



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS NATURAIS: COMBINAÇÃO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO, ETANOL E ÁGUA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Hugo Alexander Martínez Correa

Engenheiro Químico (Universidad Nacional de Colombia)

MSc. Engenharia Química (Universidad Nacional de Colombia)

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Orientador

Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães

Co-orientador

Campinas – SP, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M366c Martinez Correa, Hugo Alexander
Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água. / Hugo Alexander Martinez Correa. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Co-orientador: Pedro Melillo de Magalhães
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Extração supercrítica. 2. Compostos bioativos. 3. Atividade antioxidante. 4. *Baccharis dracunculifolia*. 5. *Eugenia uniflora*.
I. Cabral, Fernando Antonio. II. Magalhães, Pedro Melillo de. III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Título em inglês: Bioactive compounds from natural extracts: combination of extraction processes using supercritical carbon dioxide, ethanol and water.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Supercritical extraction, Bioactive compounds
Antioxidant activity, *Baccharis dracunculifolia*, *Eugenia uniflora*

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral
Maria Angela de Almeida Meireles
Carmen Lucia Queiroga
Christianne Elisabete da Costa Rodrigues
Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese: **Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água** defendida em 22 de junho de 2010 por Hugo Alexander Martinez Correa aprovado pela comissão julgadora em 22 de junho de 2010

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
(Orientador)

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
(Membro)

Dra. Carmen Lucia Queiroga
(Membro)

Profa. Dra. Christianne Elisabete da Costa Rodrigues
(Membro)

Prfa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro
(Membro)

Dra. Losiane Cristina Paviani Diehl
(Membro)

Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
(Membro)

Prf. Dr. Martin Aznar
(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tesis a mi esposa Margarita ,
por su apoyo en cada momento desta camino,
por su amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por fazer esta oportunidade tornar-se uma realidade.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral por sua valiosa orientação, apoio, ensinamentos e confiança depositada em mim a cada momento.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões que enriqueceram notavelmente este trabalho.

Aos técnicos de Extrae, Thomás, Camila e Sérgio, pela amizade e ajuda nas análises realizadas neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) pelos ensinamentos nesta etapa, nesta etapa da minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Fábio Costa, do Instituto de Biología, pela realização de testes de atividade antimalárica e a Dra. Carmen Lucia Quieroga do CPQBA pelos análises de cromatografia gasosa.

A Universidad Nacional de Colombia, por todo o aprendizado que me trouxe até aqui e agora como docente, pelo apoio nesta etapa.

Aos meus amados pais, Serafin e Margarita, por todo o amor e apoio. Seus exemplos me mostraram o caminho da vida acadêmica. Aos meus irmãos César e Andrea pelo apoio e compreensão.

Aos amigos do laboratório EXTRAE: Natalia, Caiçara, Mariana, Luis, Losiane, Helena, Simone, Helena, Klicia, Maitê, Irede, Rodrigo, Thiago, Andrea, Fábio, Cesar, Erika, Guilherme, Bruna e os professores Eduardo Batista e Antonio José Meirelles, pelo convívio e tanto momentos agradáveis durante minha estadia no Brasil.

A CAPES (programa PEC-PG) pela concessão da bolsa de doutorado, e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas e amigos da pós - DEA 2007, pela amizade e momentos de alegria.

A todos aqueles cuja amizade e convívio encheram de lembranças esta etapa de minha vida.

ÍNDICE GERAL

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</u>	<u>1</u>
1.1	OBJETIVOS	7
1.1.2	OBJETIVOS GERAIS	7
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
<u>2</u>	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>9</u>
2.1.	COMPOSTOS BIOATIVOS	11
2.2.1	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO QUE EMPREGAM SOLVENTES ORGÂNICOS	12
2.2.3	EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	16
2.3	REFERÊNCIAS	21
<u>3</u>	<u>COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA E DE EUGENIA UNIFLORA.</u>	<u>23</u>
3.1	INTRODUÇÃO	25
3.2	ANTIOXIDANTES	25
3.3	MATRIZES VEGETAIS	29
3.3.1	ALECRIM-DO-CAMPO (<i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i>)	29
3.3.2	PITANGA (<i>EUGENIA UNIFLORA L.</i>)	31
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.4.1	MATÉRIAS PRIMAS E REAGENTES	33
3.4.3	METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	38
3.4.4	ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS	46
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS	55
3.5.2	RENDIMENTO E CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	60
3.5.3	FENÓIS TOTAIS	66
3.5.5	TEOR DE ÁCIDO 3,5-DIPRENIL-4-HIDROXICINÂMICO (ARTEPILLIN C) NOS EXTRATOS DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	72
3.5.6	CARATERIZAÇÃO DA FRAÇÃO MAIS VOLÁTIL (CG-EM)	77
3.5.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	82
3.6	CONCLUSÕES	100
3.6	REFERÊNCIAS	102
<u>4</u>	<u>EXTRATOS COM POTENCIAL ANIPLASMODICO A PARTIR DA CURCUMA LONGA, ARTEMÍSIA ANNUA E BIDENS PILOSA</u>	<u>115</u>
4.1.	INTRODUÇÃO	117
4.2.	ANTIMALÁRICOS	117

4.3.	MATRIZES VEGETAIS	119
4.3.1	CÚRCUMA (<i>CURCUMA LONGA L.</i>)	119
4.3.2	ARTEMÍSIA (<i>ARTEMISIA ANNUA L.</i>)	120
4.3.3	BIDENS PILOSA L.	122
4.4.	MATERIAL E MÉTODOS	124
4.4.1	MATÉRIAS PRIMAS E REAGENTES	124
4.4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS MATÉRIAS PRIMAS	125
4.4.3	METODOLOGIA PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	125
4.4.4	ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS	126
4.4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	129
4.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
4.5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS	129
4.5.2	RENDIMENTO E CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	134
4.5.3	FENÓIS TOTAIS	140
4.5.4	FLAVONÓIDES TOTAIS	142
4.5.5	TEOR DE CURCUMINA E ARTEMISININA	143
4.5.6	CARATERIZAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM COMPOSTOS VOLÁTEIS (CROMATOGRAFIA GASOSA)	146
4.5.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	148
4.5.8	ATIVIDADE ANTIMALÁRICA	154
4.6.	CONCLUSÕES	157
4.7.	REFERÊNCIAS	157

5 SOLUBILIDADE DE SISTEMAS ORIUNDOS DE EXTRATOS NATURAIS EM SCCO₂: MEDIDAS EXPERIMENTAIS E MODELAGEM 165

5.1	INTRODUÇÃO	167
5.2	SOLUBILIDADE EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	168
5.3	EQUAÇÕES CÚBICAS DE ESTADO	169
5.4	MODELOS DE CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS (CG)	173
5.5	MODELOS EMPÍRICOS	177
5.6	SOLUBILIDADE DA ARTEMISININA EM sCCO ₂	180
5.6.1	RESULTADOS	181
5.7	SOLUBILIDADE EXPERIMENTAL DO ESQUALENO EM sCCO ₂	186
5.7.1	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE EXPERIMENTAL	187
5.7.2	MODELAGEM TERMODINÂMICA	188
5.7.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	188
5.8	CONCLUSÕES	204
5.9	REFERÊNCIAS	205

6. CONCLUSÕES GERAIS 211

7. APÊNDICES 215

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 – Propriedades físicas associadas a estados das substâncias.	17
Tabela 2. 2 – Propriedades críticas de solventes que podem ser utilizados na extração supercrítica.	18
 Tabela 3. 1- Substâncias antioxidantes presentes em plantas aromáticas e especiarias.	27
Tabela 3. 2 – Informações sobre as matrizes vegetais empregadas neste trabalho.	34
Tabela 3. 3 - Especificações técnicas do equipamento e instrumentação da unidade de extração supercrítica.	45
Tabela 3. 4 - Modelos de regressão empregados no cálculo de CE_{50}	52
Tabela 3. 5 - Resultados caracterização das matérias primas.	55
Tabela 3. 6 - Concentração e rendimentos de extração de fenólicos e Artepilin C em extratos de <i>B. dracunculifolia</i>	61
Tabela 3. 7 - Rendimentos de extração de <i>E. uniflora</i> nos diferentes processos estudados	63
Tabela 3. 8 - Composição da fração rica em compostos voláteis de <i>B. dracunculifolia</i> (AM1 e AM2).	79
Tabela 3. 9 - Composição da fração rica em compostos voláteis da <i>E. uniflora</i>	81
Tabela 3. 10 - Valores do CE_{50} para os extratos de <i>B. dracunculifolia</i> (AM1) com os diferentes modelos de regressão.	85
Tabela 3. 11 - . Valores do CE_{50} para os extratos de <i>B. dracunculifolia</i> (AM2) com os diferentes modelos de regressão.	85
Tabela 3. 12 - . Valores do CE_{50} para os extratos de <i>E. uniflora</i> com os diferentes modelos de regressão.	86
Tabela 3. 13 - Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para os diferentes extratos.	91
Tabela 3. 14 - Atividade antioxidante (%) para os diferentes extratos pelo método DBC (t=120 min).	98
 Tabela 4. 1 - Detalhes das matrizes vegetais empregadas neste trabalho.	125
Tabela 4. 2 - Resultados caracterização das matérias primas.	131
Tabela 4. 3 - Concentração de fenólicos e respectivos rendimentos de extração em extratos de <i>C. longa</i> , <i>A. annua</i> e <i>B. pilosa</i>	135
Tabela 4. 4 - Caracterização química fração volátil de <i>C. longa</i> L.	147
Tabela 4. 5 - caracterização química fração volátil de <i>A. annua</i>	148
Tabela 4. 6 - Valores do CE_{50} para os extratos de <i>C. longa</i> L. para os diferentes modelos de regressão.	150
Tabela 4. 7 - Comparação da atividade antimalárica em extratos de <i>B. pilosa</i>	155
 Tabela 5. 1 - Propriedades físicas	180
Tabela 5. 2 - Valores dos parâmetros dos diferentes modelos empíricos.	182
Tabela 5. 3 - Solubilidade de esqualeno no scCO_2	189
Tabela 5. 4 - Parâmetros para esqualeno.....	191
Tabela 5. 5 - Propriedades críticas do dióxido de carbono e esqualeno	192
Tabela 5. 6 - Parâmetros usados.....	195
Tabela 5. 7 - Propriedades do esqualeno	198

