade de redução

da tensão superficial, sugerindo este extrato contém as saponinas com maior potencial para reduzir tensão superficial. Além disso, observou-se que somente na concentração de 40 g.L^{-1} os extratos (SCEE e EE) desta espécie apresentaram melhor capacidade de redução da tensão superficial, quando comparados ao dodecil sulfato de sódio.

Na concentração de 20 g.L^{-1} não foi verificada diferença nos valores de tensão superficial entre os extratos etanólicos e hidroalcoólicos (EE e HE), sendo estes capazes de reduzir a tensão superficial da água de aproximadamente 72 mN.m^{-1} para 43 mN.m^{-1} .

Um diagrama de blocos (Figura 5.17) foi construído para comparação entre os resultados de tensão superficial obtidos para as diferentes matrizes vegetais. Nota-se que extratos etanólicos (EE) de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* apresentaram capacidade de redução superficial semelhantes entre si (29 e 27 mN.m^{-1} , respectivamente) e menores que o extrato EE de *Melia azedarach* (43 mN.m^{-1}). Por outro lado, o extrato hidroalcoólico (HE) de *Hebanthe eriantha* apresentou o maior valor de tensão superficial comparando-o aos extratos HE provenientes de *Pfaffia glomerata* e *Melia azedarach*.

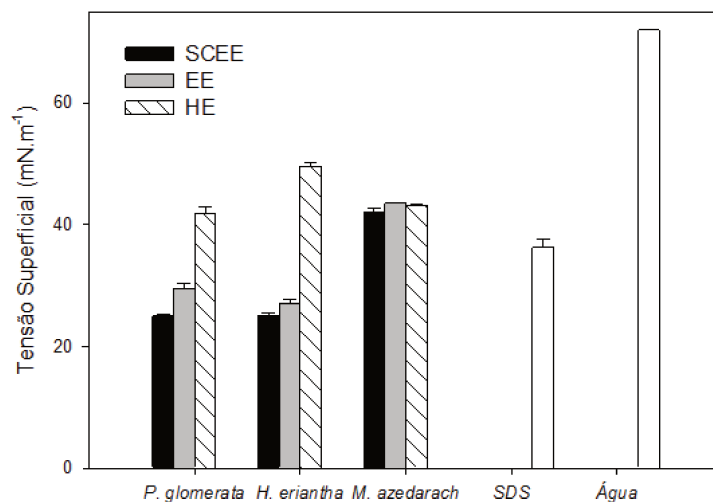


Figura 5.17 Comparação entre tensões superficiais de extratos de *Pfaffia glomerata*, *Hebanthe eriantha* e *Melia azedarach* a 20 g.L^{-1} . SCEE: Extrato supercrítico com etanol, EE: Extrato etanólico, HE: Extrato hidroalcoólico, SDS: dodecil sulfato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (surfactante sintético).

Em relação aos extratos SCEE, verifica-se uma capacidade inferior do extrato de *Melia azedarach* para redução da tensão superficial ($\approx 42 \text{ mN.m}^{-1}$), porém vale ressaltar que os extratos obtidos pela mistura supercrítico e etanol (SCEE) de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* forneceram valores de tensão superficial ($\approx 25 \text{ mN.m}^{-1}$) comparáveis a surfactina, um biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, conhecido por ter ótima atividade superficial, capaz de reduzir a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN.m^{-1} (Horowitz *et al.*, 1990).

Saponinas comerciais isoladas de Quillaia de diversas marcas utilizadas foram analisadas por Mitra e Dungan (1997) e verificou-se, por análises de tensão superficial, que a CMC, a 298 K (25 °C), dessas saponinas variaram de 0,51 a 0,72 g.L^{-1} , porém a menor tensão superficial relatada foi maior que 35 mN.m^{-1} , resultado superior aos obtidos neste trabalho. Stanimirova *et al.* (2011) também analisou extratos de *Quillaja saponaria*, originárias do Chile e obtidos por diferentes métodos de purificação e foi verificado que a CMC destes extratos a 25 °C apresentou-se na concentração de 0,25 g.L^{-1} e os menores valores de tensão superficial foram em torno de 40 mN.m^{-1} .

Saponinas de soja, estudadas por Decroos *et al.* (2006), apresentam valores de CMC $< 1 \text{ g.L}^{-1}$, porém todas as tensões superficiais relatadas são maiores que 40 mN.m^{-1} . Estudos com extratos vegetais ricos em saponinas foram realizados por Ribeiro *et al.* (2013), no qual se verificou que extratos de Juá e Sisal apresentaram redução da tensão superficial à valores entre 35 e 40 mN.m^{-1} . Extratos de ginseng asiático, contendo ginsenosídeos, apresentam CMC de 0.339 g.L^{-1} e os menores valores de tensão superficial relatados foram próximos a 40 mN.m^{-1} (Xiong *et al.*, 2008).

Os bons resultados de tensão superficial para os extratos SCEE das três matrizes vegetais obtidos neste trabalho indicaram a seletividade do dióxido de carbono supercrítico para extrair saponinas com maior capacidade para reduzir tensão superficial de soluções aquosas quando este é aplicado utilizando etanol como cossolvente.

5.6 Fenóis e Flavonoides Totais

O teor de fenóis e flavonoides nos extratos de *Melia azedarach* é apresentado na Tabela 5.6 e as curvas analítica de ácido gálico e catequina para estas análises, respectivamente, estão representadas no Apêndice F.

Tabela 5.6 Concentração e rendimento de fenóis e flavonoides totais para extratos de *Melia azedarach*.

Extrato	Fenóis Totais		Flavonoides Totais	
	C	R	C*	R*
SCE	-	-	-	-
SCEE	20,59 ± 1,17	1,32 ± 0,30	35,35 ± 1,39	2,27 ± 0,48
EE	5,69 ± 0,32	1,08 ± 0,17	1,99 ± 0,38	0,38 ± 0,11
HE	21,60 ± 1,57	2,67 ± 0,28	5,74 ± 1,17	0,71 ± 0,17

C = concentração de fenóis expressa em mg EAG/g extrato;

R = rendimento de fenóis expressa em mg EAG/g matéria prima;

C* = concentração de flavonoides expressa em mg EC/g extrato;

R* = rendimento de flavonoides expressa em mg EC/g matéria prima.

Análises com o extrato supercrítico (SCE) não puderam ser realizadas devido à baixa solubilidade dos extratos em água. As soluções apresentavam-se turvas com o decorrer da metodologia experimental fornecendo, por isso, valores altos de absorbância, diferentemente dos valores obtidos pela curva padrão no qual observava-se coloração característica, resultado da reação entre os compostos de interesse e os reagentes utilizados.

Orhan et al. (2012a) verificaram a concentração de flavonoides totais em extratos convencionais de frutos de *Melia azedarach*, expressos em equivalente de quercetina, os quais variaram de 20 a 75 mg EQ/g de extrato. O maior teor de flavonoides totais foi obtido utilizando acetato de etila como solvente. Estes resultados são superiores aos encontrados nos extratos SCEE, EE e HE, obtidos neste trabalho.

A Figura 5.18 apresenta os resultados na forma de diagramas acompanhados dos resultados da análise estatística de comparação das médias entre os diferentes extratos obtidos (teste Tukey a 5 % de significância). Nota-se que o comportamento dos extratos não se mostrou similar para as duas análises realizadas (fenóis e flavonoides totais).

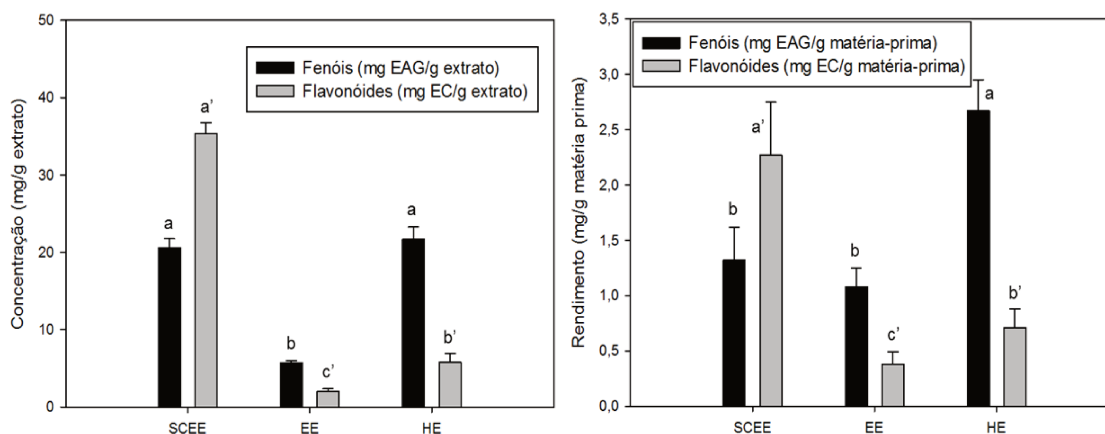


Figura 5.18 Comparação das concentrações e rendimentos de fenóis e flavonoides totais em extratos de *Melia azedarach*. Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Para a análise do teor de fenóis totais, os resultados indicam que a fração que apresentou maior teor de fenóis totais expressos em mg EAG/g extrato foi o extrato hidroalcoólico (HE), sendo este considerado com o teor de fenóis totais estatisticamente igual ao extrato obtido com scCO_2 + etanol (SCEE). A menor concentração de fenóis totais, portanto, foi obtida no extrato etanólico (EE).

A obtenção de compostos fenólicos em todos os tipos de extratos sugere a presença de diferentes tipos de compostos nesta planta, sendo constituída tanto de compostos fenólicos mais polares, extraídos no extrato hidroalcoólico, quanto menos polares, extraídos no extrato supercrítico + etanol.

Para a análise de teor de flavonoides totais, verifica-se que todos os extratos apresentaram médias diferentes ($p < 0,05$), sendo $\text{SCEE} > \text{HE} > \text{EE}$. Observa-se que o teor de flavonoides totais é maior que o teor de fenóis totais em amostras de SCEE. Este resultado

não era esperado, pois uma vez que os flavonoides são compostos pertencentes ao grupo dos fenóis totais, seu valor deveria ser igual ou inferior ao teor de fenóis totais. Porém, este comportamento também foi observado nos extratos supercríticos de *Arrabidaea chica* (Paula et al., 2013) e *Eugenia uniflora* (Martinez-Correa et al., 2011).

O rendimento de extração de compostos fenólicos em extratos hidroalcoólicos, expresso em mg de EAG/g de matéria-prima, foi o maior entre os três extratos testados. Não foi verificada diferença ($p < 0,05$) entre o rendimento de extração de fenóis em SCEE e EE.

Os resultados das análises de flavonoides totais foram similares e independentes da forma com que os dados foram apresentados, ou seja, tanto em concentração quanto em rendimento, observou-se que todos os extratos apresentaram médias diferentes ($p < 0,05$), sendo $SCEE > HE > EE$.

De forma geral, a solução etanol/água (70:30 v/v) destacou-se em extrair compostos fenólicos de frutos de *Melia azedarach* (maior rendimento) e obtendo extratos com elevada concentração de fenóis totais expressos em equivalente de ácido gálico. É importante ressaltar que, apesar da concentração destes compostos no extrato hidroalcoólico (HE) ser baixa comparado a extratos de outras fontes vegetais, estes extratos podem ser obtidos como coproduto no processo de extração de saponinas que apresentam ação surfactante, que se encontram mais concentradas no extrato supercrítico com etanol (SCEE), como visto na seção 5.5.

5.7 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Inicialmente a amostra retida na armadilha Porapak-Q (extrato SCE-V) provenientes de frutos de *Melia azedarach* foi analisada em condições cromatográficas específicas para compostos voláteis (método 1 - descrito em 4.5.5), porém, o método não detectou presença destes compostos em SCE-V. O cromatograma do extrato SCE-V nestas condições pode ser visualizado no Apêndice G (Figura G.1)

As amostras SCE-V e SCE de frutos de *Melia azedarach* foram, então, analisadas de acordo com o método 2 (descrito em 4.5.5). O cromatograma obtido para a amostra SCE-V

é apresentado na Figura 5.19 e a Tabela 5.7 lista os compostos identificados neste extrato (SCE-V).

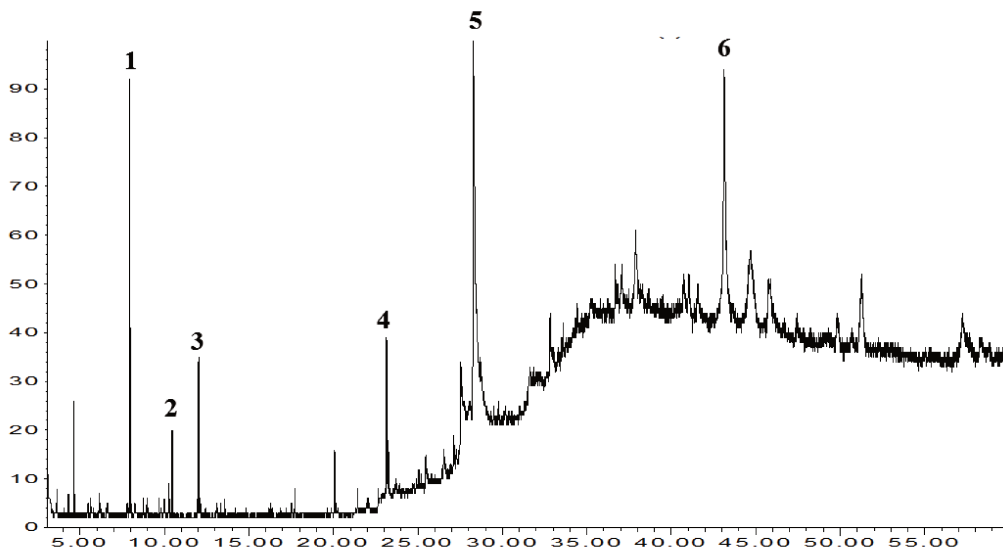


Figura 5.19 Cromatograma (CG-EM) do extrato retido no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de *Melia azedarach*.

Foram identificadas os ésteres etílicos dos ácidos decanóico, dodecanóico e linoleico, além do hidroxitolueno butilado e γ -sitosterol.

Os dois compostos derivados do ácido linoleico (4 e 5 – Tabela 5.7) correspondem a aproximadamente 47 %, em área relativa, do extrato SCE-V de frutos de *Melia azedarach*. Este resultado é coerente com dados encontrados na literatura, pois, em estudos anteriores, Orhan et al. (2012b) determinaram que o óleo proveniente de frutos de *Melia azedarach* é constituído majoritariamente por ácido linoleico, representando 62,8 % da composição deste óleo.

Tabela 5.7 Compostos identificados no extrato retido na armadilha Porapak-Q (SCE-V) de frutos de *Melia azedarach* por CG-EM.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Composto Identificado	Massa Molecular	Probabilidade (NIST) (%)	Área Relativa (%)
1	7,94	Éster etílico do ácido decanóico	200	97	12,43
2	10,45	Hidroxitolueno butilado	220	94	2,78
3	12,02	Éster etílico do ácido dodecanóico	228	93	4,94
4	23,15	Éster etílico do ácido linoleico	308	99	5,19
5	28,29	Éster derivado do ácido linoleico	336	-	41,83
6	43,18	γ -sitosterol	414	99	29,79

O resultado da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) para o extrato supercrítico (SCE) de frutos de *Melia azedarach* é apresentado na Figura 5.20. A lista dos compostos identificados, de acordo com a biblioteca NIST, é apresentada na Tabela 5.8.

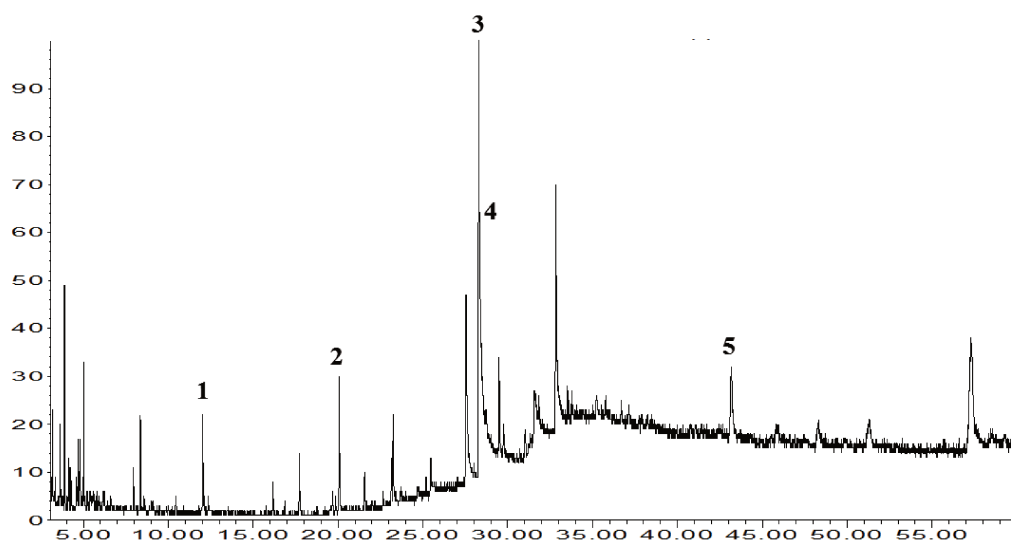


Figura 5.20 Cromatograma (CG-EM) dos constituintes químicos do extrato supercrítico (SCE) de frutos de *Melia azedarach*.

Tabela 5.8 Compostos identificados no extrato supercrítico (SCE) de frutos de *Melia azedarach* por CG-EM.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Composto Identificado	Massa Molecular	Probabilidade (NIST) (%)	Área Relativa (%)
1	12,02	Éster etílico do ácido dodecanóico	228	96	2,38
2	20,08	Éster etílico do ácido hexadecanóico	284	98	3,83
3	28,29	Éster derivado do ácido linoleico	336	-	14,69
4	28,34	9,12 – ácido octadecadienóico (ácido linoleico)	280	89	15,65
5	43,18	γ -sitosterol	414	99	6,06

Os compostos identificados em extratos SCE foram o gama-sistosterol e os ésteres etílicos dos ácidos dodecanóico, octadecadienóico e hexadecanóico.

O éster etílico do ácido hexadecanóico também foi identificado por Yang et al. (2011) em extratos de cascas de *Melia azedarach* obtidos por ultrassom, porém este composto não foi encontrado em extratos obtidos por Soxhlet e por headspace e microextração em fase sólida (HS-SPME) da mesma parte desta planta devido a seletividade dos destes métodos serem diferentes. Ainda nesse trabalho observou-se que os ácidos, em geral, representam a classe química mais abundante em extratos obtidos por Soxhlet.