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Processos de extração por arraste de vapor.....	15
Figura 2.2 – Diagrama de fases de um composto puro.	16
Figura 2.3 – Densidade do CO ₂	19
Figura 2.4 – Diagrama esquemático do sistema de extração supercrítica.....	20
 Figura 3. 1 – Fotos das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> (a) e <i>E. uniflora</i> (b).	34
Figura 3. 2 - Processo de extração em etapa única.....	39
Figura 3. 3 - Processo de extração em duas etapas.	39
Figura 3. 4 – Fluxograma de obtenção e avaliação dos extratos	41
Figura 3. 5 - Obtenção dos extratos etanólicos a baixa pressão.	42
Figura 3. 6 - Fluxograma para a obtenção dos extratos aquosos.	43
Figura 3. 7 - Esquema representativo do equipamento para a extração em leito fixo.	44
Figura 3. 8 - Reação de sequestro do radical livre (método do DPPH').	50
Figura 3. 9 - Fotografias 8 bit das matrizes vegetais.	57
Figura 3. 10 - Microestrutura das matrizes vegetais (x 500).	59
Figura 3. 11 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração da <i>B. dracunculifolia</i>	62
Figura 3. 12 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração <i>E. uniflora</i>	63
Figura 3. 13 - Rendimentos e cinéticas de extração com CO ₂ supercrítico da <i>B. dracunculifolia</i>	65
Figura 3. 14 - Cinética e rendimentos na extração com CO ₂ supercrítico da <i>E. uniflora</i>	66
Figura 3. 15 - Conteúdo de fenóis totais.	67
Figura 3. 16 - Rendimento de extração de fenóis totais.	69
Figura 3. 17 - Conteúdo de flavonóides totais.....	71
Figura 3. 18 - Rendimento de extração de flavonóides totais.....	72
Figura 3. 19 - Extração de Artepillin C nas amostras de <i>B. dracunculifolia</i>	73
Figura 3. 20 - HPLC-FR dos extratos obtidos para amostra AM1.	75
Figura 3. 21 – HPLC-FR dos extratos obtidos para amostra AM2.....	76
Figura 3. 22 - Rendimento de extração de Artepilin C.....	77
Figura 3. 23 - Atividade de sequestro do radical DPPH nos extratos.....	83
Figura 3. 24 - Atividade antioxidante do extratos de <i>B. dracunculifolia</i>	88
Figura 3. 25 - Valores de CE ₅₀ pra os extratos..	92
Figura 3. 26 - Atividade antioxidante pelo método DBC.....	97
 Figura 4. 1 - Estrutura da Curcumina.....	120
Figura 4. 2 - Estrutura química da Artemisinina.	122
Figura 4. 3 – Fotos dos rizomas de <i>C. longa</i> (a), folhas de <i>A. annua</i> (b) e raízes de <i>B. pilosa</i> (c).	124
Figura 4. 4 - Fotografias 8 bit das matrizes vegetais após o processamento digital.....	131
Figura 4. 5 - Microestrutura das matrizes vegetais (x 1000).	133
Figura 4. 6 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração . (a) <i>C. longa</i> L., (b). <i>A. annua</i>	136
Figura 4. 7 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração de <i>B pilosa</i>	137

Figura 4. 8 - Rendimentos na extração com CO ₂ supercrítico. (a) <i>C. longa</i> L. (b) <i>A. annua</i>	138
Figura 4. 9 - Rendimentos na extração da <i>B. pilosa</i>	140
Figura 4. 10 - Teor de compostos fenólicos totais (FT).....	141
Figura 4. 11 - Rendimento de extração de compostos fenólicos totais.....	141
Figura 4. 12 - Teor de flavonóides totais.....	142
Figura 4. 13 - Rendimento de extração de flavonóides totais.	143
Figura 4. 14 - Concentração e rendimento de extração. (a) Curcumina, (b) Artemisinina.....	145
Figura 4. 15 - Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos de <i>C. longa</i> L.....	149
Figura 4. 16 - Atividade antioxidante de extratos de <i>C. longa</i> L. (valores de CE ₅₀).....	151
Figura 4. 17 - Atividade antioxidante de extratos de <i>C. longa</i> L. pelo método DBC.....	153
Figura 4. 18 - Atividade antioxidante método DBC (AA ₁₂₀) em extratos de <i>C. longa</i>	154
Figura 4. 19 - Atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> de extratos de <i>B. pilosa</i>	156
Figura 5. 1 - Solubilidade do colesterol em scCO ₂ (YUN, et al. 1991).....	168
Figura 5. 2 - Superfície representativa da solubilidade experimental da artemisinina em scCO ₂	181
Figura 5. 3 - Solubilidade da Artemisinina em scCO ₂ : dados experimentais e predições com o modelo PR-EOS.....	182
Figura 5. 4 - Correlação da solubilidade da Artemisinina em SC- CO ₂ com modelos empiricos. ..	184
Figura 5. 5 - Correlação da solubilidade da Artemisinina em SC- CO ₂ com modelos empiricos...185	185
Figura 5. 6 - Estrutura molecular do esqualeno.....	186
Figura 5. 7 - Sistema experimental para medida de solubilidade do esqualeno.	187
Figura 5. 8 - Solubilidade experimental do esqualeno em scCO ₂	190
Figura 5. 9 - Ajuste de dados experimentais à equação de Chrastil da solubilidade de esqualeno em scCO ₂	190
Figura 5. 10 - Solubilidade do esqualeno no scCO ₂ , dados experimentais e ajustados pelo modelo PR.....	194
Figura 5. 11 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros I.	196
Figura 5. 12 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajustes pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros II.	196
Figura 5. 13 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros III.	197
Figura 5. 14 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para os diferentes conjuntos de propriedades.	197
Figura 5. 15 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros IV.	199
Figura 5. 16 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros V.	199
Figura 5. 17 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VI.	200
Figura 5. 16 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VII.	200
Figura 5. 19 - Solubilidade do equaleno no scCO ₂ , dados experimentais e auste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VIII.	201

Figura 5. 20 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para os diferentes conjuntos de propriedades.	201
Figura 5. 21 - Dependência da solubilidade do equaleno no scCO ₂ a diferentes valores do diâmetro crítico (<i>dc</i>).	203
Figura 5. 22 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para diferentes valores de <i>dc</i>	203

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	-	Extrato aquoso
AA	-	Atividade antioxidante (%)
AA ₁₂₀	-	Atividade antioxidante a 120 minutos no teste DBC (%)
AARD	-	Desvio relativo médio (%)
b.s.	-	Base seca
b.u	-	Base úmida
CE ₅₀	-	Concentração eficiente que elimina 50% dos radicais livres
DHCA	-	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepilin C)
d _{mg}	-	Diâmetro médio geométrico das partículas sólidas
DBC	-	Teste descoloração β-caroteno
DPPH	-	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
E		Extrato etanólico
EFS	-	Extração com fluídos supercríticos
EOS	-	Equação de Estado
EUA	-	Estados Unidos da América
FS	-	Fluído supercrítico
GC	-	Cromatografia Gasosa
GC EOS	-	<i>Group Contribution Equation of State</i> (Equação de Estado por Contribuição de Grupos)
GRAS	-	<i>Generally Recognized As Safe</i> (geralmente reconhecido como Seguro)
HPLC	-	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
PHCA	-	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico

PHCT	-	<i>Perturbed Hard Chain Theory</i> (Teoria da cadeia rígida perturbada)
PHSC	-	Perturbed Hard Sphere Chain (Cadeia da esfera rígida perturbada)
PR	-	Peng-Robinson
$R_{1,mp}$	-	Rendimento global de extração da etapa nos processos SC, A, E.
$R_{2,mp}$	-	Rendimento global de extração da etapa nos processos SCE e SCA
RSME	-	Raiz quadrada do erro médio
SC	-	Extrato supercrítico
SC+SCA	-	Extração supercrítica + extração aquosa
SC+SCE	-	Extração supercrítica + extração alcoólica
SCA	-	Extrato aquoso com prévia extração supercrítica
scCO ₂	-	Dióxido de carbono supercrítico
SCE	-	Extrato alcoólico com prévia extração supercrítica
SFE	-	Supercritical Fluid Extraction (Extração com fluídos Supercríticos)
SRK	-	Soave- Redlich- Kwong
t_r	-	Tempo de retenção (min)
U	-	Teor de umidade (%)
VU	-	Teor de voláteis + umidade (%)
WHO	-	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	-	Porosidade do leito de partículas
ϕ	-	Esfericidade das partículas
ρ_a	-	Densidade aparente (g/mL)
ρ_r	-	Densidade real (g/mL)
τ	-	Tortuosidade do leito de partículas
ω	-	Fator acêntrico
k	-	Constante de Boltzmann
P_c	-	Pressão crítica
R	-	Constante universal dos gases
T_b	-	Temperatura de ebulição normal
T_c	-	Temperatura crítica
T_R	-	Temperatura reduzida
S	-	Solubilidade (g soluto/ L)
$\bar{Y}$	-	Solubilidade (g soluto/g CO ₂)
y_2	-	Solubilidade (fração molar)
Z	-	Fator de compressibilidade

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Hugo Alexander Martinez Correa

TITULO: COMPOSTOS BIOATIVOS DE EXTRATOS NATURAIS: COMBINAÇÃO DE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO COM DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRITICO, ETANOL E ÁGUA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

CO-ORIENTADOR: Dr. Pedro Melillo de Magalhães – CPQBA- UNICAMP

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo a obtenção de extratos naturais por meio da combinação de processos de extração. Extratos foram obtidos a partir de extração em uma etapa ou em duas etapas; neste último caso a primeira etapa foi com CO₂ supercrítico (400 bar, 60 °C) e a segunda etapa, etanol (25 °C) ou água (60 °C). Foram empregadas as seguintes matrizes vegetais: *B. dracunculifolia*, *E. uniflora*, *C. longa* L. , *A. annua* e *B. pilosa*. Todos os extratos foram caracterizados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, de flavonóides totais e concentração de algumas substâncias alvo específicas: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA, artemisinina) em extratos da *B. dracunculifolia*, artemisinina em extratos de *A. annua* e curcumina em extratos de *C. longa* L. Foi determinada a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e descoloração de beta caroteno (DBC), e atividade antiplasmódica. O estudo foi complementado com a obtenção de dados experimentais de solubilidade de esqualeno em CO₂ supercrítico a 40, 50 e 60 °C nas pressões de 100, 200, 300 e 400 bar. Dados de solubilidade da artemisinina em CO₂ supercrítico reportados na literatura foram usados. Para este dois sistemas foi estudada a capacidade de equações de estado e modelos empíricos na descrição termodinâmica do seu comportamento.

A análise de resultados mostrou que a combinação de processos resulta em uma estratégia eficiente para obtenção de extratos com diferentes composições e funcionalidade. Nesse sentido, a influência da extração supercrítica como primeira etapa é dependente da matriz vegetal estudada e do solvente empregado na segunda etapa. Nas matrizes *B. dracunculifolia*, *B. pilosa* e *A. annua*, processos em etapa única com etanol permitem obter extratos mais concentrados em compostos da família dos flavonóides. O CO₂ supercrítico e etanol permitiram obter extratos mais concentrados em artemisinina (95,1 mg/g e 95,6 mg/g). Artepilin C foi extraído com maior eficiência com CO₂ supercrítico (17,26 mg/g e 26,40 mg/g para duas amostras da *B. dracunculifolia*). Para processo em duas etapas, a influência da extração com CO₂ supercrítico sobre a etapa posterior de extração etanólica foi positiva, obtendo-se extratos 1,6 vezes mais concentrados em curcumina a partir da *C. longa*, e em compostos fenólicos a partir da *B. dracunculifolia*, *C. longa*, *A. annua* e *B. pilosa*.

Os resultados para atividade antioxidante mostram que extratos etanólicos (E, SCE) apresentam alta atividade para extratos de *B. dracunculifolia*, *E. uniflora* e *C. longa*, tanto no método do DPPH, quanto no método de descolaração do β -caroteno (DBC). Em relação à atividade antiplasmódica, a extração etanólica em duas etapas, a partir de *B. pilosa*, permitiu obter extratos mais ativos dentre os estudados, com concentração inibitória (IC₅₀) igual a 126,3 μ g/mL.

A modelagem termodinâmica de dados de solubilidade de artemisina e esqualeno em scCO₂ mostrou que a equação cúbica de Peng-Robinson apresentou melhor descrição do comportamento termodinâmico em relação à equação GC EOS (equação de estado por contribuição de grupos). O modelo GC EOS, descreve parcialmente o comportamento experimental da solubilidade do esqualeno em dióxido de carbono supercrítico, resultando fortemente dependentes dos parâmetros dos compostos puros e dos métodos usados na predição dos mesmos.

Palavras-Chave: Extração supercrítica, *B. dracunculifolia*, *E.uniflora*, *C. longa*, *A. annua*, *B. pilosa*, Artepillin C, Artemisinina, Curcumina, Atividade antioxidante, Atividade antiplasmódica.

DOCTORAL THESIS

AUTHOR: Hugo Alexander Martinez Correa

TITLE: BIOACTIVE COMPOUNDS FROM NATURAL EXTRACTS: COMBINATION OF EXTRACTION PROCESSES USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE, ETHANOL AND WATER.

ADVISOR: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

CO-ADVISOR: Dr. Pedro Melillo de Magalhães – CPQBA- UNICAMP

ABSTRACT

This study aimed to obtain extracts by combination of extraction processes. These extracts were obtained from single extraction step or two steps, in the latter case the first step was with supercritical CO₂ (60 °C and 400 bar) and a second step, ethanol (25 °C) or water (60 °C). We used the following matrices plant *B. dracunculifolia*, *E. uniflora*, *C. longa* L. *A. annua* and *B. pilosa*. All extracts were analyzed for content of total phenolics, total flavonoids and concentration of specific target substances: 3.5-cinnamic acid-4-hydroxycinnamic (DHCA, artemillin C) in extracts of *B. dracunculifolia*, artemisinin in extracts of *A. annua* and curcumin in extracts of *C. longa* L. Functional properties were determined: antioxidant activity by DPPH and β-carotene bleaching (DRB) assays and antiparasitic activity. The study was complemented with the experimental determination of squalene solubility in supercritical CO₂ at 40, 50 and 60 °C at pressures of 100, 200, 300 and 400 bar. Data solubility of artemisinin in supercritical CO₂ reported in the literature were used. For these two systems we studied the ability of equations of state and empirical models in the thermodynamic description of their behavior.

The results showed that combination processes is an effective strategy to obtain extracts with different compositions and functionality. It was found that the influence of supercritical CO₂ extraction as a first extraction step varies with plant matrix and solvent used on the second step. For *B. dracunculifolia*, *B. pilosa* and *A. annua*, ethanolic one-step processes, produces more concentrated extracts on flavonoids compounds. The supercritical CO₂ and

ethanol on single step process allows to obtain more concentrated extracts on artemisinin (95.1 mg/g and 95.6 mg/g, respectively). Artepillin C was more efficiently extracted from *B. dracunculifolia* with supercritical CO₂ (17.26 mg/g and 26.40 mg/g for two samples of *B. dracunculifolia*). For two step process, positive influence of previous supercritical CO₂ extraction on the later ethanolic stage, producing extracts 1.6 times more concentrated on curcumin from *C. longa*, and phenolic compounds from *B. dracunculifolia*, *C. Longa*, *A. annua* and *B. pilosa*.

Results for antioxidant activity showed that ethanolic extracts (E, SCE) from *B. dracunculifolia*, *E. uniflora* and *C. longa*, had high activity on DPPH and β -carotene bleaching (DBC) assays. For antiplasmodial activity, ethanolics extracts from *B. pilosa* on two steps process were the most active among those studied, with inhibitory concentration (IC₅₀) equal to 126.3 mg / mL.

Thermodynamic modeling for artemisinin and squalene solubility in supercritical CO₂ showed best performance for Peng-Robinson equation in to describing thermodynamic behavior than GC EOS Equation (Group contribution Equation of State), which partially describes the behavior of squalene solubility. In all cases the results were found strongly dependent on the parameters of pure compounds and methods used to predict them.

Keywords: Supercritical extraction, *B. dracunculifolia*, *E.uniflora*, *C. Longa*, *A. annua*, *B. pilosa*, Artepillin C, Artemisinin, Curcumin, Antioxidant activity Antiplasmodial activity.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Atualmente, preocupados com a saúde, os consumidores buscam cada vez mais produtos naturais de melhor qualidade e livres de traços de solventes orgânicos. Por outro lado, como problemas ambientais decorrentes da liberação de resíduos industriais tóxicos ao meio ambiente são frequentes, a legislação que regula esses resíduos fica cada vez mais restritiva, pois acidentes envolvendo solventes tóxicos representam riscos para o meio ambiente e para a saúde humana. Este contexto tem criado demanda no setor produtivo por processos que possam minimizar o impacto ambiental, diminuindo ou eliminando totalmente a geração de resíduos tóxicos, tendo também direcionado o setor acadêmico a pesquisar processos alternativos que possam atender a essas novas demandas.