Comparando os perfis cromatográficos dos extratos SCE e SCE-V verifica-se grandes similaridades entre estas amostras, indicando provável perda de massa do extrato supercrítico, sendo esta recolhida na armadilha Porapak-Q.

O composto com tempo de retenção de 28,29 minutos é o composto majoritário em ambos os extratos analisados (SCE e SCE-V). Este composto não foi identificado (com alta probabilidade) pela biblioteca NIST, porém acredita-se que seja um éster derivado do ácido linoleico pelo padrão de fragmentação observado no espectro de massas desse composto (Faria et al., 2007).

5.8 Espectrometria de Massas por ESI

Os extratos de *Melia azedarach* foram submetidos às análises por espectrometria de massas no espectrômetro Citius - HRT operando no modo positivo e negativo. A partir de dados encontrados na literatura alguns picos foram associados a compostos anteriormente descritos na literatura, porém, como não há estudos sobre as saponinas desta espécie a identificação destas se torna um procedimento um pouco mais trabalhoso.

A Figura 5.21 apresenta os espectros de massas do extrato supercrítico (SCE) no modo negativo e positivo. No modo negativo (Figura 5.21a) verifica-se que os três maiores sinais, em ordem decrescente, foram os íons moleculares $[M-H]^-$ m/z 279, m/z 227 e m/z 255. Estes sinais correspondem ao ácido linoleico (**3**), ácido palmítico (**1**) e ácido mirístico (**2**),

respectivamente, pois há relatos da presença destes ácidos graxos em frutos de *Melia azedarach* (Orhan et al., 2012b).

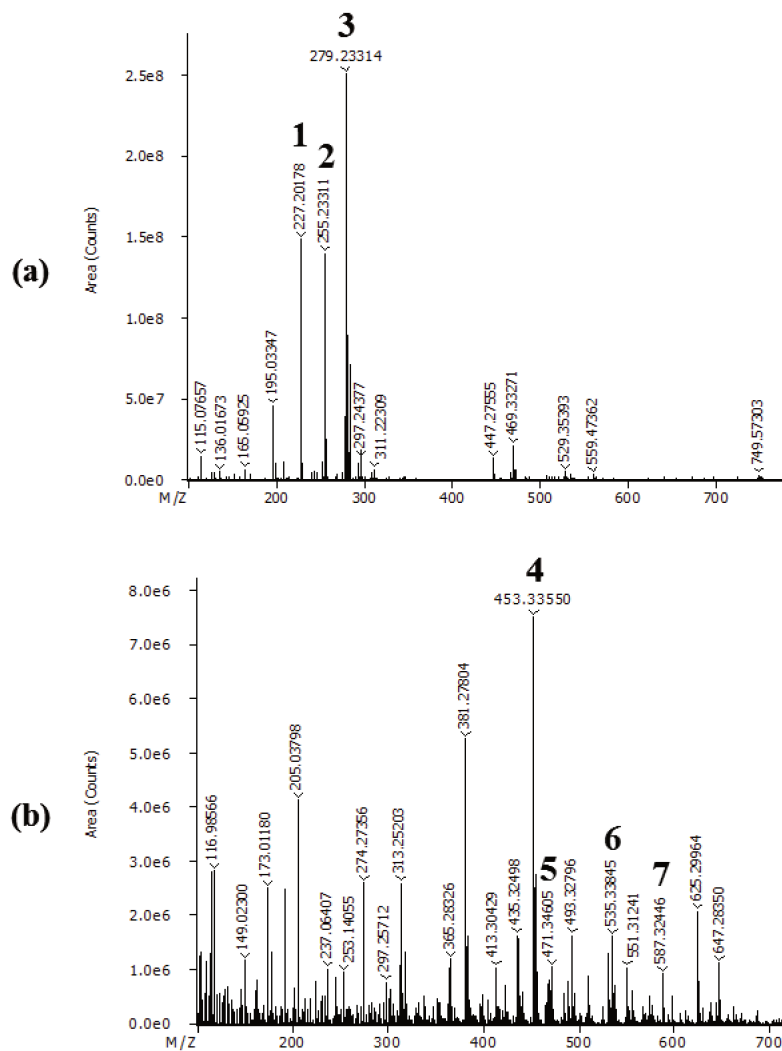


Figura 5.21 Espectros de massas ESI-MS do extrato supercrítico (SCE) de *Melia azedarach*: (a) ESI(-)-MS e (b) ESI(+)-MS.

Na tentativa de identificação dos íons presentes na análise por ESI(+)-MS do extrato SCE (Figura 5.21b) os íons obtidos foram comparados com dados de constituintes de *Melia azedarach* anteriormente descritos na literatura.

Desta forma, sugere-se que o íon molecular com massa/carga (m/z) em 453 (**4**) represente um aduto de potássio $[M+K]^+$. Neste caso, a massa molecular do composto seria

414, similar ao composto identificado por análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, na qual este foi identificado como sendo o γ -sitosterol (esteroide).

O íon m/z 471 (Figura 5.21b, **5**) foi identificado por Wu et al. (2009) como um esteroide ((20*S*)-5-ergostene-3 β ,7 α ,16 β ,20-tretol) em folhas de *Melia azedarach* na forma de um aduto de sódio representado por $[M+Na]^+$ 471 m/z .

Por outro lado, o íon **6**, em m/z 535, foi identificado, em cascas desta espécie, por Wu et al. (2011) como um triterpenoide (3 β -acetoxi-12 β -hidroxy-eupha-7,24-dien-21,16 β -olide).

Por fim, sugere-se que o íon molecular em m/z 584 $[M+H]^+$ (Figura 5.21b) represente a azedaraquina C (**7**), um limonoide presente em partes de *Melia azedarach* e que apresenta atividade inseticida. Ele foi identificado pela primeira vez por Huang et al. (1995) em cascas da raiz desta espécie.

A Figura 5.22 representa o espectro de massas no modo negativo (ESI(-)-MS) do extrato supercrítico com etanol (SCEE). Observa-se presença de compostos fenólicos neste extrato, sendo estes o ácido cafeico (m/z 179 $[M-H]^-$, composto **9**) e o ácido málico (m/z 133 $[M-H]^-$, composto **8**), anteriormente descritos em frutos desta espécie (Aoudia et al., 2012).

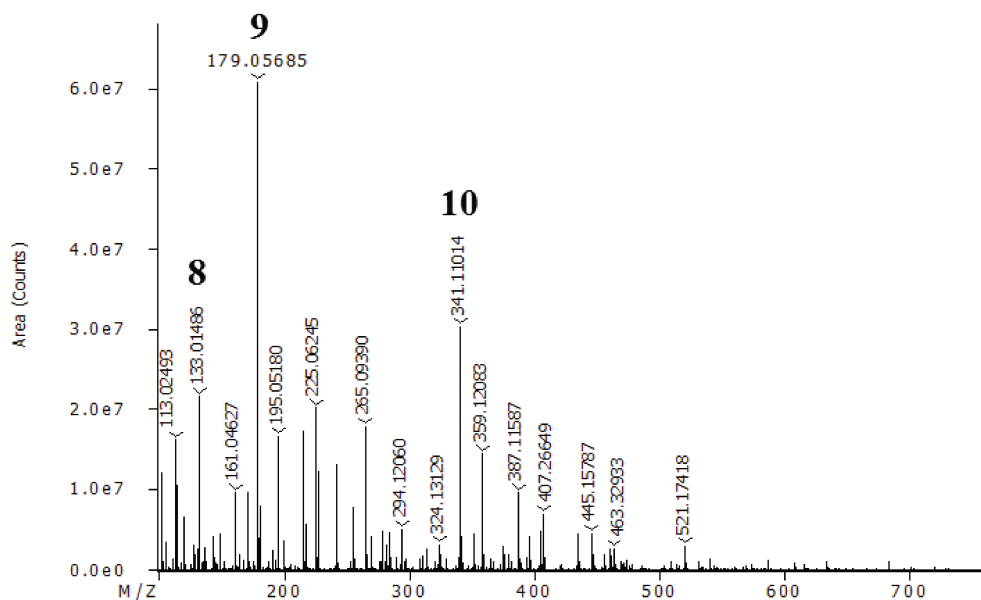


Figura 5.22 Espectro de massas ESI(-)-MS do extrato supercrítico com etanol (SCEE) de *Melia azedarach*.

O espectro ESI(-)-MS do extrato etanólico (EE) é apresentado na Figura 5.23. Neste também foram identificados o ácido cafeico (m/z 179 $[M-H]^-$, composto **9**) e o ácido málico (m/z 133 $[M-H]^-$, composto **8**), presentes no extrato SCEE (Figura 5.22). Observa-se também que, enquanto no extrato SCEE os ácidos fenólicos (m/z 133 e m/z 179) encontrem-se em maior intensidade em relação ao íon de m/z 341 (**10**), observa-se o inverso no extrato EE. Este resultado pode confirmar a maior concentração de fenóis totais no extrato SCEE em relação ao extrato EE, conforme verificado na seção 5.6.

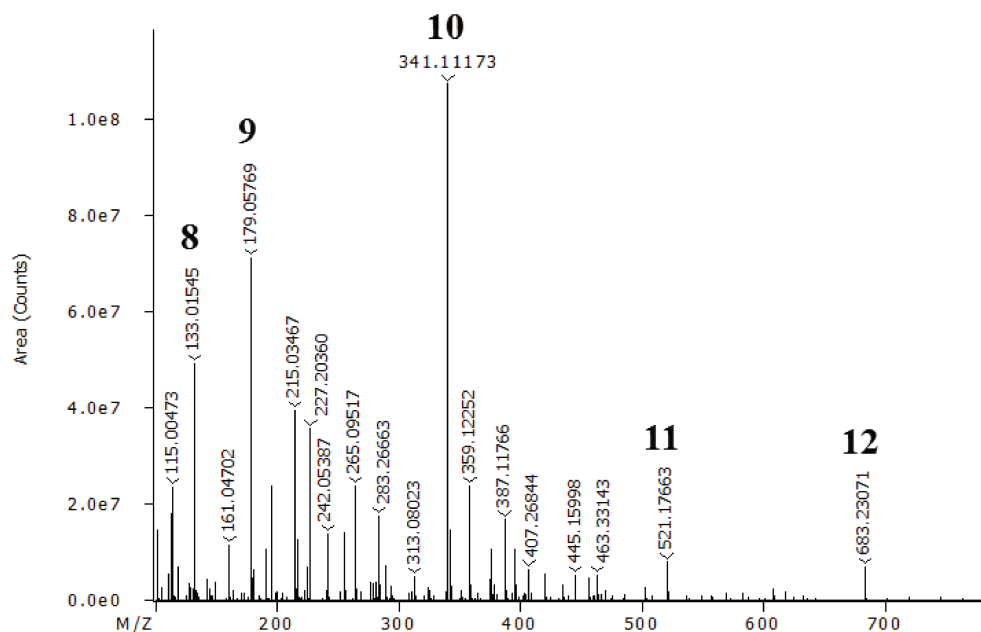


Figura 5.23 Espectro de massas ESI(-)-MS do extrato etanólico (EE) de *Melia azedarach*.

Visto que o foco deste trabalho são as saponinas, compostos de massa molecular elevada, análises por fragmentação MS/MS foram realizadas com os íons m/z 521 e m/z 683 (Figura 5.23, sinais 11 e 12, respectivamente). Os resultados encontram-se nas Figuras 5.24 e 5.25. Na Figura 5.24 observou-se que a fragmentação do íon m/z 521 resultou nos íons fragmentados m/z 179 e m/z 341. O íon m/z 341 é consistente com a sacarose (dissacarídeo), já o íon m/z 521 pode ser uma sacarose ligado a outro açúcar.

A fragmentação do íon m/z 683 (Figura 5.25) indicou que este íon é um cluster do íon m/z 341 (**10**). Estes resultados não permitiram sugerir uma estrutura para as saponinas, visto que não pôde ser visualizada uma aglicona, com núcleo triterpênico ou esteroide, nas análises de fragmentação ESI(-)-MS/MS. A presença destes açúcares pode ter suprimido a identificação das saponinas.

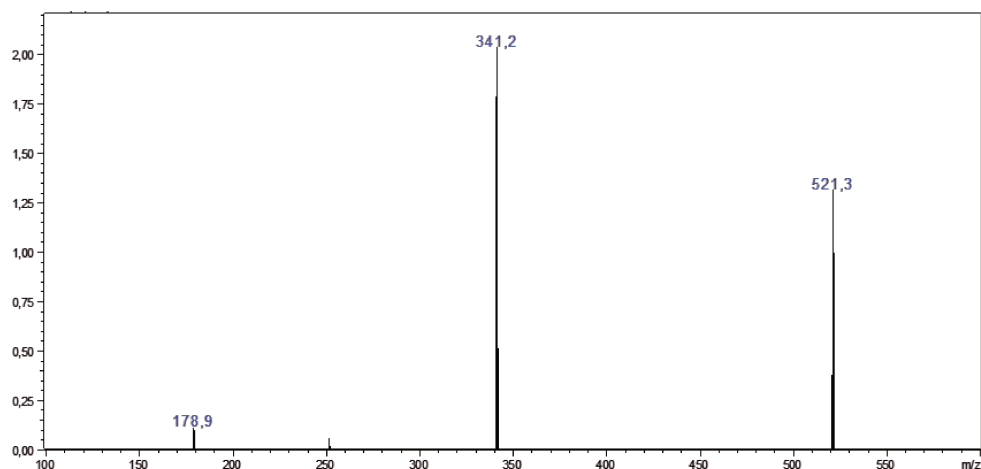


Figura 5.24 Espectro ESI(-)-MS/MS do íon m/z 521 do extrato etanólico (EE) de *Melia azedarach*.

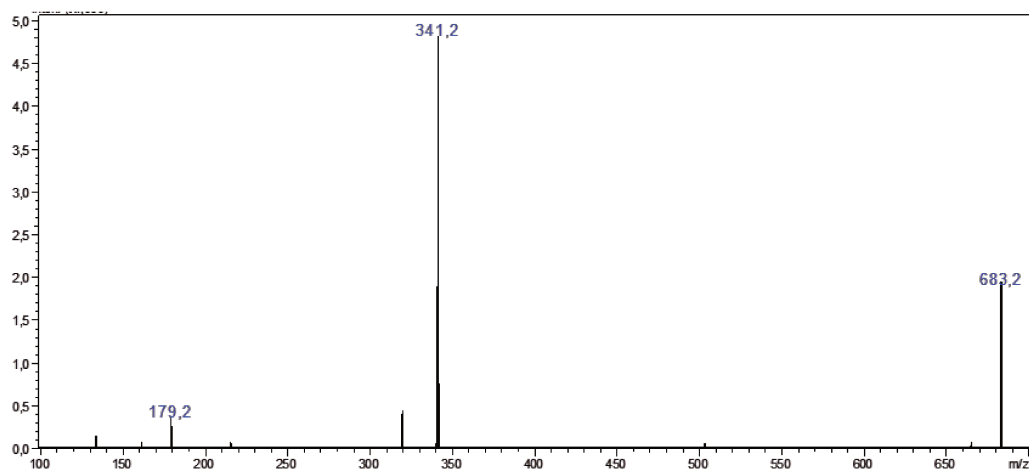


Figura 5.25 Espectro ESI(-)-MS/MS do íon m/z 683 do extrato etanólico (EE) de *Melia azedarach*.

Por fim, no extrato hidroalcoólico (HE) só foi possível a identificação do ácido málico (m/z 133 $[M-H]^-$), porém este se apresenta como um composto minoritário neste extrato. Os espectros de massas para o extrato hidroalcoólico, assim como os espectros de todos os extratos de *Melia azedarach*, podem ser visualizados no Apêndice H.

6. Conclusões

Extratos hidroalcoólicos (HE) de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* apresentaram maior rendimento de extração comparado aos extratos obtidos com outros solventes (SCE, SCEE, EE). Quanto maior a polaridade do solvente utilizado na extração maior o rendimento de extração obtido, ou seja, $HE > EE > SCEE > SCE$, indicando presença majoritária de compostos de alta polaridade em raízes de ginseng brasileiro.

O rendimento global de extração para *Hebanthe eriantha* foi maior que o obtido por métodos convencionais de extração que utilizam metanol como solvente.

Na extração com frutos de *Melia azedarach*, não foi verificada uma tendência quanto à polaridade do solvente utilizado e o rendimento da extração. O extrato etanólico (EE) apresentou o maior rendimento de extração para esta espécie. Os demais extratos apresentaram-se na seguinte ordem: $HE > SCE > SCEE$.

As análises por CCD mostraram que o processo de extração foi seletivo de acordo com a polaridade do solvente para todas as matrizes vegetais estudadas. O extrato supercrítico não apresentou saponinas e os demais extratos forneceram frações enriquecidas em diferentes grupos de compostos (saponinas).

Os extratos obtidos pela mistura de dióxido de carbono e etanol (70:30 m/m) (SCEE) apresentaram maior capacidade de redução da tensão superficial para as três matrizes vegetais estudadas, sugerindo que esta capacidade está associada à presença de saponinas de menor polaridade no extrato.

A capacidade de redução da tensão superficial dos extratos SCEE de *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha* foi similar à da surfactina, um excelente biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água para 27 mN.m^{-1} . E ainda, verificou-se que as saponinas de ginseng brasileiro apresentam $\text{CMC} \leq 20 \text{ mg.mL}^{-1}$, diferentemente das saponinas presentes em *Melia azedarach*.

Os extratos hidroalcoólico (HE) e supercrítico com etanol (SCEE) de *Melia azedarach* se destacaram em relação à concentração e rendimento de extração em compostos fenólicos. Porém, é importante ressaltar que, apesar da concentração destes compostos no extrato hidroalcoólico (HE) serem baixas comparadas a extratos de outras fontes vegetais, este extrato pode ser obtido como coproduto no processo de extração de saponinas que apresentam ação surfactante (mais concentradas no extrato SCEE).

Não foi detectada presença significativa de compostos voláteis em frutos de *Melia azedarach* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo verificada presença de ácidos graxos no extrato SCE-V, assim como no extrato SCE.

Em relação à análise por espectrometria de massas (ESI-MS) de extratos de *Melia azedarach*, foram identificados ácidos graxos (ácido linoleico, ácido palmítico e ácido mirístico), dois esteroides, um triterpeno e azedaraquina C (limonoide) em extratos SCE; e compostos fenólicos (ácido cafeico e ácido málico) nos demais extratos.