A água, o etanol e mais outros solventes orgânicos são os solventes tradicionalmente empregados na obtenção de extratos naturais. Processos de separação que empregam o dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) como substituto dos solventes orgânicos apresenta-se como uma das opções de destaque para se obter extratos naturais contendo substâncias bioativas. Quando aplicado a alimentos e fármacos, produzem extratos e resíduos limpos, tendo em vista que o CO_2 é inerte e não tóxico. No entanto como a extração com CO_2 supercrítico está restrita à extração de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade, os extratos etanólicos e aquosos continuam sendo interessantes, pois possuem polaridades diferentes à do scCO_2 e não existem restrições ao uso desses solventes.

Extratos contendo substâncias com potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, cicatrizante, anestésico, antitripanossomal, anticariogênico, antiviral, anticarcinogênico, antimalárico estão sendo usados pelas indústrias farmacêuticas como substitutos de produtos sintéticos e pelas indústrias de alimentos na forma de alimentos funcionais. Os antioxidantes naturais são de grande interesse, pois além de serem uma alternativa como substitutos de antioxidantes sintéticos, a ação inibitória sobre os radicais livres está relacionada com efeitos benéficos à saúde, apresentando papel importante dentro do contexto dos alimentos funcionais. A atividade antioxidante tem sido atribuída a vários

constituintes de alimentos, como vitamina C, tocoferóis, esqualeno, carotenóides, antocianinas, e especialmente compostos fenólicos.

Nos extratos, a presença de compostos de interesse vai depender da natureza do solvente usado e da natureza dos compostos de interesse quanto ao seu grau de polaridade e massa molar. Os extratos ora são extraídos com água, ora com álcool etílico ou ainda com outros solventes orgânicos de diferentes polaridades. O dióxido de carbono, que é apolar, pode ser empregado como solvente ou como anti-solvente em processos de separações físicas. Muitas vezes este solvente pode ser interessante para concentrar componentes que são pouco solúveis em CO₂, como exemplo, retirar componentes lipossolúveis presentes em extratos etanólicos, concentrando os componentes polares, ou ainda usar a tecnologia supercrítica como pré-tratamento da matriz sólida. Outra grande vantagem do CO₂ como solvente é que ele é facilmente separado dos extratos, já que é um gás nas condições normais de temperatura e pressão.

Pretendeu-se, neste trabalho, obter extratos naturais de cinco plantas empregando os seguintes solventes do tipo GRAS (Generally Recognized As Safe): o dióxido de carbono supercrítico, o etanol e a água. No caso da extração com dióxido de carbono supercrítico, a extração foi combinada com a extração convencional, obtendo-se primeiro o extrato supercrítico e do seu resíduo obteve-se o extrato etanólico ou o aquoso. Nos extratos mediu-se o teor de fenóis e de flavonóides totais e de atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazila) e pelo método de descoloração do β -caroteno. Outras medidas foram especificadas para cada extrato. A seleção das espécies vegetais obedeceu à disponibilidade de algumas informações prévias referentes a etapa de extração supercrítica, assim foram obtidos extratos de duas amostras de folhas de alecrim-do-campo, de uma amostra de folhas de pitanga, de uma amostra de folhas de Artemisia, de uma amostra de rizomas de cúrcuma e de uma amostra de raízes de picão preto.

O principal objetivo das extrações de folhas de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) foi o de obter extratos ricos em ácidos hidroxicinâmicos,

principalmente em ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (conhecido como Artepillin C). Neste caso os estudos já realizados por Piantino¹ (2008) indicaram que a extração de artepillin C de folhas de alecrim-do-campo com CO₂ supercrítico a 60 °C e 400 bar produz extratos com rendimento de extração duas vezes maior e concentração aproximadamente 4 vezes maior de artepillin C que no extrato etanólico. Para este caso selecionou-se uma planta (um acesso) com teor de artepillin C superior à amostra já estudada por Piantino (2008), de onde se coletou também dois tipos de amostras, uma contendo todas as folhas e outra só das folhas mais jovens. Neste caso estudou-se também uma extração fracionada para verificar o comportamento da extração do artepillin C.

No caso dos extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), Peixoto² (2008) mostrou que a extração alcoólica produz extratos com elevada atividade antioxidante e a extração supercrítica produz extratos de baixa atividade antioxidante (método DPPH). Assim é possível que uma extração supercrítica seguida de uma extração com etanol produza dois extratos diferenciados, um extrato supercrítico contendo os óleos voláteis e um segundo extrato etanólico bem mais concentrado em substâncias antioxidantes que o extrato etanólico proveniente da extração convencional em etapa única..

No caso dos extratos de raízes de picão preto (*Bidens pilosa* L.), o objetivo foi estudar sua funcionalidade quanto à atividade antiplasmódica (antimalárica).

No estudo da extração supercrítica, grande esforço experimental é necessário para se determinar as condições operacionais ótimas de temperatura e pressão. Uma ferramenta muito útil para auxiliar na otimização do processo é a modelagem termodinâmica do equilíbrio de fases, porque pode-se calcular o equilíbrio de fases, podendo prever as melhores condições operacionais de temperatura e

¹ PIANTINO, C. R., **Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

² PEIXOTO, C. A., **Extração supercrítica de folhas de *Eugenia Uniflora* L.** 2008. 153p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

pressão. No entanto, na maioria dos sistemas constituídos por extratos naturais e CO₂ a pressões elevadas, a modelagem não se aplica devido à complexidade da mistura ou ainda pela não existência de dados de equilíbrio de sistemas binários envolvendo todos os componentes de interesse. Apenas alguns sistemas modelo envolvendo substâncias oriundas de produtos naturais estão disponíveis na literatura. Uma metodologia totalmente preditiva do equilíbrio, que usa por exemplo, o princípio de contribuição de grupos, é mais adequada quando não se tem dados experimentais de equilíbrio nem propriedades dos componentes que constituem o sistema. Skjold-Jørgensen propôs em 1984, com modificações em 1988, a equação GC-EOS (Group Contribution Equation of State, Equação de estado por contribuição de grupos) que é derivada da combinação de 4 princípios: 1) equação de estado de van der Waals, 2) expressão de Carnahan-Starling para a esfera rígida, 3) equação NRTL e 4) princípio de contribuição de grupos. Esta equação foi usada na predição de equilíbrio de sistemas supercríticos, tais como na desterpenação de óleo de laranja com fluido supercrítico (DIAZ³ et al., 2005), em misturas de óleos com fluidos supercríticos (ESPINOSA⁴ et al., 2002), solubilidade de quercitina em CO₂ e etanol (CHAFER⁵ et al., 2004) dentre outros.

O equilíbrio de fases e a influência das variáveis de processo na extração supercrítica transcrita em termos da variação da composição dos componentes de interesse foram avaliados a partir da modelagem termodinâmica preditiva do equilíbrio. Foram empregadas as equações: GC-EOS (equação de estado por contribuição de grupos), Peng-Robinson e diversos modelos empíricos. No

³ DIAZ, S., ESPINOSA, S., BRIGNOLE, E.A. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids Optimal process and solvent cycle design. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 49–61, 2005.

⁴ ESPINOSA, S, FORNARI, T., BOTTINI, S., BRIGNOLE, E.A.. Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 91–102, 2002.

⁵ CHAFER, A., FORNARI, T., BERNA, A., STATEVA, R. Solubility of quercitin in supercritical CO₂ + ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 32, p. 89-96, 2004.

entanto, devido à complexidade química dos extratos obtidos neste trabalho, escolheram-se sistemas binários, constituído por composto bioativo e scCO_2 .

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivos Gerais

- Obter extratos naturais usando primeiramente o CO_2 supercrítico, seguido do etanol ou da água como solventes, em etapa única ou em duas etapas. Medir o rendimento global, a atividade antioxidante, a concentração de alguns componentes ou classe de componentes de interesse e verificar a capacidade de equações na modelagem termodinâmica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter curvas de extração para a extração supercrítica de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), para folhas de Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), para folhas de Artemísia (*Artemisia annua* L.), para rizomas de Cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e para raízes de picão preto (*Bidens pilosa* L.), usando o dióxido de carbono a 400 bar e 60 °C. Obter o rendimento global de extração e medir nos extratos, a atividade antioxidante, a concentração de fenóis totais e a de flavonóides totais.
- Obter extratos etanólicos e aquosos a partir das matrizes vegetais de onde se obteve o extrato supercrítico. Medir o rendimento global de extração, atividade antioxidante, fenóis totais e flavonóides.
- Medir a concentração e rendimento de extração do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C) nos extratos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Neste caso fazer também uma extração fracionada com dióxido de carbono supercrítico.

- Medir o rendimento de voláteis no extrato supercrítico de folhas de pitanga, alecrim-do-campo, artemisia, picão pretoa, Cúrcuma.
- Aplicar teste biológico para medir atividade antiplasmódica nos extratos de picão preto (*Bidens pilosa*).
- Coletar e modelar dados de solubilidade em dióxido de carbono supercrítico de componentes oriundos de extratos naturais. Comparar com a predição de solubilidade empregando equações de estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são substâncias químicas sintetizadas de forma natural pelos diferentes organismos vivos, os quais produzem efeito biológico sobre outros organismos vivos. Esta atividade biológica pode ter efeito terapêutico para combater doenças e/ou produzir efeitos tóxicos em humanos e animais, podem produzir também como mecanismos de defesa para se proteger contra o meio ambiente, os chamados metabólitos secundários (COLEGATE e MOLYNEAUX, 2008). Os compostos bioativos de origem vegetal estão envolvidos em processos metabólicos das plantas e também na interação delas com o meio ambiente, as quais incluem: atração de insetos polinizadores ou dispersadores de sementes, proteção contra insetos ou animais herbívoros, proteção contra ação microbiana e proteção contra a radiação ultra-violeta do sol (DENNY e BUTTRISS, 2007).