Resumidamente, o processo de extração sequencial em leito fixo utilizando solventes “verdes” mostrou ser uma boa alternativa ao uso de solventes orgânicos para extrair e fracionar as saponinas presentes em diferentes fontes vegetais, incluindo espécies ricas em saponinas como *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, e matrizes vegetais com composição bastante diversificada como frutos de *Melia azedarach*.

Além disso, os bons resultados obtidos de tensão superficial para extratos SCEE das três matrizes vegetais indicam a seletividade do dióxido de carbono supercrítico para extrair saponinas com maior capacidade para reduzir tensão superficial de soluções aquosas quando este é utilizado com etanol como cossolvente.

Futuramente, deseja-se extrair e fracionar saponinas presentes nestas matrizes vegetais utilizando o scCO₂ como antissolvente para precipitar os compostos de interesse. No entanto, vale ressaltar que o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação das saponinas presentes nestes extratos seria um importante complemento para este trabalho.

REFERÊNCIAS

AKIHISA, T.; PAN, X.; NAKAMURA, Y.; KIKUCHI, T.; TAKAHASHI, N.; MATSUMOTO, M.; OGIHARA, E.; FUKATSU, M.; KOIKE, K.; TOKUDA, H. Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry**, v. 89, p. 59-70, 2013.

AL-RUBAE, A. Y. The potential uses of *Melia azedarach* L. as pesticidal and medicinal plant, review. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, p. 185-194, 2009.

ALCÂNTARA, M. F. A. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen XIII. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza-CE**, p. 072, 1994.

ANDREI, G. M.; LAMPURI, J. S.; COTO, C. E.; DE TORRES, R. A. An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents *Tacaribe* virus *encephalitis* in mice. **Experientia**, v. 42, p. 843-845, 1986.

AOAC. **Official Methods Of Analysis**. Washington, DC: Association Of Official Analytical Chemists. 16th 1997.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 6 ed. (Ca 23-55). AOCS Press Champaign, IL, US, 1998.

AOUDIA, H.; NTALLI, N.; AISSANI, N.; YAHIAOUI-ZAIDI, R.; CABONI, P. Nematotoxic phenolic compounds from *Melia azedarach* against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11675-11680, 2012.

AOUDIA, H.; OOMAH, B. D.; ZAIDI, F.; ZAIDI-YAHIAOUI, R.; DROVER, J. C. G.; HARRISON, J. E. Phenolics, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Melia azedarach* extracts. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 6, p. 19-29, 2013.

ASAE. **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving**. American Society of Agricultural and Biological Engineers 1997.

AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, p. 435-457, 2011.

BALLAS, S. K. Hydration of sickle erythrocytes using a herbal extract (*Pfaffia paniculata*) in vitro. **British Journal of Haematology**, v. 111, p. 359-362, 2000.

BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409, 2007.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, p. 492-495, 2004.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 1976.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. 1994. 387p.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

CAMPOMANES, A. M. F. **Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica e convencional dos resíduos de uva provenientes do processamento do pisco**. 2012. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G. G.; ALONSO, R. A.; PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. **Fitoterapia**, v. 70, p. 296-298, 1999.

CARPINELLA, M. C.; MIRANDA, M.; ALMIRÓN, W. R.; FERRAYOLI, C. G.; ALMEIDA, F. L.; PALACIOS, S. M. In vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, p. 250-256, 2007.

CEYHUN SEZGIN, A. E.; ARTIK, N. Determination of saponin content in Turkish Tahini Halvah by using HPLC. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 102-115, 2010.

CHEN, Y.; XIE, M.-Y.; GONG, X.-F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 162-170, 2007.

CHIFFELLE, I. G.; HUERTA, A. F.; LIZANA, D. R. Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. **Chilean Journal of Agricultural Research** v. 69, p. 38-45, 2009.

CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3066-3070, 2008.

DA SILVA, T. C.; COGLIATI, B.; DA SILVA, A. P.; FUKUMASU, H.; AKISUE, G.; NAGAMINE, M. K.; MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 145-155, 2010.

DA SILVA, T. C.; DA SILVA, A. P.; AKISUE, G.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; FUKUMASU, H.; MATSUZAKI, P.; RASPANTINI, P. C.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. **Cancer Letters**, v. 226, p. 107-113, 2005.

DAWID, C.; HOFMANN, T. Quantitation and bitter taste contribution of saponins in fresh and cooked white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Food Chemistry**, v. 145, p. 427-436, 2014.

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S. M. K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (*Amaranthaceae*) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 261-269, 2000.

DE SOUZA DANIEL, J. F.; ALVES, K. Z.; DA SILVA JACQUES, D.; DA SILVA E SOUZA, P. V.; DE CARVALHO, M. G.; FREIRE, R. B.; FERREIRA, D. T.; FREIRE, M.

F. I. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (*Amaranthaceae*). **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, p. 174-178, 2005.

DECROOS, K.; VINCKEN, J. P.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VERSTRAETE, W. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. **Food Chemistry**, v. 101, p. 324-333, 2006.

DUNFORD, N.; KING, J.; LIST, G.; TZIA, C.; LIADAKIS, G. Supercritical fluid extraction in food engineering. **Extraction optimization in food engineering**, p. 57-93, 2003.

ESQUIVEL, M. M.; RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G. Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 129-138, 1999.

FARIA, R. C.; REZENDE, M. J.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 30, p. 1900-1905, 2007.

FERREIRO, D.; OROZCO, J. P.; MIRON, C.; REAL, T.; HERNANDEZ-MORENO, D.; SOLER, F.; PEREZ-LOPEZ, M. Chinaberry Tree (*Melia azedarach*) Poisoning in Dog: A Case Report. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, p. 64-67, 2010.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587-605, 2002.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; SANTOS, C. A. D. M.; JÚNIOR, C. C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G.; MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, *Amaranthaceae*, in rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 1167-1179, 2004.

GE, F. H.; LI, Y.; XIE, J. M.; LI, Q.; MA, G. J.; CHEN, Y. H.; LIN, Y. C.; LI, X. F. Studies on technology of supercritical-CO₂ fluid extraction for volatile oils and saikosaponins in *Bupleurum chinense* DC. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 25, p. 149-153, 2000.

GOSMANN, G.; GATTUSO, S.; GATTUSO, M.; FENNER, R.; PACHECO, E. F.; FERRAZ, A.; SAVI, L. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.; SORTINO, M. Botanical (morphological, micrographic), chemical and pharmacological characteristics of

Pfaffia species (*Amaranthaceae*) native to South Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 141-147, 2003.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Saponins: Properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 231-258, 2007.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1600-1606, 2008.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.; GRIFFIN, W. M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of industrial microbiology**, v. 6, p. 243-248, 1990.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1995.

HOU, J.; HE, S.; LING, M.; LI, W.; DONG, R.; PAN, Y.; ZHENG, Y. A method of extracting ginsenosides from *Panax ginseng* by pulsed electric field. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2707-2713, 2010.

HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; NAKATANI, M. Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 593-594, 1995.

JIMENEZ-FLORES, R.; RICHARDSON, T. **Process for the removal of cholesterol from dairy products**: Univ California (Regc). US5326579-A 1994.

JUNG, P. H.; DA SILVEIRA, A. C.; NIERI, E. M.; POTRICH, M.; DA SILVA, E. R. L.; REFATTI, M. Atividade Inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. **Floresta e Ambiente**, 2013.

KHAN, A. V.; AHMED, Q. U.; MIR, M. R.; SHUKLA, I.; KHAN, A. A. Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, p. 452-455, 2011.

LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FAGUNDES, F. H. R.; PRADO, J. M.; TOYAMA, M. H.; MEIRELES, M. A. A. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 38-45, 2010.

LEE, H. K.; KOH, H. L.; ONG, E. S.; WOO, S. O. Determination of ginsenosides in medicinal plants and health supplements by pressurized liquid extraction (PLE) with reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 160-166, 2002.

LI, J.; JADHAV, A. N.; KHAN, I. A. Triterpenoids from Brazilian ginseng, *Pfaffia paniculata*. **Planta Medica**, v. 76, p. 635, 2010a.

LI, J.; ZU, Y.-G.; FU, Y.-J.; YANG, Y.-C.; LI, S.-M.; LI, Z.-N.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, p. 637-643, 2010b.

LI, W.; LIU, Z.; WANG, Z.; CHEN, L.; SUN, Y.; HOU, J.; ZHENG, Y. Application of accelerated solvent extraction to the investigation of saikosaponins from the roots of *Bupleurum falcatum*. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1870-1876, 2010c.

LIU, H. B.; ZHANG, C. R.; DONG, S. H.; DONG, L.; WU, Y.; YUE, J. M. Limonoids and triterpenoids from the seeds of *Melia azedarach*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 1003-1007, 2011.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. ISBN 8586714194.

MAJINDA, R. R. T. Extraction and isolation of saponins. In: (Ed.). **Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology**, v. 864, 2012. cap. 16, p. 415-426.

MARCHIORETTO, M. S. **Os gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil**. 2008. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; DE SIQUEIRA, J. C. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, v. 37, p. 461-511, 2010.

MARQUES, L. C. **Avaliação da ação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen - *Amaranthaceae***. 1998. (Tese de Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

MARQUES, L. C.; DANUCALOV, M. Á.; TORRES, F.; GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. L.; SILVA, A. C. Estudo clínico duplo-cego de extrato padronizado (BNT-08) das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: avaliação do efeito tônico em atividade física. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 44-47, 2002.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; CABRAL, F. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; GODOY, A. T.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; PAVIANI, L. C. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 31-39, 2012.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998-1006, 2011.

MARTINEZ-CORREA, H. A. M. **Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água**. 2010. (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MATIAS, R.; SÓLON, S.; RESENDE, U. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químico e farmacológico: breve revisão. **Ensaio e Ciência**, v. 6, p. 91-121, 2002.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Inhibition of gastric emptying by triterpene saponin, momordin Ic, in mice: Roles of blood glucose, capsaicinsensitive sensory nerves, and central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 729-734, 1999.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; NAGAMINE, M. K.; DA SILVA, T. C.; SAKAI, M.; FONSECA, E. D. S. M.; PALERMO-NETO, J.; LIMA GÓRNIAC, S.; DAGLI, M. L. Z. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Letters**, v. 238, p. 85-89, 2006.

MAZZANTI, G.; BRAGHIROLI, L. Analgesic antiinflammatory action of *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 413-416, 1994.

MCHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. 1 ed. Butterworth-Heinemann, 1986.

MCHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. 2 ed. Butterworth-Heinemann, 1994. ISBN 0750692448.

MCKENNA, M. M.; ABOU-FAKHR HAMMAD, E. M.; FARRAN, M. T. Effect of *Melia azedarach* (Sapindales: Meliaceae) fruit extracts on Citrus Leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **SpringerPlus**, v. 2, 2013.

MILES, G. D.; SHEDLOVSKY, L. Minima in Surface Tension–Concentration Curves of Solutions of Sodium Alcohol Sulfates. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 48, p. 57-62, 1944.

MITRA, S.; DUNGAN, S. R. Micellar properties of Quillaja saponin. 1. Effects of temperature, salt, and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1587-1595, 1997.

NAGAMINE, M. K.; DA SILVA, T. C.; MATSUZAKI, P.; PINELLO, K. C.; COGLIATI, B.; PIZZO, C. R.; AKISUE, G.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; SINHORINI, I. L.; RAO, K. V. K.; BARBUTO, J. A. M.; DAGLI, M. L. Z. Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian Ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 61, p. 75-82, 2009.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1703-1705, 1984.

NAKAMURA, S.; CHEN, G.; NAKASHIMA, S.; MATSUDA, H.; PEI, Y.; YOSHIKAWA, M. Brazilian Natural Medicines. IV. New Noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 690-695, 2010.

NETO, A. G.; COSTA, J.; BELATI, C.; VINHOLIS, A.; POSSEBOM, L.; DA SILVA FILHO, A.; CUNHA, W.; CARVALHO, J.; BASTOS, J.; E SILVA, M. Analgesic and anti-

inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87-91, 2005.

NETO, A. G.; DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, J. M. L. C.; VINHOLIS, A. H. C.; SOUZA, G. H. B.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, v. 11, p. 662-665, 2004.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 139-142, 1984.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

ORHAN, I. E.; GUNER, E.; OZCELIK, B.; SENOL, F. S.; CAGLAR, S. S.; EMECEN, G.; KOCAK, O.; SENER, B. Assessment of antimicrobial, insecticidal and genotoxic effects of *Melia azedarach* L. (chinaberry) naturalized in Anatolia. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 560-565, 2012a.

ORHAN, I. E.; GUNER, E.; OZTURK, N.; SENOL, F. S.; ERDEM, S. A.; KARTAL, M.; SENER, B. Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 213-218, 2012b.

OSHIMA, M.; GU, Y. *Pfaffia paniculata*-induced changes in plasma estradiol-17 β , progesterone and testosterone levels in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 175-180, 2003.

PANSURIYA, R. C.; SINGHAL, R. S. Supercritical CO₂ Extraction of Lovastatin. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 159-165, 2009.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 33-41, 2013.

PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. **Perfumer & flavorist**, v. 16, p. 37-39, 1991.

QUAN, C.; LI, S.; TIAN, S.; XU, H.; LIN, A.; GU, L. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in ginseng. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, p. 149-157, 2004.

RATES, S.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 85-93, 2002.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 269-284, 2002.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

RIBEIRO, B. D.; ALVIANO, D. S.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 736-743, 2013.

ROCA, M. G. G. **Valorização do tomate nacional. Extração de licopeno por CO₂ supercrítico a partir do repiso de tomate**. 2009. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (*Rosaceae*) saponins. **Economic Botany**, v. 53, p. 302-311, 1999.

SANCHES, N. R.; GALLETO, R.; OLIVEIRA, C. E. D.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (*Amaranthaceae*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, p. 613-617, 2008.

SCAPINELLO, J.; RIBEIROS, M. L.; TOMAZELLI JR, O.; CHIARADIA, L. A.; VLADIMIR, J.; OLIVEIRA, J. D. M. Effects of SFE *Melia azedarach* on the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, 2013, Cartagena de Indias, Colômbia.

SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P.; SIMÕES, C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 1999. 607-609.

SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BATISTA, M. T.; DE SOUSA, H. C. Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 145-152, 2010.

SEFFRIN, R. C. A. S.; CORRÊA COSTA, E.; BORGES, L.; CORRALO BORGES, V.; DO NASCIMENTO, P. C.; BASTOS DEQUECH, S. T.; SAUSEN, C. D. Extratos aquosos de frutos verdes de *Melia azedarach* L. var. *azedarach*: Investigação da presença de cianeto e avaliação toxicológica. **Biotemas**, v. 21, p. 143-147, 2011.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1527-1530, 1993.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. 299, 1999. p.152-178. ISBN 0076-6879.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora ilustrada catarinense: Amarantáceas**. Itajaí UFSC, 1972.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ - I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, p. 409-414, 1994.

STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; STOYANOV, S.; PELAN, E. Surface rheology of saponin adsorption layers. **Langmuir**, v. 27, p. 12486-12498, 2011.

SUN, Y.; WEI, L.; WANG, J.; BI, J.; LIU, Z.; WANG, Y.; GUO, Z. Optimization of supercritical fluid extraction of saikosaponins from *Bupleurum falcatum* with orthogonal array design. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1161-1166, 2010.

SUN, Y. P. **Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties and Applications**. CRC Press, 2002. ISBN 0824744713.

TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, v. 24, p. 1057-1060, 1983.

UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 55-66, 2004.

VALLADARES, G. R.; FERREYRA, D.; DEFAGO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 421-424, 1999.

VASAPOLLO, G.; LONGO, L.; RESCIO, L.; CIURLIA, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 87-96, 2004.

VASCONCELOS, E. A. F.; BARBOSA, R. M.; MEDEIROS, M. G. F.; MOURA, T. F. A. L. Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius* Raddl. **Revista Fitos**, v. 1, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

VONGSANGNAK, W.; GUA, J.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG, J.-J. Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 115-120, 2004.

WACHSMAN, M.; MARTINO, V.; GUTKIND, G. O.; COUSSIO, J. D.; COTO, C. E.; DE TORRES, R. A. Antiviral activity of a *Melia azedarach* plant extract. **Fitoterapia**, v. 53, p. 167-170, 1982.

WACHSMAN, M. B.; CASTILLA, V.; COTO, C. E. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. **Archives of Virology**, v. 143, p. 581-590, 1998.

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKL, V. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Verlag, 1984. ISBN 364200573X.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Springer, 1929. ISBN 3540131957.

WANDSCHEER, C. B.; DUQUE, J. E.; DA SILVA, M. A. N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J. L.; ADELMANN, J.; FONTANA, J. D. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, v. 44, p. 829-835, 2004.

WANG, H.-C.; CHEN, C.-R.; CHANG, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. **Food Chemistry**, v. 72, p. 505-509, 2001.

WATANABE, T.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; HOTTA, C. Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice. **Cancer Detection and Prevention**, v. 24, p. 173-178, 2000.

WOO, H.-C.; SHIN, B.-K.; CHO, I.; KOO, H.; KIM, M.; HAN, J. Anti-obesity Effect of Carbon Dioxide Supercritical Fluid Extracts of *Panax Ginseng* C. A. Meyer. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 54, p. 738-743, 2011.

WOOD, J. A.; BERNARDS, M. A.; WAN, K. W.; CHARPENTIER, P. A. Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 40-47, 2006.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F.-T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.

WU, S.-B.; JI, Y.-P.; ZHU, J.-J.; ZHAO, Y.; XIA, G.; HU, Y.-H.; HU, J.-F. Steroids from the leaves of Chinese *Melia azedarach* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. **Steroids**, v. 74, p. 761-765, 2009.

WU, S. B.; BAO, Q. Y.; WANG, W. X.; ZHAO, Y.; XIA, G.; ZHAO, Z.; ZENG, H.; HU, J. F. Cytotoxic triterpenoids and steroids from the bark of *Melia azedarach*. **Planta Medica**, v. 77, p. 922-928, 2011.

XIONG, J.; GUO, J.; HUANG, L.; MENG, B.; PING, Q. Self-micelle formation and the incorporation of lipid in the formulation affect the intestinal absorption of *Panax notoginseng*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 191-196, 2008.

YANG, Y.; XIAO, Y.; LIU, B.; FANG, X.; YANG, W.; XU, J. Comparison of headspace solid-phase microextraction with conventional extraction for the analysis of the volatile components in *Melia azedarach*. **Talanta**, v. 86, p. 356-361, 2011.

YUAN, C. M.; ZHANG, Y.; TANG, G. H.; LI, Y.; HE, H. P.; LI, S. F.; HOU, L.; LI, X. Y.; DI, Y. T.; LI, S. L.; HUA, H. M.; HAO, X. J. Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach*. **Planta Medica**, v. 79, p. 163-168, 2013.

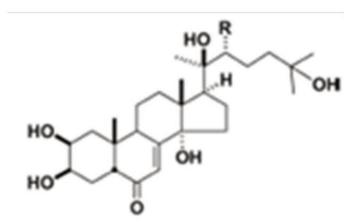
ZHANG, S. Q.; CHEN, R. Z.; WU, H.; WANG, C. Z. Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 57-63, 2006.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZHOU, H.; HAMAZAKI, A.; FONTANA, J. D.; TAKAHASHI, H.; WANDSCHEER, C. B.; FUKUYAMA, Y. Cytotoxic limonoids from Brazilian *Melia azedarach*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1362-1365, 2005.

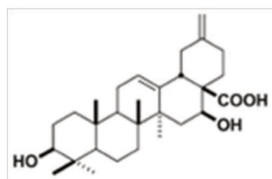
APÊNDICES

Apêndice A - Estrutura de Compostos Químicos

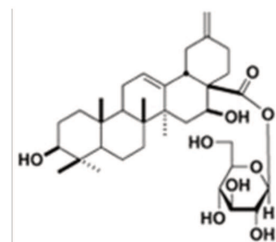


(1) Ecdisterona: R= OH

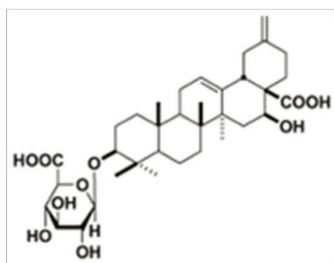
(2) Taxisterona: R= H



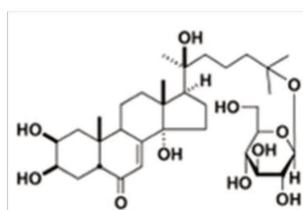
(3) Pfaffianol A



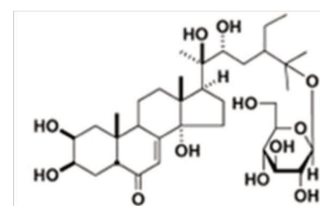
(4) Pfaffiaglicosídeo A



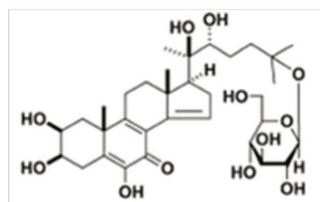
(5) Pfaffiaglicosídeo B



(6) Pfaffiaglicosídeo C



(7) Pfaffiaglicosídeo D



(8) Pfaffiaglicosídeo E

Figura A.1 Estrutura de alguns compostos presentes em raízes de *Pfaffia glomerata* (Nakamura et al., 2010) .

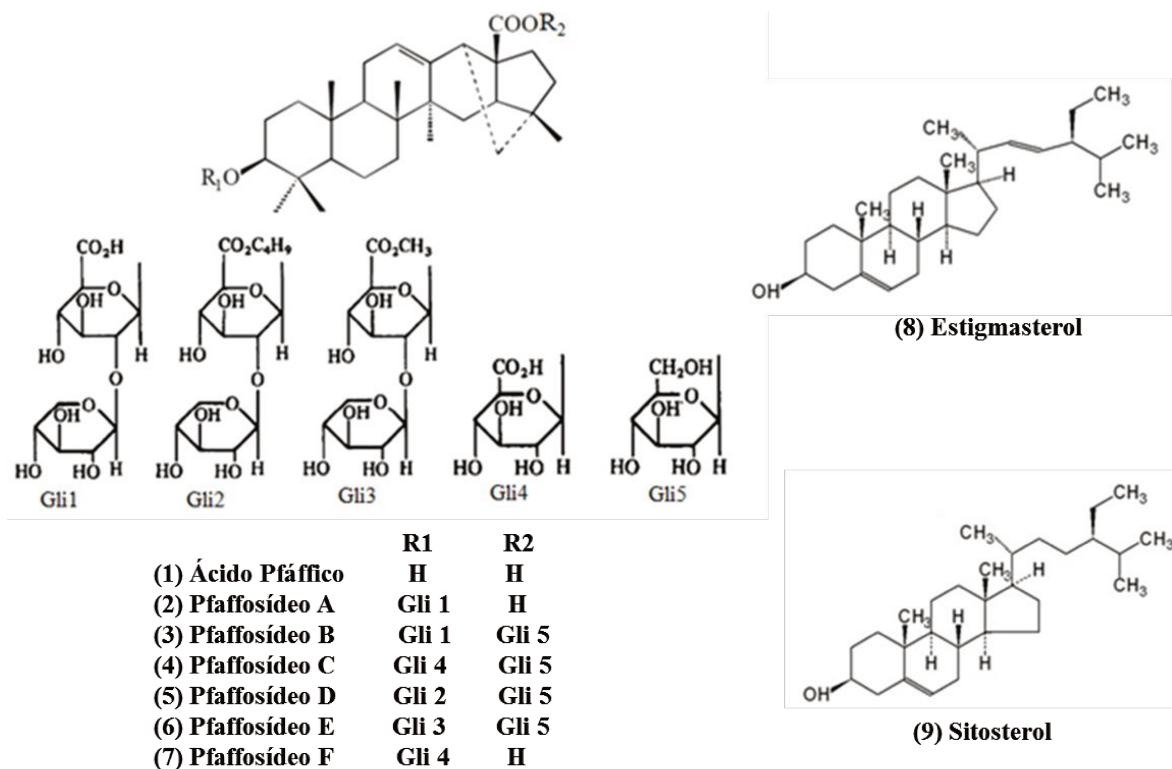
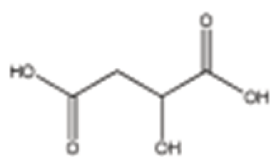
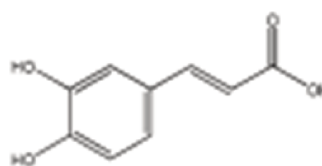


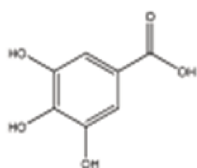
Figura A.2 Estrutura de alguns compostos presentes em raízes de *Hebanthe eriantha* (Takemoto et al., 1983; Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984).



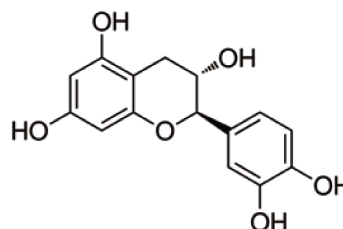
1. Ácido Málico



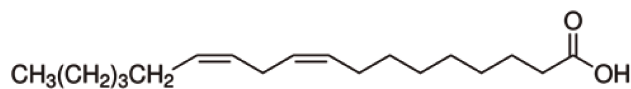
2. Ácido Caféico



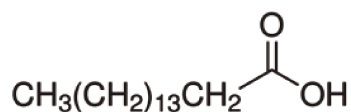
3. Ácido Gálico



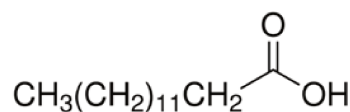
5. Catequina



3. Ácido Linoléico



4. Ácido Palmítico



5. Ácido Mirístico

Figura A.3 Estrutura de alguns compostos presentes em frutos de *Melia azedarach* (Aoudia et al., 2012; Orhan et al., 2012b).

Apêndice B - Resultados Preliminares

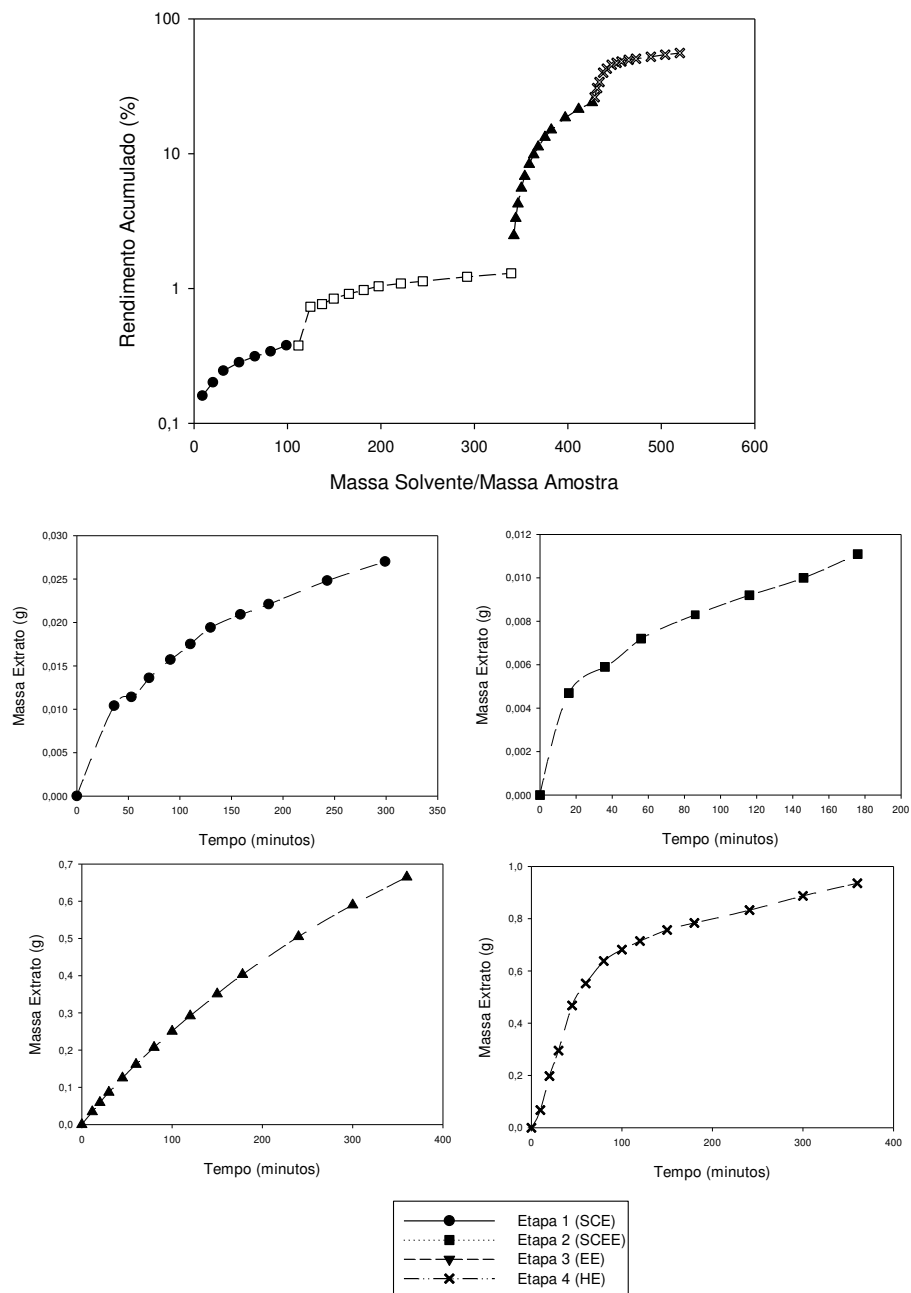


Figura B.1 Cinética de extração em leito fixo em etapas sequenciais (SCE, SCEE, EE, HE) a partir do extrato metanólico convencional de *Pfaffia glomerata*.

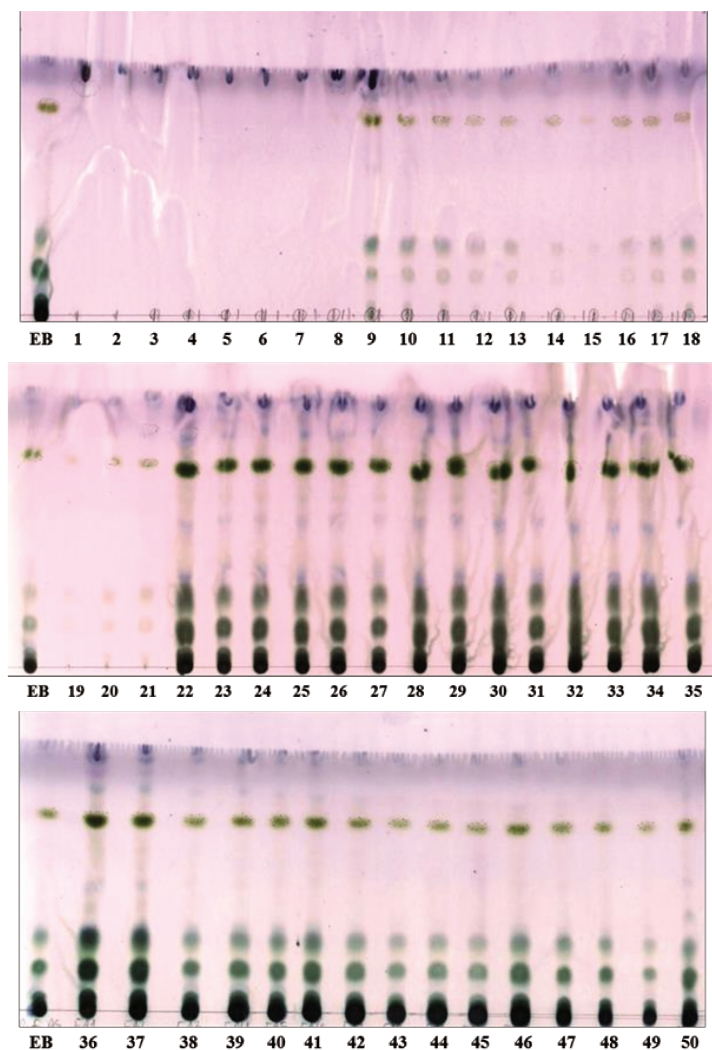


Figura B.2 Cromatograma (CCD) das frações obtidas pela extração sequencial a partir do extrato metanólico convencional de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: EB: extrato metanólico bruto; 1 a 8: extrato supercrítico (SCE); 9 a 21: extrato supercrítico com etanol como cossolvente (SCEE); 22 a 35, 49 e 50: extrato etanólico (EE); 36 a 470: extrato hidroalcoólico (HE); 48: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

Apêndice C - Análises Granulométricas

Tabela C.1 Análise granulométrica de raízes moídas de *Pfaffia glomerata*.

Peneira (Tyler)	Diâmetro Abertura (mm)	Massa Retida (%)	$\bar{d}_i$ (mm)
24	0,710	4,95	0,843
32	0,500	17,76	0,596
60	0,250	31,87	0,354
100	0,150	12,43	0,194
170	0,090	12,33	0,116
270	0,053	14,79	0,069
fundo	-	5,86	0,045

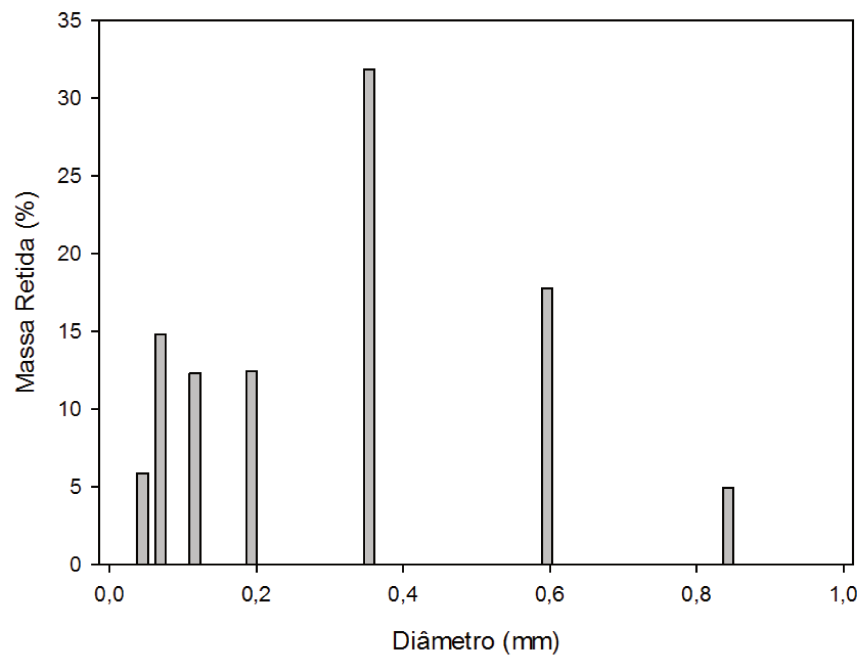


Figura C.1 Distribuição das partículas de raízes moídas de *Pfaffia glomerata*.

Tabela C.2 Análise granulométrica de raízes moídas de *Hebanthe eriantha*.