Na atualidade existe grande interesse no emprego de compostos biologicamente ativos, oriundos de fontes naturais, para serem incorporados a formulações que permitam oferecer benefícios à saúde, seja na forma de alimentos funcionais, tais como produtos nutracêuticos, farmacêuticos, cosméticos ou como medicinais para o tratamento de diversas doenças (MORAES e COLLA, 2006). Clardy e Walsh (2004) afirmam que os produtos naturais são a maior fonte de inovação de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas), cânceres e imunomodulação; além disso, relatou-se a origem natural de muitas drogas em uso clínico atual (PATERSON e ANDERSON, 2005).

Estudos demonstraram melhoria da saúde e baixa incidência de doenças crônicas associadas ao consumo de vegetais, frutas e grãos, não somente pelos nutrientes tradicionais presentes, também pela ação dos compostos bioativos, os quais interferem em processos químicos e biológicos geradores de doenças (AJILA et al., 2007; Institute of Food Technologists –IFT, 2005).

2.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os extratos vegetais são preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, obtidas a partir de matrizes de origem biológico. Estes extratos são obtidos pelo contato da matriz vegetal com diferentes solventes como água ou solventes orgânicos. No caso da produção de óleos essenciais tem se empregado também processos como: destilação por arraste de vapor, hidrodestilação, *enfleurage*, solventes orgânicos e extração com dióxido de carbono supercrítico.

2.2.1 Processos de extração que empregam solventes orgânicos

Os solventes orgânicos empregados em processos de extração devem ser de baixo ponto de ebulição, tais como: metanol, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona ou hexano (SHI et al ,2007). Os extratos são oleoresinas, que geralmente são constituídas por óleos essenciais, resinas e ácidos graxos não voláteis (LEE e LEE, 2003). Geralmente os processos de extração com solventes orgânicos possuem baixa seletividade e os seus rendimentos de extração são maiores que os obtidos nos processos que empregam vapor de água ou dióxido de carbono supercrítico.

Os processos comumente empregados na extração de compostos bioativos de especiarias, sementes oleaginosas e de flores e raízes, são os processos tradicionais como a maceração, onde se faz um contato estático entre o solvente e a matriz vegetal, e a percolação, onde o solvente escoar através de um leito da matriz sólida. Nestes casos o contato é efetuado em um tempo pre-estabelecido, ao final do qual se obtém o extrato líquido. Em alguns casos o solvente é eliminado parcialmente por evaporação sob vácuo.

Na atualidade, o emprego de solventes orgânicos em processos de extração de ingredientes funcionais e nutracêuticos a partir de matrizes biológicas têm limitações ao seu uso devido aos problemas de saúde pública ambiental e de segurança. Estes solventes devem reunir requisitos legais estabelecidos pelos

órgãos governamentais dos diferentes países, os quais de forma geral são: alto grau de pureza, estabilidade química, inertes com os constituintes alimentícios, baixo ponto de ebulição, não apresentar efeitos tóxicos, e apresentar baixas concentrações no produto final (SHI et al., 2007).

2.2.2 Processos de extração que empregam vapor de água

O vapor de água tem sido usado principalmente na extração de óleos essenciais. Os óleos essenciais são misturas complexas de grande variedade de substâncias orgânicas com propriedades físico-químicas similares, principalmente hidrocarbonetos da família dos terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos) e também de compostos oxigenados (por exemplo: ésteres, aldeídos, cetonas, alcoóis, óxidos e ácidos orgânicos). Os óleos essenciais são constituídos por substâncias voláteis de massa molar ao redor de 300 g/mol e possuem propriedades distintas às dos óleos vegetais, que são constituídos de acilgliceróis de ácidos graxos. Os óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes partes das plantas medicinais e especiarias como: folhas, raízes, rizomas, flores, frutos e caule.

A indústria de óleos essenciais está direcionada basicamente para a produção de *flavor* e fragrâncias para seu emprego como ingredientes nas áreas farmacêutica, cosmética e de perfumaria, na elaboração de produtos de limpeza, de bebidas alcoólicas e não alcoólicas, e também como conservantes. Por existir variações no fornecimento de espécies vegetais e variações no rendimento de extração e no custo do processamento do óleo essencial, a indústria tem se auxiliado dos seus equivalentes sintéticos como alternativa aos óleos essenciais de origem natural.

2.2.2.1 Destilação por arraste à vapor

No método por arraste à vapor, emprega-se como solvente o vapor de água superaquecido (quando é produzido numa caldeira externa) ou saturado (quando é produzido no extrator). A extração inicia quando o vapor escoa através da matriz vegetal levando consigo os compostos bioativos de caráter volátil (Figura 2.1^a). O vapor junto com os volatilizados são condensados e decantados, resultando em duas fases líquidas insolúveis constituídas de hidrolato (água contendo pequena quantidade de substâncias) e óleo volátil. Durante o processo, alguns compostos podem ser volatilizados à atmosfera, e os de caráter termolábil transformados mediante reações de hidrólise e oxidação (MUKHOPADHYAY, 2000).

No caso da produção de vapor dentro do extrator, a água fica no fundo e a matriz vegetal fica na parte superior do extrator, separado por uma grade, assim a água é evaporada e o seu vapor entra em contato direto com a matriz vegetal (Figura 2.1b).

2.2.2.2 Destilação com água ou hidrodestilação

A destilação com água é chamada também de hidrodestilação (Figura 2.1c), onde a matriz vegetal é submersa neste solvente e depois de aquecida até ebulição se produz vapor de água, o qual arrasta os componentes voláteis. Este vapor é condensado e separado do hidrolato (água contendo pequenas quantidades de compostos hidrossolúveis) e óleo essencial (LEE e LEE, 2003). O processo de extração e separação do óleo essencial acontece de forma similar à destilação por arraste à vapor.

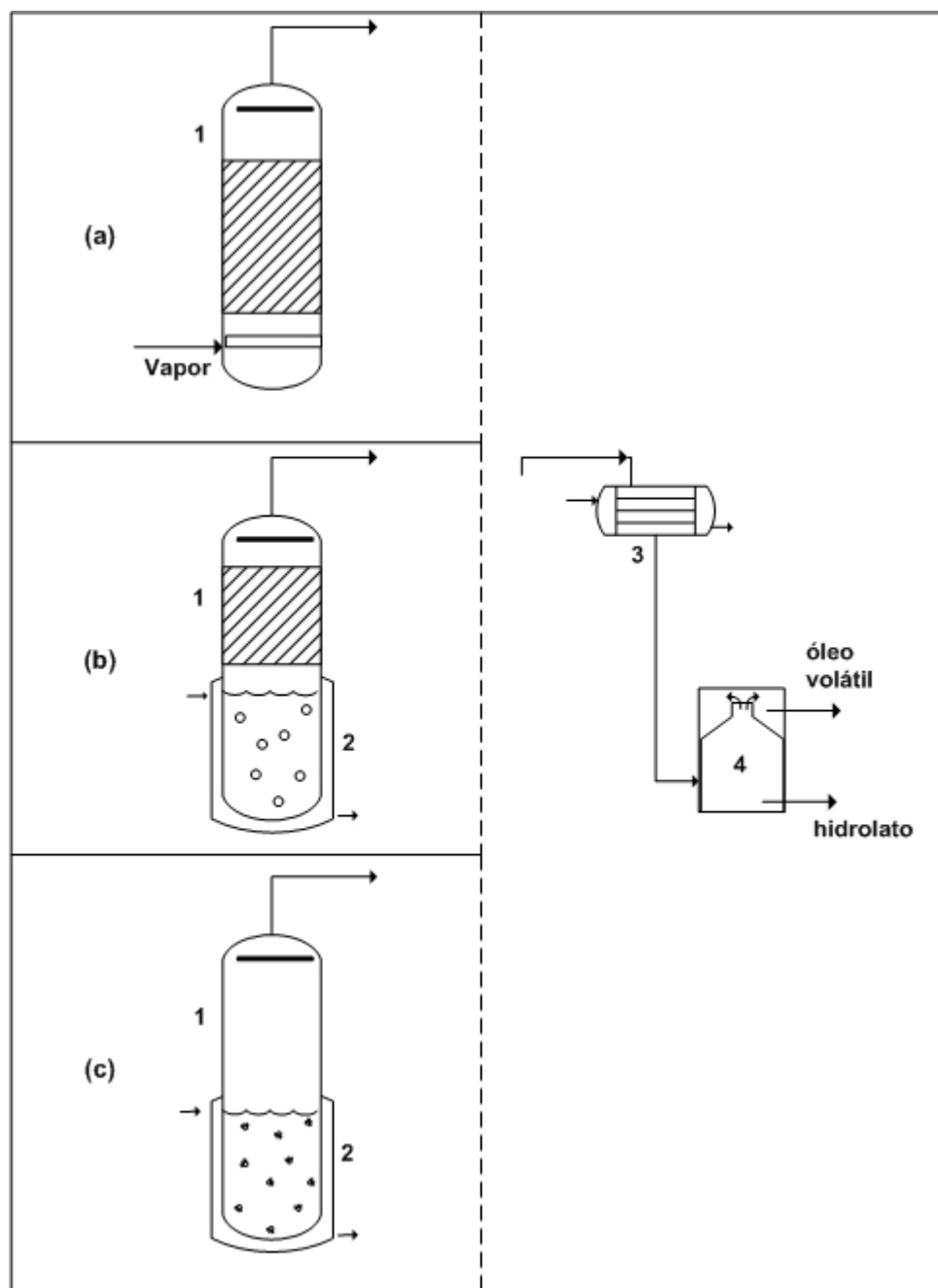


Figura 2.1 – Processos de extração por arraste de vapor.