Peneira (Tyler)	Diâmetro Abertura (mm)	Massa Retida (%)	$\bar{d}_i$ (mm)
16	1,00	5,23	1,183
24	0,71	15,91	0,843
32	0,50	21,45	0,596
48	0,30	28,76	0,387
60	0,25	7,96	0,274
100	0,15	10,04	0,194
fundo	-	10,64	0,116

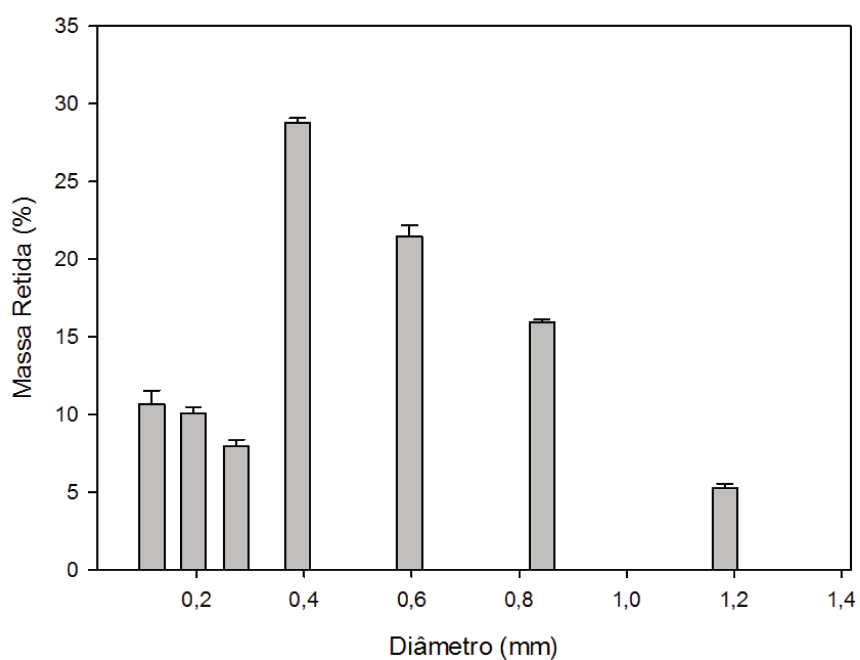
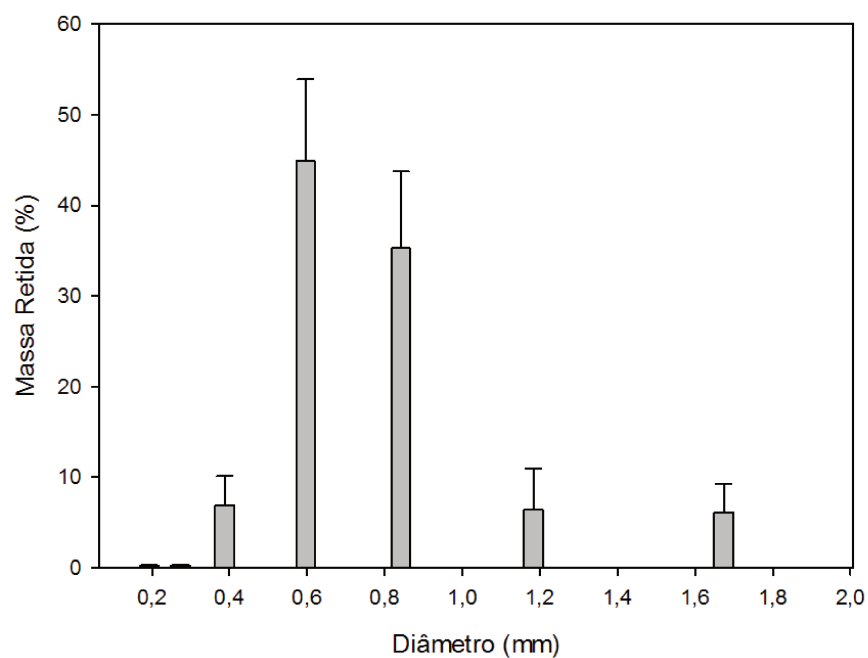
**Figura C.2** Distribuição das partículas de raízes moídas de *Hebanthe eriantha*.

Tabela C.3 Análise granulométrica de frutos moídos de *Melia azedarach*.

Peneira (Tyler)	Diâmetro Abertura (mm)	Massa Retida (%)	$\bar{d}_i$ (mm)
12	1,40	6,11	1,673
16	1,00	6,39	1,183
24	0,71	35,26	0,843
32	0,50	44,88	0,596
48	0,30	6,92	0,387
60	0,25	0,27	0,274
fundo	-	0,18	0,194

**Figura C.3** Distribuição das partículas de frutos moídos de *Melia azedarach*.

Apêndice D - Dados de Extração

Tabela D.1 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Pfaffia glomerata* – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,0926 g).

	Ponto	Tempo (min)	Massa Acumulada (g)				Rendimento global Acumulado (%)	
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente	Extrato	
scCO ₂	-	0	-	-	-	0,00	0,000	0,00
	1	20	33,00	-	-	33,00	0,002	0,03
	2	40	66,00	-	-	66,00	0,003	0,05
	3	60	99,00	-	-	99,00	0,005	0,07
	4	90	148,50	-	-	148,50	0,007	0,10
	5	120	198,00	-	-	198,00	0,011	0,15
	6	150	247,50	-	-	247,50	0,011	0,16
	7	180	297,00	-	-	297,00	0,012	0,17
scCO ₂ + Etanol	8	15	24,75	11,13	-	35,88	0,002	0,19
	9	30	49,50	20,49	-	69,99	0,006	0,25
	10	45	74,25	31,09	-	105,34	0,008	0,28
	11	60	99,00	41,70	-	140,70	0,011	0,32
	12	80	132,00	56,54	-	188,54	0,014	0,37
	13	100	165,00	70,91	-	235,91	0,016	0,39
	14	120	198,00	84,80	-	282,80	0,019	0,43
	15	150	247,50	106,00	-	353,50	0,021	0,47
	16	180	297,00	127,91	-	424,91	0,024	0,50
	17	240	396,00	169,13	-	565,13	0,028	0,56
	18	300	495,00	212,24	-	707,24	0,032	0,61
Etanol	19	15	-	10,60	-	10,60	0,010	0,76
	21	30	-	21,20	-	21,20	0,016	0,83
	22	45	-	32,86	-	32,86	0,020	0,90
	23	60	-	42,40	-	42,40	0,024	0,95
	24	80	-	56,54	-	56,54	0,028	1,01
	25	100	-	70,67	-	70,67	0,032	1,06
	26	120	-	84,80	-	84,80	0,037	1,13
	27	150	-	106,00	-	106,00	0,043	1,22
	28	180	-	127,21	-	127,21	0,049	1,30
	29	240	-	169,61	-	169,61	0,058	1,43
	30	300	-	212,01	-	212,01	0,067	1,56
	31	360	-	254,41	-	254,41	0,076	1,69
Etanol + Água	32	15	-	-	15,68	15,68	0,005	1,77
	33	30	-	-	22,94	22,94	0,021	1,98
	34	45	-	-	34,41	34,41	0,092	2,98
	35	60	-	-	45,88	45,88	0,138	3,64
	36	80	-	-	61,18	61,18	0,181	4,24
	37	100	-	-	76,47	76,47	0,214	4,70
	38	120	-	-	91,76	91,76	0,251	5,23
	39	150	-	-	114,70	114,70	0,287	5,74
	40	180	-	-	137,64	137,64	0,323	6,25
	41	240	-	-	183,53	183,53	0,387	7,15
	44	300	-	-	229,41	229,41	0,442	7,92
	45	360	-	-	275,29	275,29	0,490	8,60

Tabela D.2 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Pfaffia glomerata* – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0708 g).

Ponto		Tempo (min)	Massa Acumulada (g)				Extrato	Rendimento global Acumulado (%)
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente		
scCO ₂	-	0	-	-	-	0,00	0,000	0,00
	1	20	33,00	-	-	33,00	0,002	0,03
	2	40	66,00	-	-	66,00	0,005	0,07
	3	60	99,00	-	-	99,00	0,007	0,10
	4	90	148,50	-	-	148,50	0,009	0,13
	5	120	198,00	-	-	198,00	0,011	0,16
	6	150	247,50	-	-	247,50	0,014	0,19
	7	180	297,00	-	-	297,00	0,016	0,22
scCO ₂ + Etanol	8	15	24,75	11,72	-	36,47	0,002	0,25
	9	30	49,50	22,85	-	72,35	0,006	0,31
	10	45	74,25	33,98	-	108,23	0,009	0,35
	11	60	99,00	44,76	-	143,76	0,012	0,39
	12	80	132,00	59,42	-	191,42	0,016	0,45
	13	100	165,00	74,08	-	239,08	0,019	0,50
	14	120	198,00	89,28	-	287,28	0,023	0,55
	15	150	247,50	110,95	-	358,45	0,026	0,60
	16	180	297,00	131,54	-	428,54	0,031	0,66
	17	240	396,00	175,14	-	571,14	0,037	0,74
	18	300	495,00	215,95	-	710,95	0,040	0,83
Etanol	19	15	-	10,60	-	10,60	0,018	1,09
	21	30	-	21,20	-	21,20	0,025	1,18
	22	45	-	31,80	-	31,80	0,028	1,23
	23	60	-	42,40	-	42,40	0,031	1,27
	24	80	-	56,54	-	56,54	0,035	1,32
	25	100	-	70,67	-	70,67	0,038	1,37
	26	120	-	84,80	-	84,80	0,042	1,42
	27	150	-	106,00	-	106,00	0,047	1,49
	28	180	-	127,21	-	127,21	0,052	1,57
	29	240	-	169,61	-	169,61	0,059	1,66
	30	300	-	212,01	-	212,01	0,066	1,76
	31	360	-	254,41	-	254,41	0,071	1,84
Etanol + Água	32	15	-	-	11,47	11,47	0,009	1,96
	33	30	-	-	22,94	22,94	0,036	2,35
	34	45	-	-	34,41	34,41	0,165	4,17
	35	60	-	-	45,88	45,88	0,248	5,35
	36	80	-	-	61,18	61,18	0,328	6,48
	37	100	-	-	76,47	76,47	0,393	7,40
	38	120	-	-	91,76	91,76	0,452	8,23
	39	150	-	-	114,70	114,70	0,518	9,16
	40	180	-	-	137,64	137,64	0,566	9,84
	41	240	-	-	183,53	183,53	0,639	10,87
	44	300	-	-	229,41	229,41	0,688	11,57
	45	360	-	-	275,29	275,29	0,724	12,08

Tabela D.3 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Pfaffia glomerata* – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0405 g).

Etapa	Ponto	Tempo (min)	Massa (g)				Rendimento global
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Extrato	Acumulado (%)
scCO ₂	1	180,00	297,0	-	-	0,01	0,08
scCO ₂ + Etanol	2	300,00	495,0	219,08	-	0,04	0,68
Etanol	3	360,00	-	254,41	-	0,06	1,58
Etanol + Água	4	360,00	-	-	275,29	0,25	5,14

Tabela D.4 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Hebanthe eriantha* – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,3319 g).

	Ponto	Tempo (min)	Massa Acumulada (g)				Extrato	Rendimento global Acumulado (%)
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente		
scCO ₂	-	0	-	-	-	0,00	0,000	0,00
	1	20	33,00	-	-	33,00	0,001	0,02
	2	40	66,00	-	-	66,00	0,003	0,04
	3	60	99,00	-	-	99,00	0,005	0,07
	4	90	148,50	-	-	148,50	0,008	0,11
	5	120	198,00	-	-	198,00	0,010	0,13
	6	150	247,50	-	-	249,15	0,012	0,16
	7	180	297,00	-	-	297,00	0,013	0,18
scCO ₂ + Etanol	8	15	24,75	11,43	-	36,18	0,001	0,20
	9	30	49,50	22,97	-	72,47	0,009	0,31
	10	45	74,25	33,86	-	108,11	0,013	0,35
	11	60	99,00	44,88	-	143,88	0,016	0,39
	12	80	132,00	59,24	-	191,24	0,019	0,45
	13	100	165,00	73,61	-	238,61	0,022	0,49
	14	120	198,00	87,81	-	285,81	0,026	0,53
	15	150	247,50	109,07	-	356,57	0,030	0,59
	16	180	297,00	130,21	-	427,21	0,032	0,62
	17	240	396,00	172,31	-	568,31	0,038	0,70
	18	300	495,00	215,54	-	710,54	0,042	0,76
Etanol	19	15	-	10,60	-	10,60	0,008	0,86
	21	30	-	21,20	-	21,20	0,012	0,92
	22	45	-	31,80	-	31,80	0,016	0,98
	23	60	-	42,40	-	42,40	0,020	1,04
	24	80	-	56,54	-	56,54	0,025	1,10
	25	100	-	70,67	-	70,67	0,029	1,16
	26	120	-	84,80	-	84,80	0,033	1,22
	27	150	-	106,00	-	106,00	0,039	1,28
	28	180	-	127,21	-	127,21	0,044	1,35
	29	240	-	169,61	-	169,61	0,052	1,46
	30	300	-	212,01	-	212,01	0,059	1,56
	31	360	-	254,41	-	254,41	0,067	1,67
Etanol + Água	32	15	-	-	11,47	11,47	0,008	1,77
	33	30	-	-	22,94	22,94	0,019	1,93
	34	45	-	-	34,41	34,41	0,171	4,00
	35	60	-	-	45,88	45,88	0,478	8,19
	36	80	-	-	61,18	61,18	0,836	13,07
	37	100	-	-	76,47	76,47	1,113	16,85
	38	120	-	-	91,76	91,76	1,330	19,81
	39	150	-	-	114,70	114,70	1,599	23,48
	40	180	-	-	137,64	137,64	1,809	26,33
	41	240	-	-	183,53	183,53	2,044	29,55
	44	300	-	-	229,41	229,41	2,237	32,17
	45	360	-	-	275,29	275,29	2,391	34,27

Tabela D.5 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Hebanthe eriantha* – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0556 g).

	Ponto	Tempo (min)	Massa Acumulada (g)					Rendimento global Acumulado (%)
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente	Extrato	
scCO ₂	-	0	-	-	-	0	0,000	0
	1	20	33,00	-	-	33,00	0,001	0,02
	2	40	66,00	-	-	66,00	0,003	0,04
	3	60	99,00	-	-	99,00	0,005	0,08
	4	90	148,50	-	-	148,50	0,008	0,11
	5	120	198,00	-	-	198,00	0,010	0,14
	6	150	247,50	-	-	247,50	0,013	0,18
	7	180	297,00	-	-	297,00	0,014	0,20
scCO ₂ + Etanol	8	15	24,75	10,72	-	35,47	0,002	0,23
	9	30	49,50	21,14	-	70,64	0,010	0,34
	10	45	74,25	31,98	-	106,23	0,013	0,38
	11	60	99,00	42,28	-	141,28	0,016	0,43
	12	80	132,00	56,89	-	188,89	0,020	0,48
	13	100	165,00	70,79	-	235,79	0,023	0,52
	14	120	198,00	84,86	-	282,86	0,025	0,56
	15	150	247,50	106,00	-	353,50	0,028	0,60
	16	180	297,00	127,26	-	424,26	0,032	0,65
	17	240	396,00	169,78	-	565,78	0,037	0,73
	18	300	495,00	212,01	-	707,01	0,044	0,82
Etanol	19	15	-	10,60	-	10,60	0,006	0,91
	21	30	-	21,20	-	21,20	0,010	0,97
	22	45	-	31,80	-	31,80	0,014	1,02
	23	60	-	42,40	-	42,40	0,019	1,10
	24	80	-	56,54	-	56,54	0,023	1,14
	25	100	-	70,67	-	70,67	0,028	1,21
	26	120	-	84,80	-	84,80	0,032	1,28
	27	150	-	106,00	-	106,00	0,039	1,38
	28	180	-	127,21	-	127,21	0,043	1,44
	29	240	-	169,61	-	169,61	0,052	1,56
	30	300	-	212,01	-	212,01	0,061	1,68
	31	360	-	253,35	-	253,35	0,068	1,79
Etanol + Água	32	15	-	-	11,47	11,47	0,081	2,94
	33	30	-	-	22,94	22,94	0,616	10,52
	34	45	-	-	34,41	34,41	1,069	16,95
	35	60	-	-	45,88	45,88	1,364	21,13
	36	80	-	-	61,18	61,18	1,621	24,76
	37	100	-	-	76,47	76,47	1,801	27,32
	38	120	-	-	91,76	91,76	1,934	29,21
	39	150	-	-	114,70	114,70	2,073	31,17
	40	180	-	-	137,64	137,64	2,161	32,41
	41	240	-	-	183,53	183,53	2,324	34,73
	44	300	-	-	229,41	229,41	2,441	36,39
	45	360	-	-	275,29	275,29	2,534	37,70

Tabela D.6 Dados da extração sequencial em leito fixo de raízes de *Hebanthe eriantha* – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0620 g).

Etapa	Ponto	Tempo (min)	Massa (g)				Rendimento global
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Extrato	Acumulado (%)
scCO ₂	1	180,00	297,0	-	-	0,01	0,14
scCO ₂ + Etanol	2	300,00	495,0	216,60	-	0,04	0,67
Etanol	3	360,00	-	254,41	-	0,06	1,46
Etanol + Água	4	360,00	-	-	275,29	1,07	16,55

Tabela D.7 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de *Melia azedarach* – Corrida 1 (massa amostra inicial: 7,0759 g).

	Ponto	Tempo (min)	Massa Acumulada (g)				Extrato	Rendimento global Acumulado (%)
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente		
scCO ₂	-	0	-	-	-	0,00	0,00	0,00
	1	20	33,0	-	-	33,00	0,23	3,25
	2	40	66,0	-	-	66,00	0,35	4,90
	3	60	99,0	-	-	99,00	0,43	6,12
	4	90	148,5	-	-	148,50	0,49	6,93
	5	120	198,0	-	-	198,00	0,53	7,54
	6	150	247,5	-	-	247,50	0,57	8,01
	7	180	297,0	-	-	297,00	0,58	8,23
	8	240	396,0	-	-	396,00	0,60	8,45
9	300	495,0	-	-	495,00	0,64	8,97	
scCO ₂ + Etanol	10	15	24,8	10,9	-	35,70	0,00	9,03
	11	30	49,5	21,9	-	71,41	0,08	10,12
	12	45	74,2	31,7	-	105,93	0,11	10,60
	13	60	99,0	41,9	-	140,93	0,15	11,15
	14	80	132,0	56,3	-	188,30	0,19	11,68
	15	100	165,0	70,3	-	235,32	0,23	12,16
	16	120	198,0	84,6	-	282,57	0,25	12,52
	17	150	247,5	105,8	-	353,27	0,29	13,11
	18	180	297,0	126,8	-	423,80	0,33	13,59
	19	240	396,0	169,6	-	565,61	0,39	14,50
	20	300	495,0	212,0	-	707,01	0,45	15,33
21	360	594,0	254,4	-	848,41	0,48	15,81	
Etanol	22	15	-	10,6	-	10,60	0,21	18,34
	23	30	-	21,2	-	21,20	0,34	20,20
	24	45	-	31,8	-	31,80	0,44	21,61
	25	60	-	42,4	-	42,40	0,53	22,82
	26	80	-	56,5	-	56,54	0,63	24,21
	27	100	-	70,7	-	70,67	0,71	25,42
	28	120	-	84,8	-	84,80	0,79	26,50
	29	150	-	106,0	-	106,00	0,89	27,88
	30	180	-	127,2	-	127,21	0,97	29,02
	31	240	-	169,6	-	169,61	1,10	30,85
	32	300	-	212,0	-	212,01	1,20	32,25
	33	360	-	254,4	-	254,41	1,28	33,41
Etanol + Água	34	15	-	-	11,5	11,47	0,02	33,66
	35	30	-	-	23,2	23,32	0,07	34,41
	36	45	-	-	34,4	34,41	0,22	36,49
	37	60	-	-	45,9	45,88	0,38	38,77
	38	80	-	-	61,2	61,18	0,51	40,57
	39	100	-	-	76,5	76,47	0,59	41,81
	40	120	-	-	91,9	91,95	0,66	42,74
	41	150	-	-	114,7	114,70	0,73	43,74
	42	180	-	-	137,6	137,64	0,77	44,33
	43	240	-	-	183,5	183,53	0,82	44,97
	44	300	-	-	229,4	229,41	0,84	45,34
	45	360	-	-	275,3	275,29	0,86	45,62

Tabela D.8 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de *Melia azedarach* – Corrida 2 (massa amostra inicial: 7,0824 g).