(a) Vapor proveniente de fonte externa, **(b)** vapor gerado no interior do extrator, **(c)** Hidrodestilação. À direita observa-se o sistema de separação física do óleo volátil e hidrolato. (etapa comum aos processos (a), (b), (c)). Partes dos equipamentos: (1) extrator, (2) camisa de vapor, (3) condensador, (4) separador "florentino".

2.2.3 Extração com fluidos supercríticos

A tecnologia que emprega fluidos no estado supercrítico vem sendo utilizada comercialmente desde 1979, onde foi inicialmente usada em processos de extração de cafeína do chá e do café. Atualmente, devido aos resultados da pesquisa intensa na área, tem-se atingido um maior conhecimento do processo, permitindo otimizar as condições operacionais de pressão e temperatura, permitindo maior recuperação dos compostos de interesse presentes na matriz extrativa. Desde o século XIX foram relatados os primeiros experimentos feitos por Cagniard de La Tour em 1822 e mais tarde Thomas Andrews em 1869, nos quais descreveram as mudanças observadas quando um fluido puro atinge determinadas condições de pressão e temperatura (depois chamado ponto crítico). No ponto crítico a linha que divide o comportamento gasoso do líquido perde sua curvatura e finalmente desaparece quando superado o ponto crítico (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

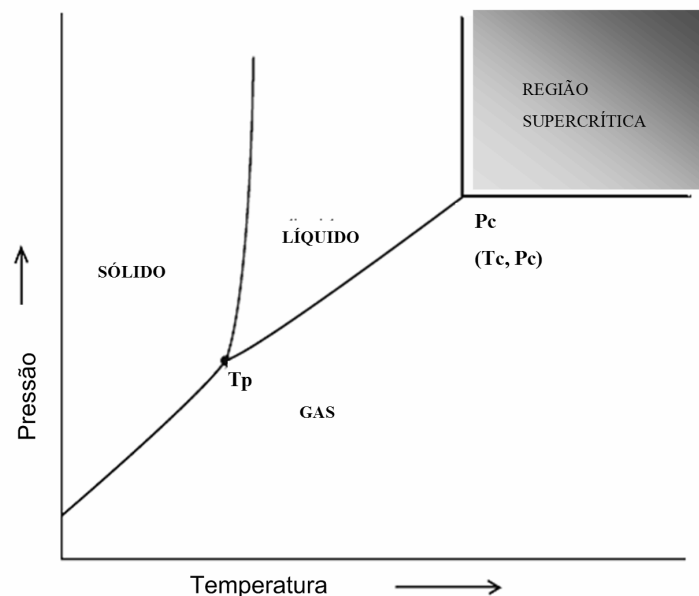


Figura 2.2 – Diagrama de fases de um composto puro. (adaptado de BRUNER, 1994)

O ponto de ebulição de uma substância pura é a temperatura na qual a pressão de vapor do líquido atinge o mesmo valor da pressão externa. Quando a pressão externa é aumentada continuamente observa-se que o ponto de ebulição aumenta simultaneamente gerando uma curva contínua que descreve este processo e mostra o equilíbrio entre a fase líquida e gasosa de uma substância pura, a qual chega até seu máximo, no ponto crítico (Figura 2.2). O ponto crítico é uma propriedade dos compostos puros, qualquer fluido na região acima do ponto crítico (região supercrítica) não é nem líquido nem gás, mas tem valores das propriedades termofísicas de ambos (BEVAN e MARSHALL, 1994).

As propriedades físico-químicas que exibe o fluido no estado supercrítico são de grande interesse industrial, pois são inúmeros os processos que podem ser melhorados quando emprega-se esta tecnologia: extração de compostos, reações de polimerização, formação de partículas, entre outras (Tabelas 2.1 e 2.2).

Tabela 2. 1 – Propriedades físicas associadas a estados das substâncias.

Propriedade	Líquido (1atm, 15-30 °C)	Supercrítico (T _c , P _c)	Gás (1atm, 15-30 °C)
Densidade (g/cm ³)	0,6-1,6	0,2 – 0,9	(0,6-2,0)*10 ⁻³
Viscosidade (g/ cms)	(0,2-3,0)*10 ⁻²	(1,0-9,0)*10 ⁻⁴	(1,0-3,0)*10 ⁻⁴
Coefficiente de difusividade (cm ² /s)	(0,2-2,0)*10 ⁻⁵	(0,2-0,7)*10 ⁻³	0,1-0,4

Adaptado de Rozzi e Singh (2002).

Tabela 2. 2 – Propriedades críticas de solventes que podem ser utilizados na extração supercrítica.

Substância	T _b (°C)	T _c (°C)	P _c (bar)	ρ _c (kg/L)
CO ₂	-78,9	31,3	73,8	0,448
NH ₃	-33,4	132,3	112,8	0,240
H ₂ O	100,0	374,4	227,8	0,344
N ₂ O	-89,0	36,2	72,4	0,457
Metanol	64,7	240,5	79,9	0,272
Etanol	78,4	243,4	64	0,276
Etano	-88,0	32,4	49,3	0,203
n-Propano	-44,5	96,8	43,0	0,220
n-Butano	-0,5	152,0	38,5	0,228
n-Pentano	36,3	196,6	34,3	0,232
n-Hexano	69	232,4	30,6	0,234

Fonte : Reid et al. (1987)

Dentre os processos mais estudados e empregados em escala comercial encontram-se a decafeinização do chá e café e a remoção da nicotina do tabaco, nas quais se aproveita o poder solvente dos fluídos supercríticos (REVERCHON e De MARCO, 2006). Em geral, nos processos que empregam fluídos supercríticos (FS), aproveita-se a forte dependência da densidade do FS (e conseqüentemente a capacidade solvente) com a pressão e a temperatura (Figura 2.3), e devido à relação existente com o poder solvente, as mudanças nestas duas variáveis de operação permitem modificar de forma extraordinária o grau de extração (rendimento) e separação de compostos ativos a partir da matriz (FOSTER et al., 2003).

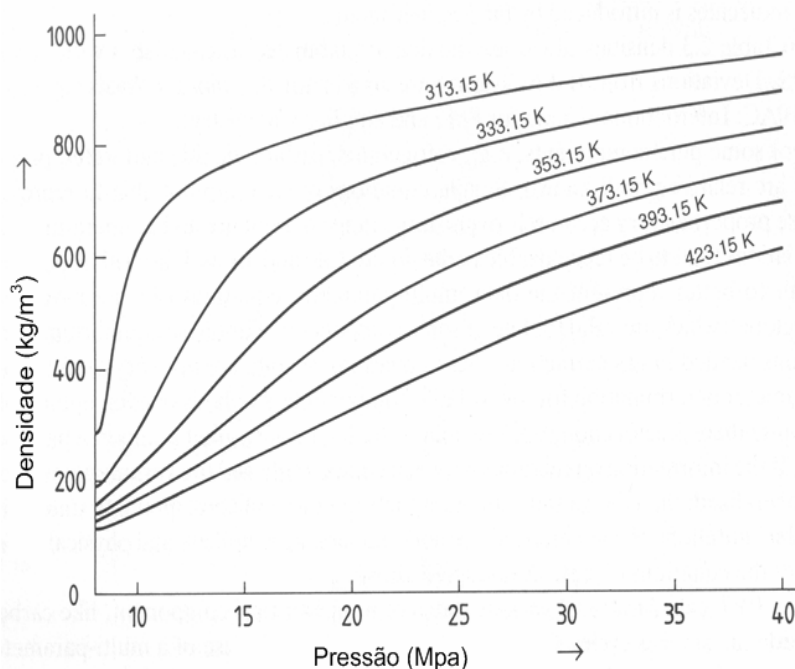


Figura 2.3 – Densidade do CO₂ (GUPTA e SHIM 2007).

Processos de extração que empregam fluidos no estado supercrítico (EFS) aproveitam a habilidade de algumas substâncias químicas de tornarem-se excelentes solventes em condições específicas de temperatura e pressão. O solvente mais empregado é o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), o qual é um solvente não tóxico e seguro (GRAS), não inflamável e de baixo custo. As extrações empregando fluidos supercríticos são mais convenientes, visto que não deixam resíduos no extrato nem na matriz vegetal após a extração (ROZZI e SINGH, 2002). As condições supercríticas do CO₂ permitem o emprego de baixas temperaturas, o que é conveniente para extração de substâncias termolábeis. Além disso, o scCO₂ apresenta alta compressibilidade, densidade semelhante aos líquidos, alta difusividade, baixa viscosidade e tensão superficial, propriedades que favorecem a penetração e transporte do fluido supercrítico na matriz vegetal quando comparado com processos convencionais (DUNFORD et al., 2003). Esta tecnologia é bem sucedida no caso de extração de compostos bioativos

(antioxidantes, óleos essenciais, carotenóides, flavonóides, etc.) a partir de grande diversidade de materiais biológicos como plantas, frutos e resíduos da atividade agroindustrial.

A Figura 2.4 representa o esquema de um processo típico de extração, onde o material (matriz) contendo o composto bioativo de interesse é depositado no extrator (3) pelo qual escoam continuamente o scCO_2 extraíndo os compostos de interesse. O processo compreende a compressão (1) e aquecimento do solvente (2) acima do seu ponto crítico, uma vez que o CO_2 atinge estas condições, inicia-se a extração e uma válvula redutora da pressão na saída do extrator (4) é acionada e assim o fluxo do scCO_2 que entra no extrator e solubiliza os compostos de interesse presentes na matriz. A corrente de saída do extrator contendo a mistura scCO_2 /composto bioativo é expandida por meio da válvula de expansão e conduzida ao separador (5). O separador opera em condição fixa de pressão, nesta condição o composto bioativo é precipitado (ou condensado) e separado do CO_2 o qual pode ser recuperado e recomprimido até a condição de operação no seguinte extrator (no caso de existir) ou estocado e reciclado.

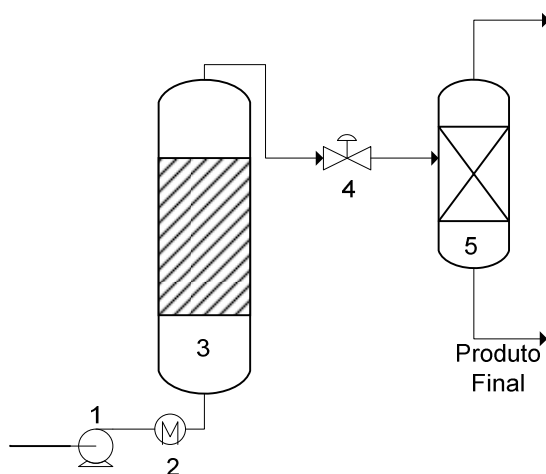


Figura 2.4 – Diagrama esquemático do sistema de extração supercrítica.

2.3 REFERÊNCIAS

- AJILA, C.M., NAIDU K.A., BHAT S.G., PRASADA RAO, U.J.S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982–988, 2007.
- BEVAN, C. D., MARSHALL, P. S. The Use of Supercritical Fluids in the Isolation of Natural Products. **NATURAL PRODUCT REPORTS**, 451-466, 1994.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluid and the application to separation process**. New York, USA: Steinkopff, Darmstadt Springer, New York, 1994, 387p.
- CLARDY, J., WALSH, C., Lessons from natural molecules. **Nature**, Dec. 16, 2004.
- COLEGATE, S.M., MOLYNEAUX, R.J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and structural Determination**. CRC Press, Boca Raton, USA, 2008.
- DENNY, A., BUTTRISS, J. Synthesis Report No 4: **Plants Foods And Health: Focus on plant bioactives**. British Nutrition Foundation. 2007. Disponível Em: <www Eurofir.Net>. Aseso em 3 Set. 2007.
- DUNFORD, N.T., KING, J.W., LIST, G.R. Supercritical fluid in food engineering, in: TZIA, C a LIADAKIS, G. **Extraction Optimization in Food Engineering**, cap. 3, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS – IFT. Functional Foods: Opportunities And Challenges. Washington, D.C, 2005. Disponível Em: <Www.lft.org>. Aseso Em 14 Ago. 2007.
- FOSTER, N., MAMMUCARI, R., DEGHANI, F., BARRETT, A., BEZANEHTAK, K., COEN, E., COMBES, G., MEURE, L., NG, A., REGTOP, H. L., TANDYA, A. . Processing Pharmaceutical Compounds Using Dense Gas Technology. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.42,p. 6476-6493, 2003.
- GUPTA, R. B., SHIM, J. J. **Solubility in Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press, USA, 2007.
- LEE, Y.W., LEE, Y.Y. Flavor and aroma substances. In: TZIA, C e LIADAKIS, G. **Extraction Optimization in Food Engineering**, Boca Raton, FL,, 2003.
- McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical fluid extraction: Principles and Practice**. Butterworth Stoncham: Boston, MA, 3 ed, 1994.
- MORAES, F. P., COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, n.2, p.109-122, 2006.
- MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. CRC Press, Boca Raton, 2000.
- PATERSON, I., ANDERSON, E.A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, n. 21, 2005.
- REVERCHON, E., De MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **J. of Supercritical Fluids**, v.38,p.146–166, 2006.

ROZZI, N.L., SINGH, R.K. Supercritical Fluids and the Food Industry. **Institute of Food Technologists**. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2002.

REID, R. PRAUSNITZ, J. M. POLING, B., **The Properties of Gases and Liquids**, 4th Edition, Mc Graw-Hill, New York, 1987.

SHI, J., KASSAMA L.S., KAKUDA, Y. In: **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. Shi, J. Taylor And Francis, CRC Press , Boca Raton, Fl, p. 371, 2007.

**3 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM
EXTRATOS DE *Baccharis dracunculifolia* E DE *Eugenia uniflora*.**

3.1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes são importantes tanto para alimentos quanto para sistemas biológicos. Na indústria, são usados para retardar processos de oxidação em óleos e gorduras, protegendo-os, pois os compostos formados durante a oxidação conferem aroma indesejável. No entanto, em sistemas biológicos, os antioxidantes são importantes na prevenção de doenças de organismos vivos (animais e vegetais), pois retardam a oxidação dos lipídeos e de outras biomoléculas, inibindo a iniciação e propagação da reação de oxidação em cadeia, a qual é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, prevenindo o desenvolvimento de doenças degenerativas e câncer (DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Os antioxidantes encontram-se dentro do grupo dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, que incluem carotenóides, flavonóides, ácidos cinâmicos, ácidos benzoicos, tocoferóis, tocotrienóis e outras substâncias (KRISHNAIAH et al., 2007).

3.2 ANTIOXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio ou radicais livres são intermediários associados a processos de envelhecimento, inflamações crônicas, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, arteriosclerose, carcinogênese e mutagênese (AJILA et al., 2007; de ANDRADE et al., 2007). Em geral, os antioxidantes provêm defesa primária ao corpo humano mediante a eliminação dos radicais livres, os quais interferem no metabolismo.

Dependendo da origem, pode-se classificar os antioxidantes em dois grupos principais: antioxidantes sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos têm sido empregados na indústria de alimentos processados, os mais conhecidos são: BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e TBHQ (terci-butil-hidroquinona), os quais em geral são produzidos a partir de produtos derivados do petróleo, e em grande escala, portanto mais baratos. Os antioxidantes naturais

são compostos presentes em frutas, vegetais, nozes, grãos, raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, sementes e talos de diferentes plantas e espécies (MUKHOPADHYAY, 2000).

Os antioxidantes naturais são principalmente compostos fenólicos ou polifenólicos, sendo que os mais comuns são os tocoferóis, flavonóides e compostos relacionados como cumarinas, derivados do ácido cinâmico e chalconas, diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos que estão presentes nos extratos de plantas e de frutos (OREOPOULOU, 2003).

No caso de antioxidantes sintéticos a regulamentação de diferentes países estabelece a máxima quantidade destas substâncias nos alimentos, sendo que em alguns casos o emprego de BHT, BHA e galatos não é permitido, como é o caso de alimentos para crianças na União Européia (MÍKOVÁ, 2002). Ajila et al. (2007) reportam que a presumível segurança, potencial nutricional e terapêutico dos antioxidantes de origem natural, são fatores pelos quais têm recebido atenção por parte da sociedade atual. Mukhopadhyay (2000) assinalou que a superioridade dos antioxidantes de origem natural sob os de origem sintética é devida a fatores como tolerância, segurança, atoxicidade e ausência de efeitos secundários, os quais contribuem para aumentar a preferência destes por parte dos consumidores. A Tabela 3.1 apresenta diferentes antioxidantes encontrados em algumas plantas aromáticas e medicinais.

Tabela 3. 1- Substâncias antioxidantes presentes em plantas aromáticas e especiarias.