	Ponto	Tempo (min)	Massa Acumulada (g)				Extrato	Rendimento global Acumulado (%)
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Solvente		
scCO ₂	-	0	-	-	-	0,00	0,00	0,00
	1	20	33,0	-	-	33,00	0,18	2,59
	2	40	66,0	-	-	66,00	0,29	4,03
	3	60	99,0	-	-	99,00	0,35	5,00
	4	90	148,5	-	-	148,50	0,40	5,65
	5	120	198,0	-	-	198,00	0,44	6,18
	6	150	247,5	-	-	247,50	0,47	6,59
	7	180	297,0	-	-	297,00	0,49	6,89
	8	240	396,0	-	-	396,00	0,50	7,08
	9	300	495,0	-	-	495,00	0,52	7,28
scCO ₂ + Etanol	10	15	24,8	11,3	-	36,06	0,00	7,30
	11	30	49,5	22,2	-	71,76	0,07	8,30
	12	45	74,2	32,3	-	106,58	0,10	8,68
	13	60	99,0	42,3	-	141,23	0,12	9,03
	14	80	132,0	56,5	-	188,54	0,16	9,60
	15	100	165,0	70,2	-	235,26	0,19	9,93
	16	120	198,0	84,5	-	282,45	0,21	10,24
	17	150	247,5	106,4	-	353,86	0,25	10,79
	18	180	297,0	127,0	-	424,03	0,28	11,22
	19	240	396,0	169,1	-	565,08	0,33	11,98
	20	300	495,0	211,7	-	706,66	0,38	11,83
	21	360	594,0	255,0	-	849,00	0,42	12,61
Etanol	22	15	-	10,6	-	10,60	0,12	14,31
	23	30	-	21,2	-	21,20	0,24	16,00
	24	45	-	31,8	-	31,80	0,35	17,48
	25	60	-	42,4	-	42,40	0,44	18,78
	26	80	-	56,5	-	56,54	0,54	20,30
	27	100	-	70,7	-	70,67	0,64	21,61
	28	120	-	84,8	-	84,80	0,72	22,72
	29	150	-	106,0	-	106,00	0,82	24,15
	30	180	-	127,2	-	127,21	0,91	25,44
	31	240	-	169,6	-	169,61	1,06	27,51
	32	300	-	212,0	-	212,01	1,17	29,09
	33	360	-	254,4	-	254,41	1,26	30,34
Etanol + Água	34	15	-	-	11,5	11,47	0,04	30,89
	35	30	-	-	22,9	22,94	0,18	32,87
	36	45	-	-	34,4	34,41	0,28	34,29
	37	60	-	-	45,9	45,88	0,37	35,52
	38	80	-	-	61,2	61,18	0,47	36,92
	39	100	-	-	76,5	76,47	0,55	38,09
	40	120	-	-	91,8	91,76	0,62	39,09
	41	150	-	-	114,7	114,70	0,70	40,25
	42	180	-	-	137,6	137,64	0,76	41,11
	43	240	-	-	183,5	183,53	0,84	42,15
	44	300	-	-	229,4	229,41	0,88	42,73
	45	360	-	-	275,3	275,29	0,91	43,14

Tabela D.9 Dados da extração sequencial em leito fixo de frutos de *Melia azedarach* – Corrida 3 (massa amostra inicial: 7,0869 g).

Etapa	Ponto	Tempo (min)	Massa (g)				Rendimento global
			CO ₂	Etanol	Etanol/Água	Extrato	Acumulado (%)
scCO ₂	1	300,00	495,00	-	-	0,45	6,39
scCO ₂ + Etanol	2	360,00	594,00	256,53	-	0,53	13,93
Etanol	3	360,00	-	254,41	-	1,49	35,02
Etanol + Água	4	360,00	-	-	275,29	0,85	47,03

Apêndice E - Cromatogramas (CCD)

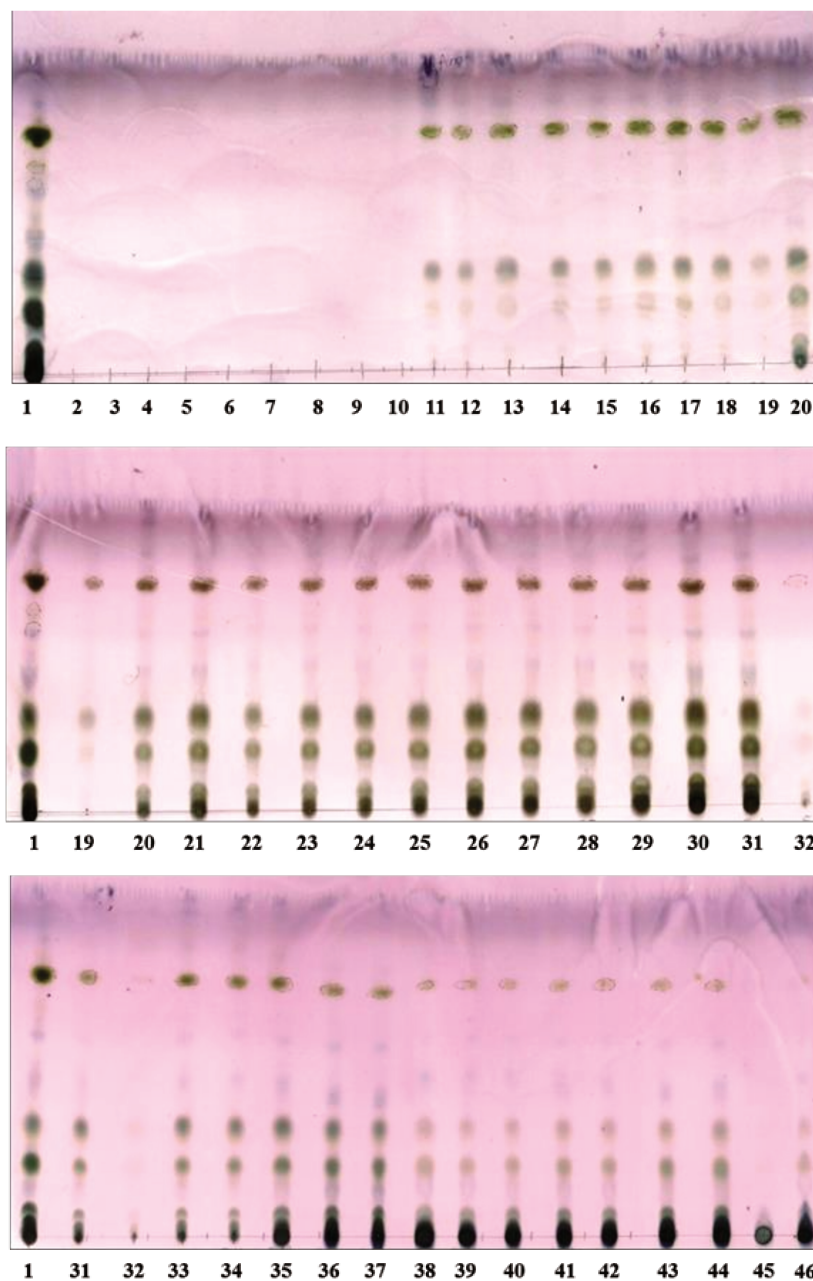


Figura E.1 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 1). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-32: EE – extrato etanólico; 33-45: HE – extrato hidroalcoólico; 46: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

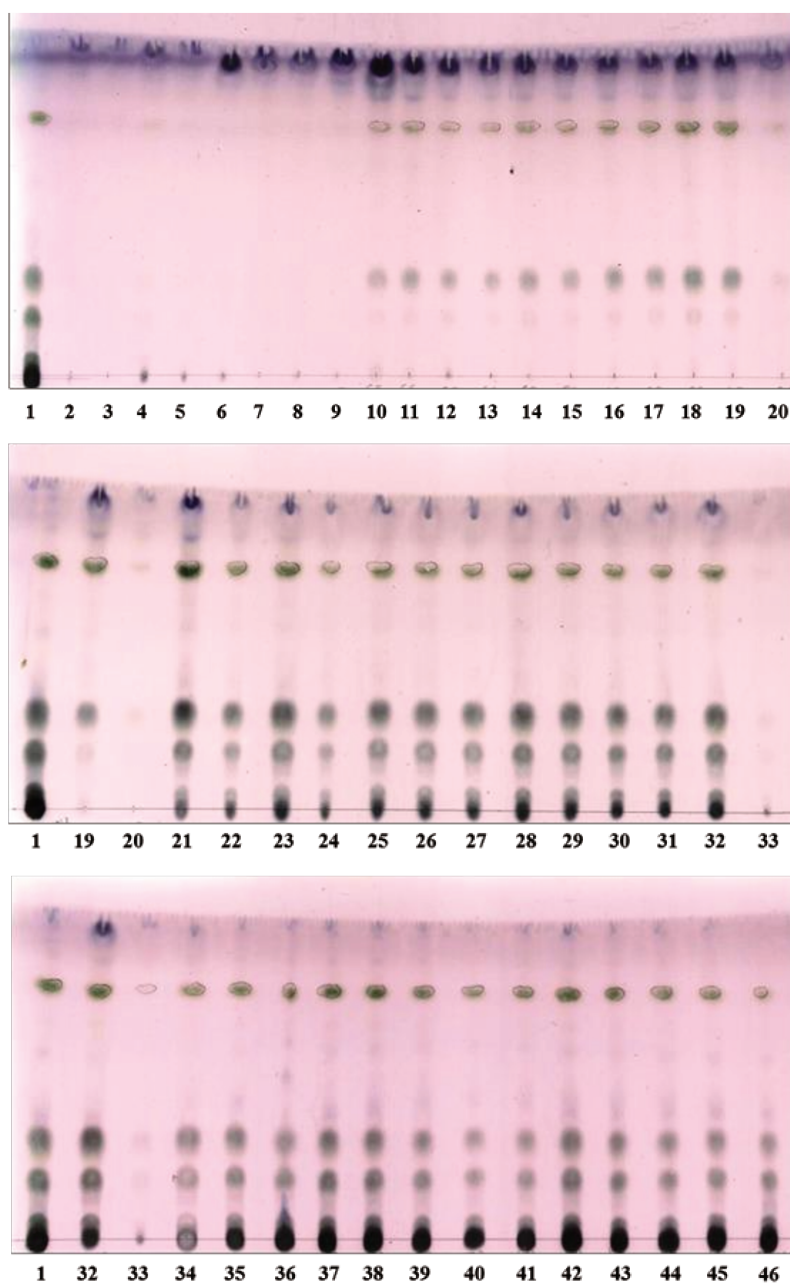


Figura E.2 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 2). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-32: EE – extrato etanólico; 33-45: HE – extrato hidroalcoólico; 46: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

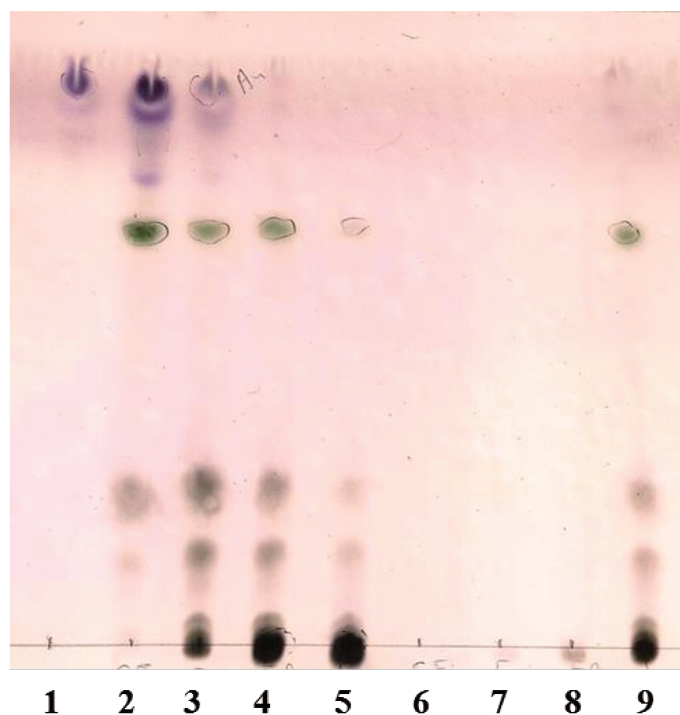


Figura E.3 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Pfaffia glomerata* (Corrida 3). 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

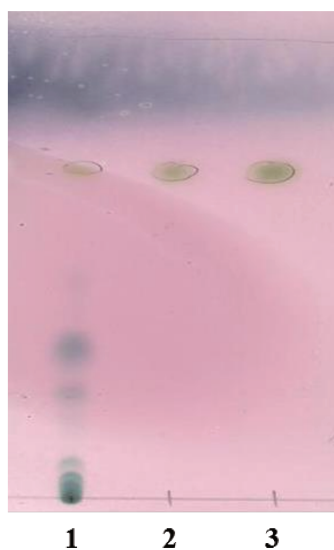


Figura E.4 Cromatograma (CCD) dos padrões de *Pfaffia glomerata*. Aplicação: 1: extrato metanólico bruto (referência); 2: β -ecdisona 2 mg.mL^{-1} ($1 \text{ }\mu\text{L}$); 3: e β -ecdisona 2 mg.mL^{-1} ($2 \text{ }\mu\text{L}$). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

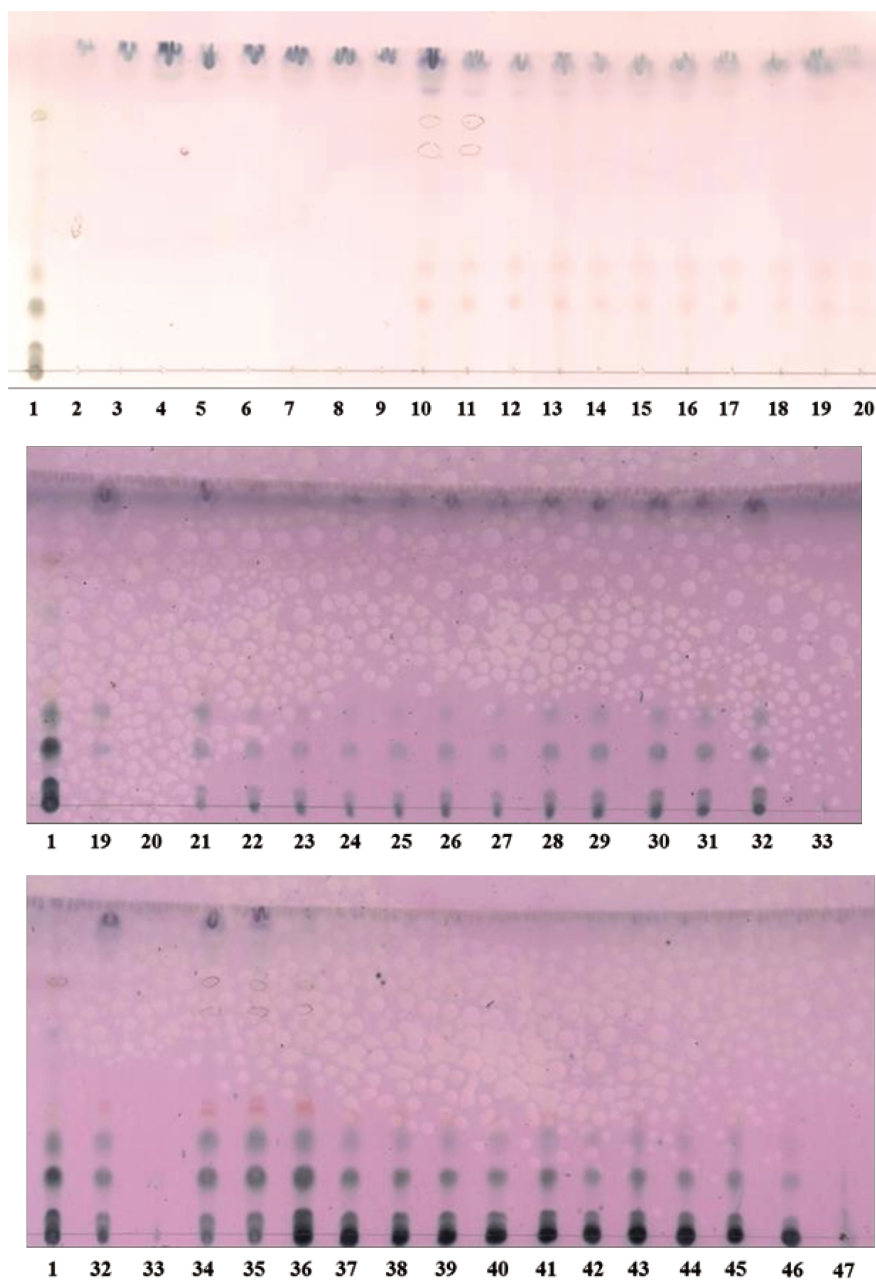


Figura E.5 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha* (Corrida 1). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-33: EE – extrato etanólico; 34-46: HE – extrato hidroalcoólico; 47: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

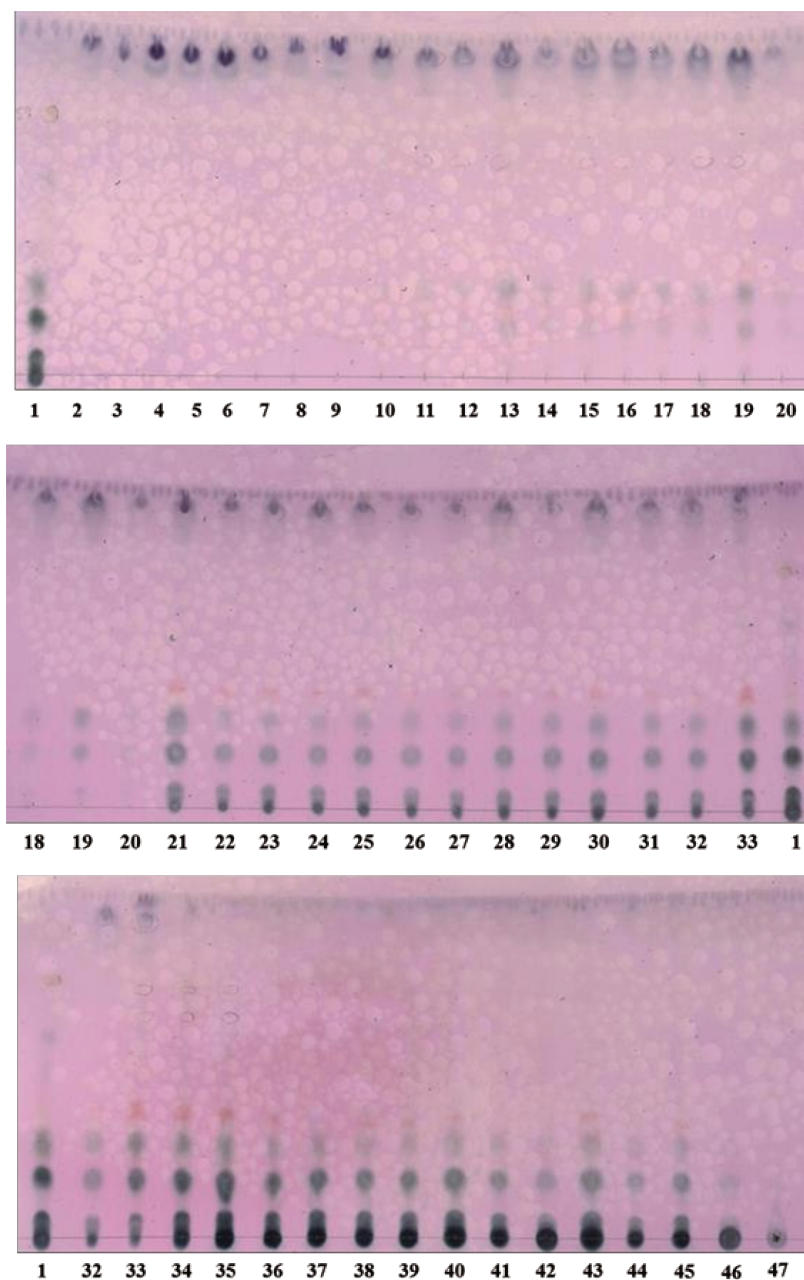


Figura E.6 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha* (Corrida 2). 1: extrato metanólico bruto (referência); 2-8: SCE – extrato supercrítico; 9-20: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 21-33: EE – extrato etanólico; 34-46: HE – extrato hidroalcoólico; 47: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

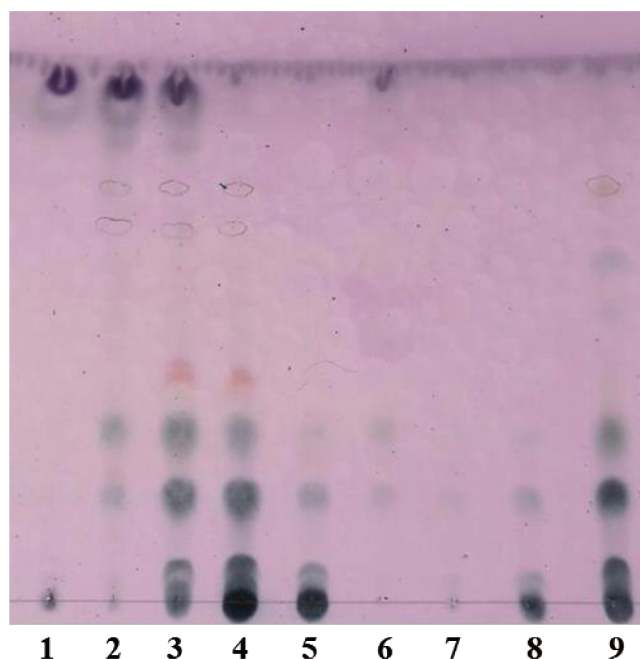


Figura E.7 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Hebanthe eriantha* (Corrida 3). 1: SCE – extrato supercrítico; 2: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 3: EE – extrato etanólico; 4: HE – extrato hidroalcoólico; 5: resíduo final; 6: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 7: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 8: HE obtido durante despressurização da etapa 4; 9: extrato metanólico bruto (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

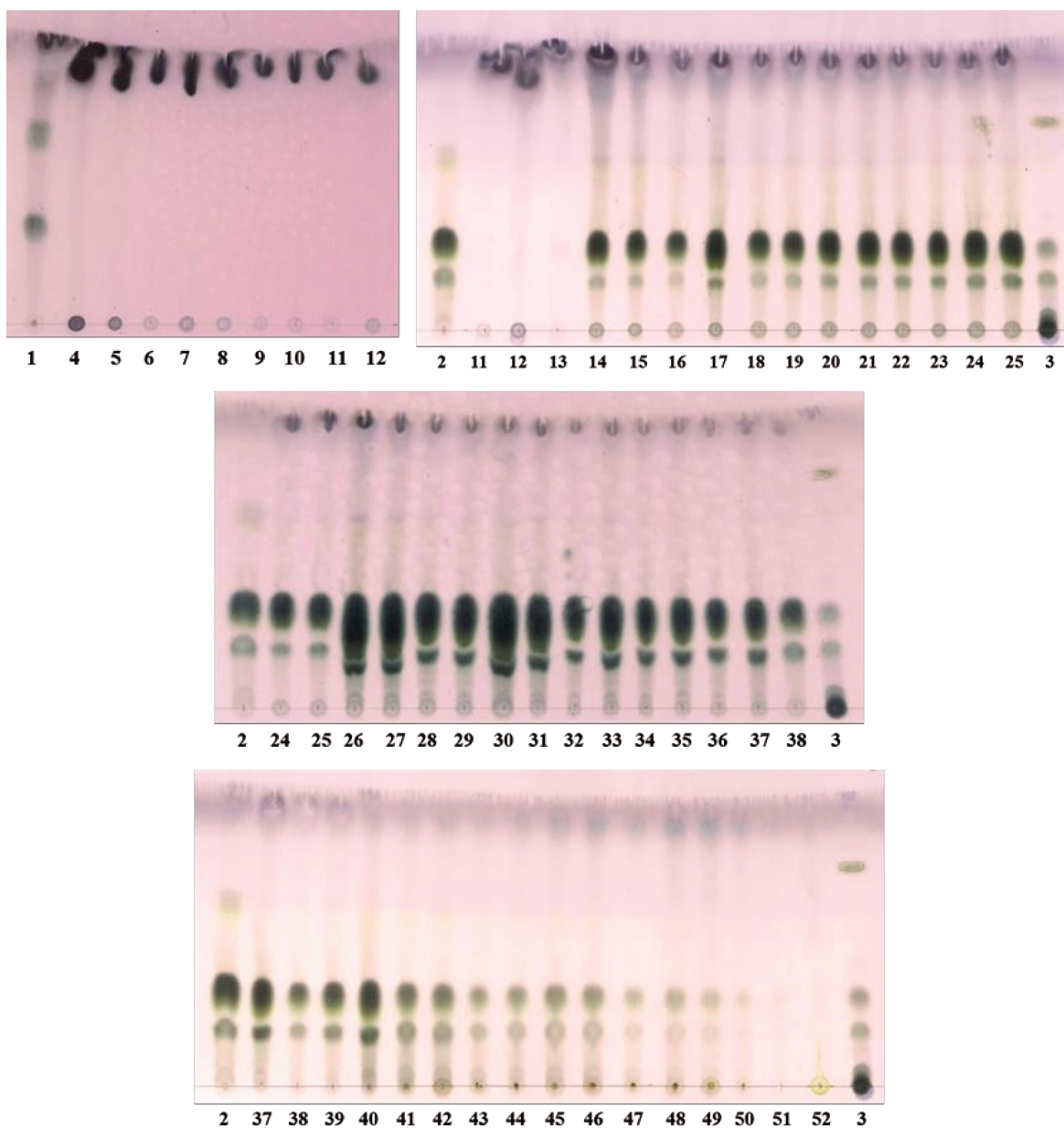


Figura E.8 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Melia azedarach* (Corrida 1). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: extrato metanólico bruto de *Pfaffia glomerata* (referência); 4-12: SCE – extrato supercrítico; 13-25: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 26-38: EE – extrato etanólico; 39-51: HE: extrato hidroalcoólico; 52: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisalaldeído.

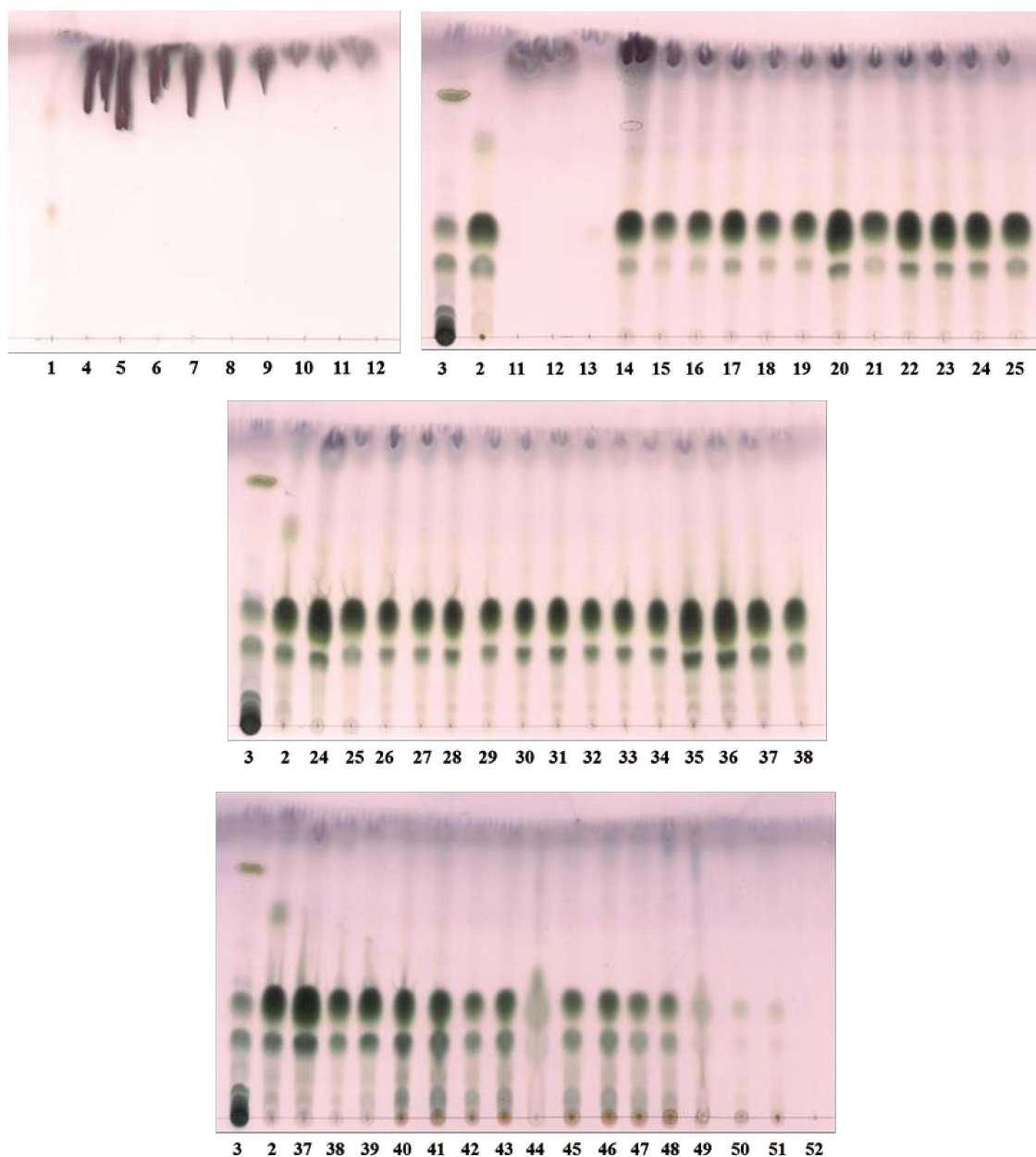


Figura E.9 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Melia azedarach* (Corrida 2). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: extrato metanólico bruto de *Pfaffia glomerata* (referência); 4-12: SCE – extrato supercrítico; 13-25: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 26-38: EE – extrato etanólico; 39-51: HE: extrato hidroalcoólico; 52: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisalaldeído.

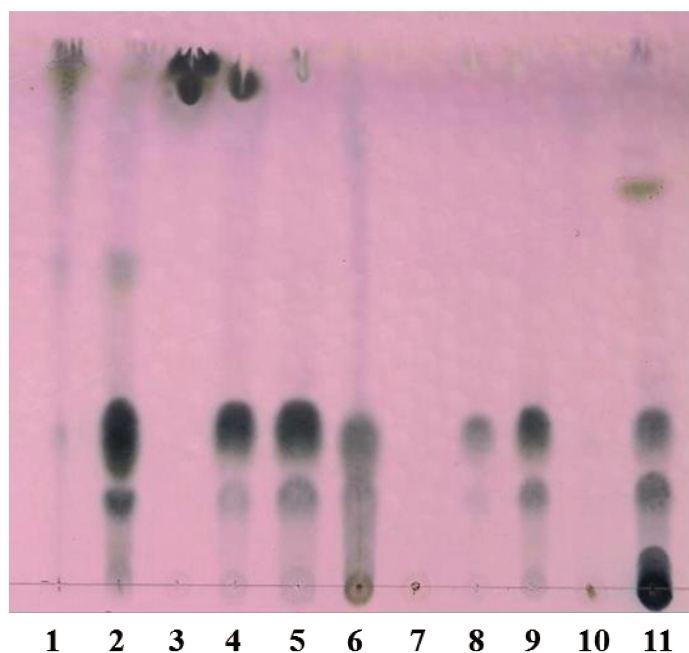


Figura E.10 Cromatograma (CCD) dos extratos de *Melia azedarach* (Corrida 3). 1: extrato acetato de etila fracionado (referência); 2: extrato metanólico fracionado (referência) 3: SCE – extrato supercrítico; 4: SCEE – extrato supercrítico com etanol como cossolvente; 5: EE – extrato etanólico; 6: HE: extrato hidroalcoólico; 7: resíduo final; 8: SCEE obtido durante despressurização da etapa 2; 9: EE obtido durante despressurização da etapa 3; 10: HE obtido durante despressurização da etapa 4; e 11: extrato metanólico bruto de *Pfaffia glomerata* (referência). Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

Apêndice F - Curvas Analíticas

Tabela F.1 Dados da curva analítica de Ácido Gálico.

Concentração de Ac. Gálico (mg.mL ⁻¹)	Absorbância		
	Curva 1	Curva 2	Média
0,03	0,118	0,106	0,112
0,06	0,312	0,271	0,292
0,09	0,433	0,342	0,388
0,12	0,554	0,475	0,510
0,15	0,725	0,606	0,664
0,18	0,882	0,703	0,793

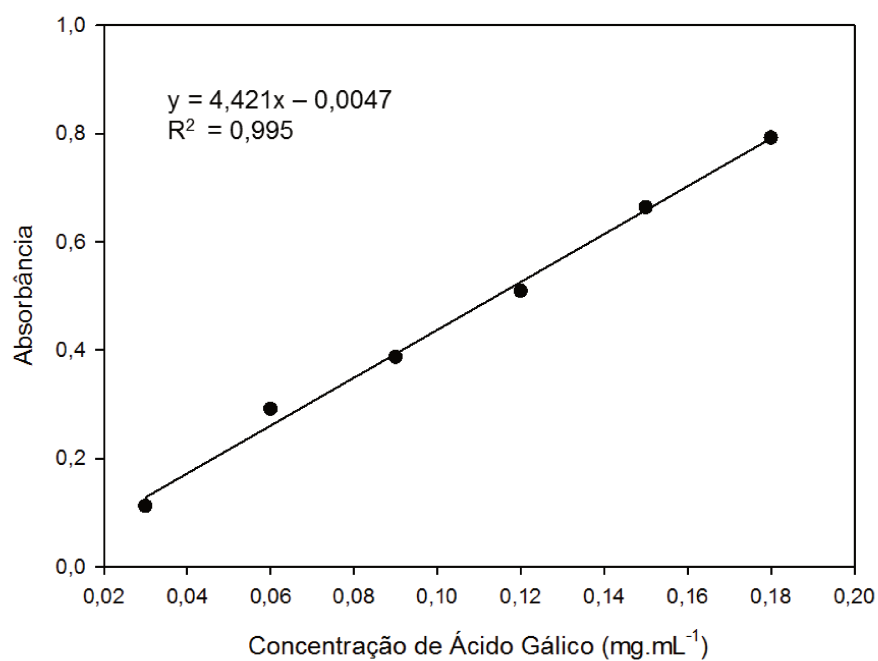


Figura F.1 Curva analítica de Ácido Gálico.

Tabela F.2 Dados da curva analítica de Catequina.

Concentração de Catequina (mg.mL ⁻¹)	Absorbância		
	Curva 1	Curva 2	Média
0,03	0,151	0,127	0,139
0,06	0,202	0,235	0,2195
0,09	0,353	0,302	0,328
0,12	0,408	0,358	0,383
0,15	0,504	0,499	0,502
0,18	0,589	0,581	0,585

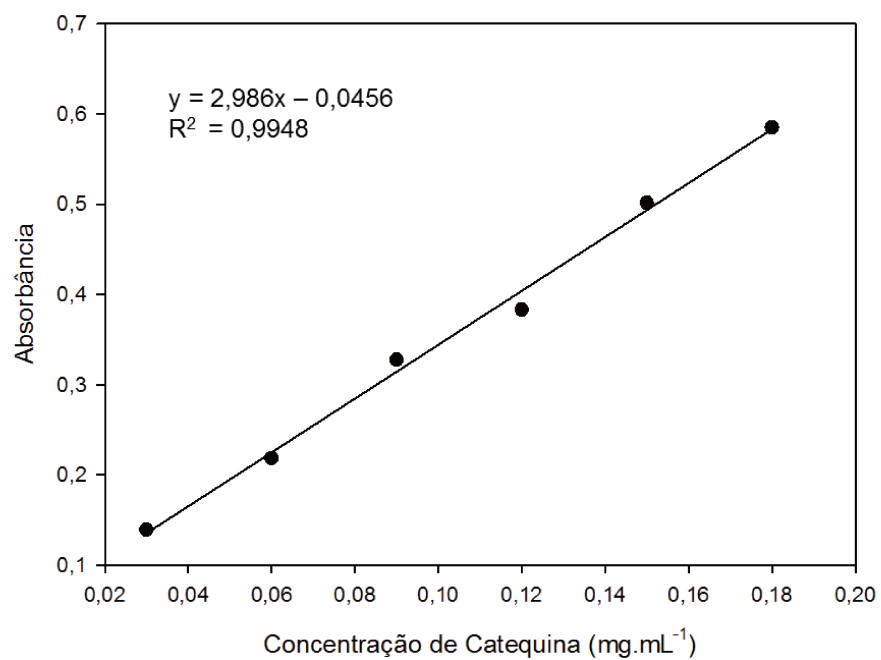
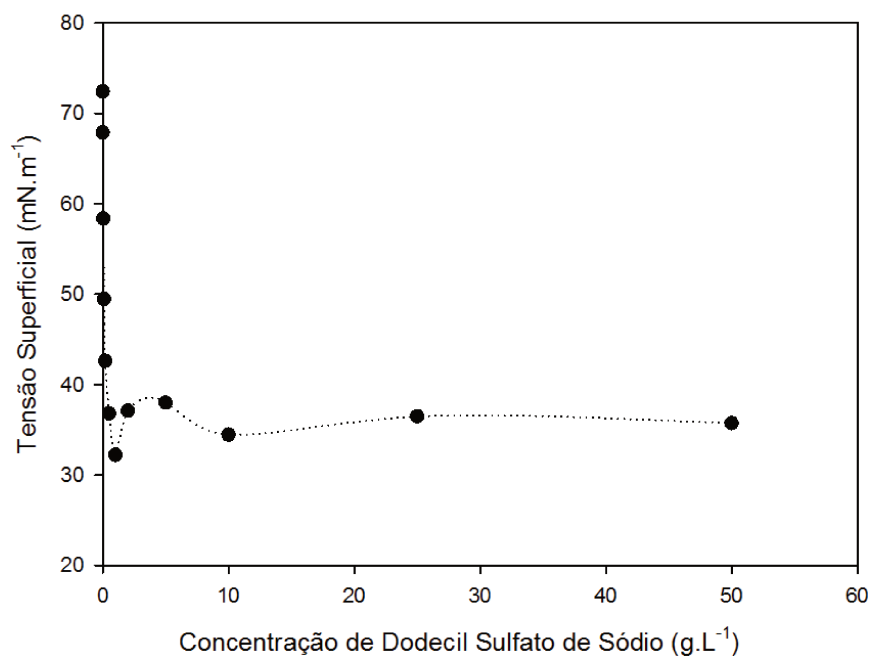
**Figura F.2** Curva analítica de Catequina.

Tabela F.3 Dados da curva analítica de Dodecil Sulfato de Sódio.

Concentração de DSS (mg.mL ⁻¹)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)			
	(1)	(2)	(3)	(Média)
0	72,5	72,8	71,9	72,4
0,01	67,5	67,8	68,3	67,9
0,05	59	58,5	57,5	58,4
0,1	49,4	49,2	49,6	49,4
0,2	43,7	41,1	42,8	42,6
0,5	36,5	37,4	36,0	36,8
1,0	31,9	32,2	32,5	32,5
2,0	37,2	37,0	*	37,1
5,0	38,1	37,8	38,1	38,0
10,0	33,7	34,7	34,9	34,4
25,0	36,1	36,5	36,8	36,5
50,0	35,6	35,7	35,8	35,7

**Figura F.3** Curva Analítica de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Apêndice G - Cromatogramas obtidos por CG-EM

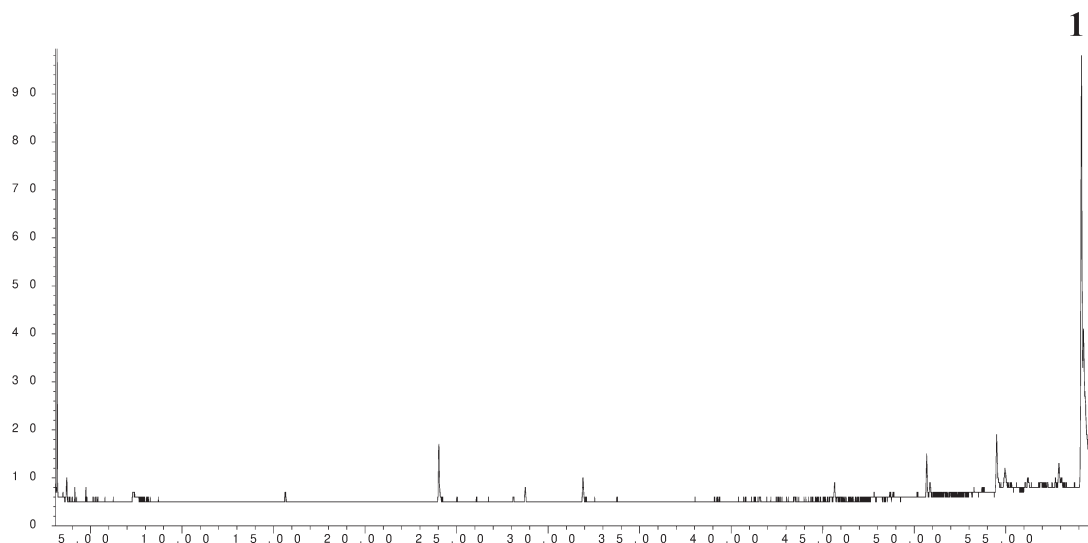


Figura G.1 Cromatograma da amostra retida no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de *Melia azedarach* utilizando método 1. O pico 1 ($t_r = 59,14$ min, $MM = 336$) corresponde ao pico 5 ($t_r = 28,28$ min, $MM = 336$) da Figura 5.19, identificado como um éster derivado do ácido linoleico.

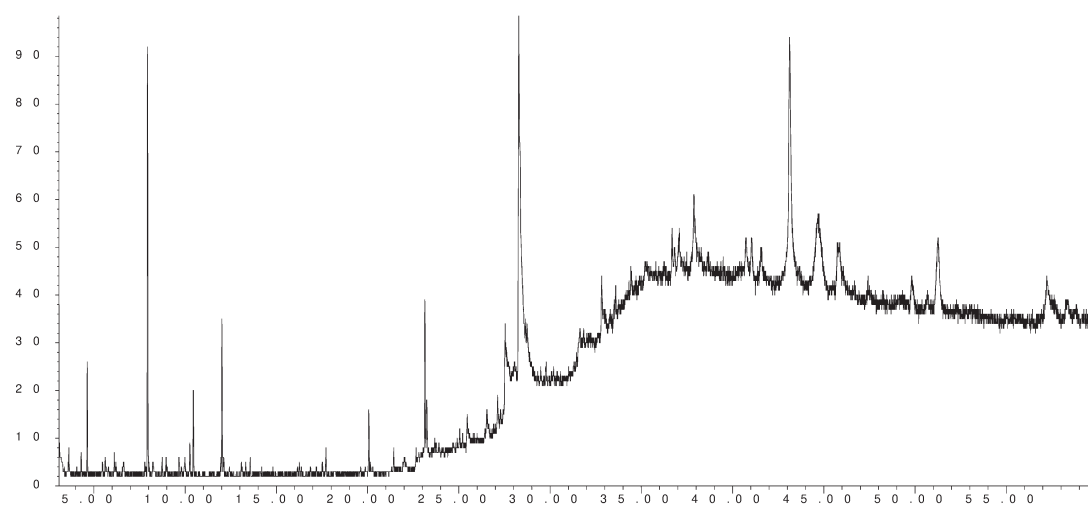


Figura G.2 Cromatograma da amostra retida no Porapak-Q (SCE-V) de frutos de *Melia azedarach* utilizando método 2.

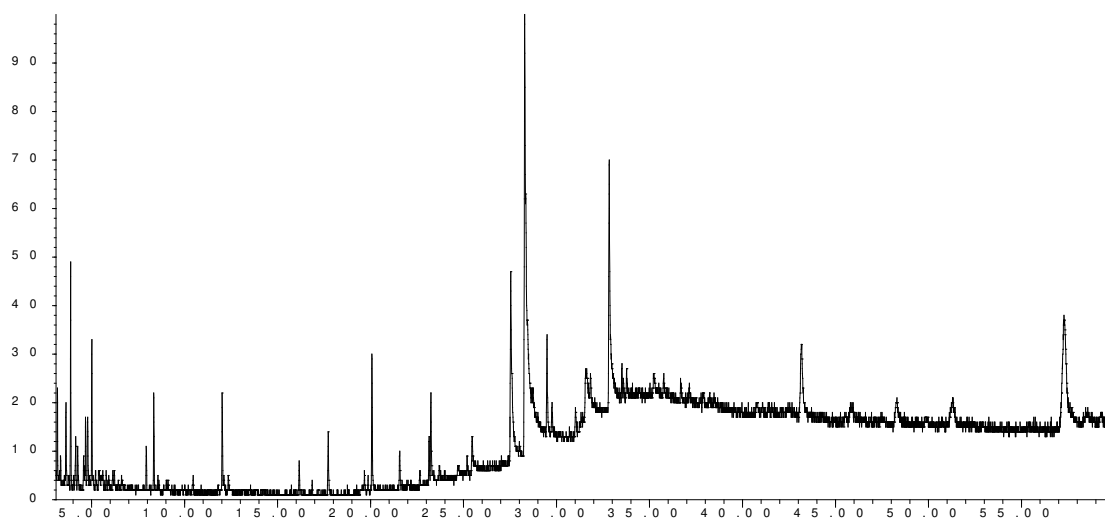


Figura G.3 Cromatograma do extrato supercrítico (SCE) de frutos de *Melia azedarach* utilizando método 2.

Apêndice H - Espectros de Massas

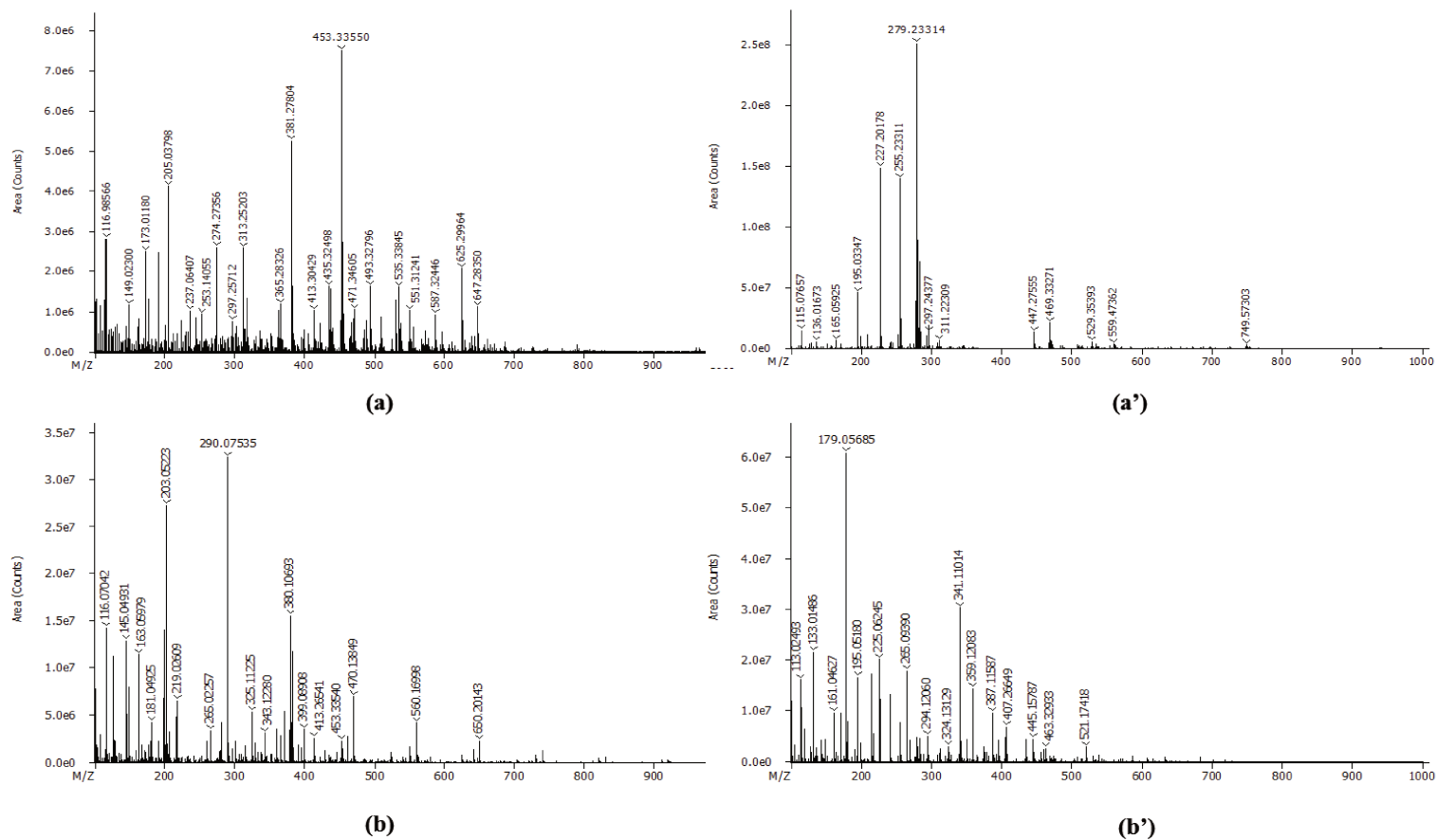
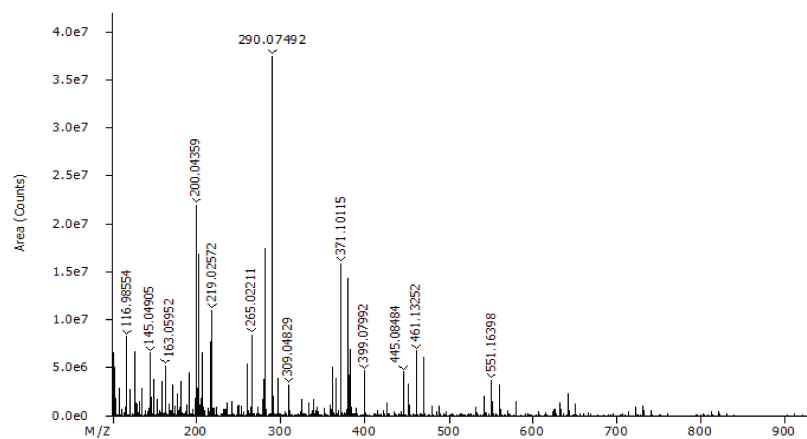
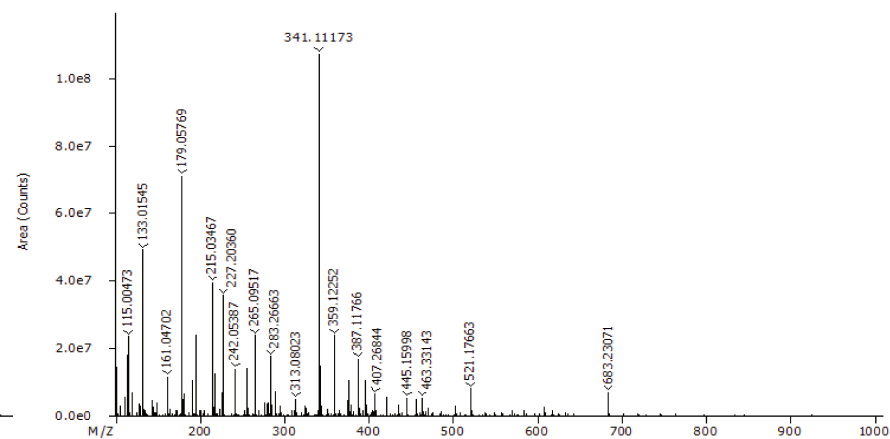


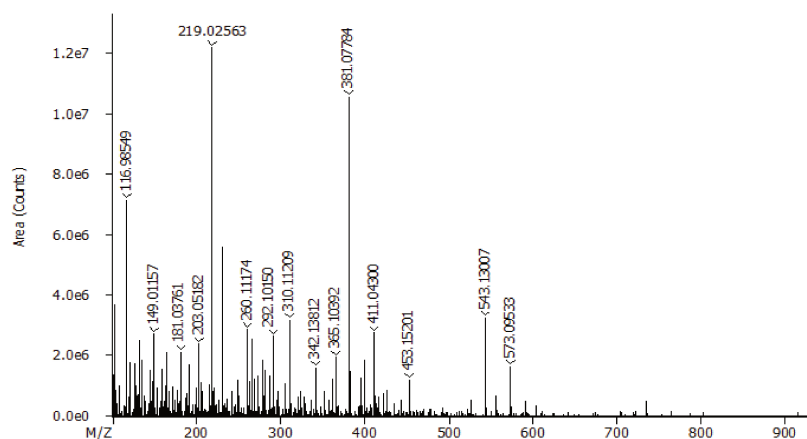
Figura H.1 Espectros de massas (ESI-MS) de extratos de *Melia azedarach*. Extrato supercrítico (SCE): ESI(+)-MS (a) e ESI(-)-MS (a'). Extrato supercrítico com etanol (SCEE): ESI(+)-MS (b) e ESI(-)-MS (b').



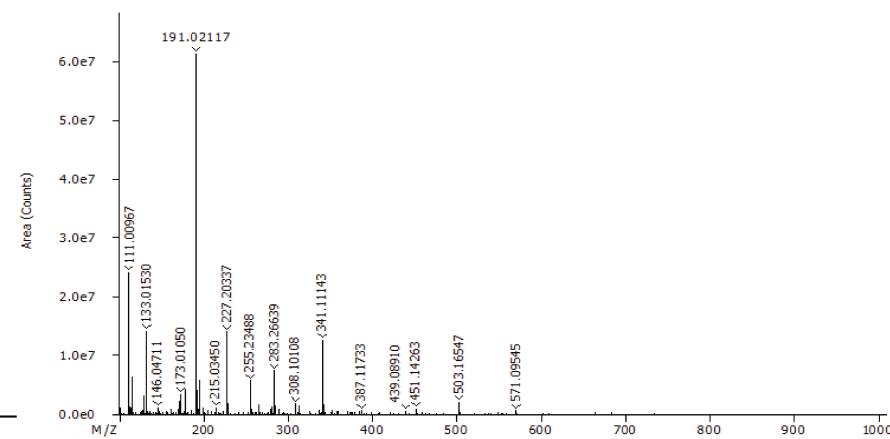
(c)



(c')



(d)



(d')

Figura H.2 Espectros de massas (ESI-MS) de extratos de *Melia azedarach*. Extrato etanólico (EE): ESI(+)-MS (c) e ESI(-)-MS (c'). Extrato hidroalcoólico (HE): ESI(+)-MS (d) e ESI(-)-MS (d').