Espécies	Substâncias	Referência
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ácido carnósico, carnosol, rosemanol, ácido rosmarínico, rosmaridifenol, rosmariquinona, 1,8-cineol (27,23%), α -pineno (19,43%), cânfora (14,26%), canfeno (11,52%) e β -pineno (6,71%).	Erkan et al., 2008 Wang et al., 2008 Viuda-Martos et al., 2007
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol, β -cariofileno, α -humuleno.	Viuda-Martos et al., 2007
<i>Curcuma domestica</i>	Curcuminóides	Ak e Gülçin, 2008 Jang et al., 2007
<i>Camelia sinensis</i>	Flavonóides: Galato epigallocatequina, epicatequina galato. Catequinas: (+)-catequina ©, (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina (GC), (-)-epicatequina galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epigallocatequina galato (EGCG)	Rusak et al., 2008 Gramza e Korczak, 2005
<i>Melissa officinalis</i>	Ácido cafeíco, ácido <i>m</i> -cumárico, eriodictiol-7-O-glucosídeo, naringina, hesperidina, ácido rosmarínico, naringenina.	Dastmalchi et al., 2008
<i>Oreganum vulgare L.</i>	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, derivados dos ácidos fenólicos, flavonóides, tocoférois	Viuda-Martos et al., 2007 Puertas-Mejía et al., 2002
<i>Thymus vulgaris L.</i>	terpinen-4-ol, γ -terpineno, cis sabineno hidrato, Timol, carvacrol, <i>p</i> -cumeno-2,3 diol, bifenilos, flavonóides	Viuda-Martos et al., 2007
<i>Peumus boldus</i>	Boldina ((S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina), Catequina	Del Valle et al., 2005 Quezada et al., 2004
<i>Lippia alba</i> , <i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Coriandrum sativum</i>	Verbascosido, isoverbascosidocalceolariosido, luteolina-7-diglucoronido, carvone, limoneno.	Hennebelle et al., 2008a Hennebelle et al., 2008b Yanishlieva et al., 2006

Tabela 3.1- continuação

Espécies	Substâncias	Referência
<i>Eucaliptus camaldulensis</i>	Pirogalol, 5-hidroximetil-2-furaldehído, ácido 4,4,6,6-tetrametil-3,5-dioxo-ciclohex-1-enercarboxílico, <i>p</i> -cimeno, γ -terpineno, α -pineno, 1-8 cineol, terpinen-4-ol, α -terpineol, carvacrol, timol, acetato de timol, timoquinona.	Kulkarni et al., 2008 Siramon e Ohtani, 2007
<i>Foeniculum vulgare</i>	Ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido clorogênico, eriocitrina, rutina, miquelianina, ácido rosmarínico.	Faudale et al., 2008
<i>Zingiber officinale</i>	5-[4-hydroxy-6-(4-hydroxyphenetil) tetrahydro-2 <i>H</i> -piran-2-il]-3-metoxibenzene-1,2-diol, 5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil) heptan-3-ona, 1,5-epoxi-3-hidroxi-1-(4,5-dihidroxi-3-metoxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil)heptano, 6-gingerol.	Tao et al., 2008 Kim et al., 2007
<i>Vitis vinifera</i>	Ácido caftárico, ácido coutárico, ácido fertárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico. Flavonóides: catequina, epicatequina, galato de epicatequina, resveratrol, rutina, quercitina.	Maier et al, 2009 Iacopini et al., 2008 Janisch et al., 2006
<i>Calendula officinalis</i>	Ácido caféico, ácido clorogênico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido vanílico, quercetin-3-O-glucuronide, canferol, quercitina, rutina.	Preethi et al 2006 Ćetković et al., 2004
<i>Tamarindus indica</i> L. (Sementes)	Epicatequina, catequina, procianidina B ₂ , luteolina, taxifolina, apigenina.	Sudjaroen et al., 2005

Os solventes empregados na extração de antioxidante de fontes vegetais de natureza fenólica e de alta massa molecular devem possuir alta polaridade, como por exemplo, metanol e etanol, os quais apresentam melhores rendimentos quando comparados com aqueles de natureza pouco polar (exemplo: hexano, éter etílico). No caso de compostos fenólicos de baixa massa molar o uso de solventes de baixa polaridade é recomendado (exemplo: acetato de etila). No caso de extração de compostos antioxidantes tais como tocoferóis os solventes como acetato de etila e hexana são mais adequados (OREOPOULOU, 2003).

Kitzberger et al. (2007) obtiveram extratos de shiitake (*Lentinula edodes*) com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (n-hexano, diclorometano, acetato de etila) e CO₂ supercrítico (scCO₂) com co-solvente. O rendimento global foi alto quando empregaram solventes de baixa polaridade, na ordem: n-hexano, scCO₂, diclorometano, acetato de etila. Entretanto na extração de compostos fenólicos a seguinte ordem apresentou melhores resultados: acetato de etila, diclorometano e scCO₂ + etanol, mostrando que a extração destes compostos é maior quando emprega-se solventes polares.

De Campos et al. (2008) estudaram comparativamente tecnologias de extração com diferentes solventes (n-hexano, diclorometano, butanol, acetato de etila e etanol) na extração de sementes de uva. Concluíram que o emprego de solventes orgânicos de alta polaridade consegue produzir extratos com maior quantidade de compostos fenólicos.

3.3 MATRIZES VEGETAIS

3.3.1 Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*)

O alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) pertence à família *Asteraceae*, com aproximadamente 500 espécies distribuídas no continente Americano, sendo 120 delas de ocorrência brasileira. A planta pode atingir de 2 a 3 m de altura e cresce naturalmente no sul e no sudeste do Brasil, no Uruguai, no Paraguai, na Argentina e na Bolívia (FRIZZO et al., 2008; LAGO et al., 2008)

Extratos das folhas têm sido empregados no tratamento de doenças gastrointestinais, hepáticas, tratamento de feridas, processos inflamatórios, além de posuir atividade antimicrobiana (da SILVA et al., 2008). Óleos essenciais também foram extraídos de suas folhas (CASSEL et al., 2000; WEYERSTAHL et al., 1996).

Alencar et al. (2005) e Park et al. (2004) comprovaram que esta espécie é a principal fonte vegetal usada pelas abelhas para produzir um tipo de própolis (própolis verde) nos estados de São Paulo e Minas Gerais. A própolis é rica em derivados fenólicos do ácido cinâmico e em flavonóides (FUNARI et al., 2006) aos quais deve sua atividade. Estes compostos são também encontrados na *B. dracunculifolia*. A própolis verde produzida no sudeste brasileiro possui propriedades antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, imunomodulatória, antitumoral e antiulcerogênica, pelas quais é considerada a própolis mais valorizada do mundo (SOUSA, 2007).

Um dos ácidos fenólicos de grande importância presente na *B. dracunculifolia* é o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), também conhecido como Artepilin C, o qual foi isolado a partir da própolis (LEE et al., 2007; HAYASHI et al., 1999). Têm sido demonstrada sua atividade anti-inflamatória (PAULINO et al., 2008), inibitória à peroxidação lipídica e ao desenvolvimento de câncer pulmonar em testes com camundongos e efeito antileucêmico (KIMOTO et al., 2001a, 2001b) e efeito preventivo do câncer de cólon (SHIMIZU et al., 2005).

Lago et al. (2008) caracterizaram a fração volátil obtida da hidrodestilação das folhas da *B. dracunculifolia*, a fração majoritária é constituída por compostos sesquiterpênicos (63,10 %) e por monoterpenos (0,30 %) como fração minoritária. Entre os monoterpenos destacam-se: β -pineno, canfenilona e α -terpineol, o sesquiterpeno não oxigenado β -elemeno foi identificado como o componente majoritário, cerca de 50 %. Frizzo et al. (2008) concluíram que fatores como altitude, latitude e sazonalidade influenciam na composição química da fração volátil.

Fukuda et al. (2006) obtiveram extratos etanólicos empregando ultrassom e concluíram que fenóis monoterpênicos (timol, carvacrol, p-metoxi timol) e álcoois sesquiterpênicos (espatulenol, bisacumol, 2-metil-6-(4-metilfenil)-3-hepten-2-ol, cadinol) apresentaram atividade citotóxica contra o crescimento de células leucêmicas

Cassel et al. (2000) relataram o uso de scCO₂ em folhas de *B. dracunculifolia* para a obtenção do seu óleo essencial. Encontraram 50 °C e 100 bar como condições ótimas na extração de compostos oxigenados como nerodilol e espatulenol.

Piantino et al. (2008) investigaram a extração dos seguintes compostos fenólicos com scCO₂: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA ou artemillin C), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 4-hidroxicinâmico (ácido p-cumárico) e 4-metoxi-3,5,7-trihidroxi-flavona (canferide), entre 200 a 400 bar e 40 a 60 °C. O rendimento de extração destes compostos apresentou a seguinte ordem decrescente: canferide, DHCA, PHCA e ácido p-cumárico, indicando que o rendimento de extração aumenta com o número de grupos prenil no anel do ácido p-cumárico. A 400 bar e 60 °C, obtiveram rendimento global de extração de 4,7% e 6,1% para as extrações com scCO₂ e etanol, respectivamente. A quantificação do artemillin C no extrato supercrítico foi de 20,13 mg /g enquanto que no extrato etanólico foi de 7,84 mg/g, mostrando que o scCO₂ foi mais seletivo na extração do artemillin C que as extrações etanólica e metanólica convencionais.

3.3.2 Pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

A *Eugenia uniflora* L., também conhecida como pitangueira, é uma árvore perene da família Myrtaceae, possui 100 gêneros e 3600 espécies (AURICCHIO e BACCHI, 2003). Em condições de solo e nutrientes adequados, a árvore pode atingir até 6 m, sendo muito comum nos países da América do Sul, principalmente no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (CONSOLINI e SARUBBIO, 2002). Atualmente é cultivada na América Central, Caribe, regiões tropicais dos Estados Unidos, Sudeste da Ásia, China, Índia, Sri Lanka, Madagascar, África do Sul, Israel e alguns países do Mediterrâneo (BEZERRA et al., 2000 citado por De ABREU, 2005).

A floração da pitangueira é abundante, branca e perfumada. O fruto é arredondado, achatado nas extremidades é muito apreciado, sua polpa é agri-doce

e perfumada, sendo usados na obtenção de geléias, vinhos, doces e licores (ANDRADE et al., 2007). O período de frutificação varia de outubro a janeiro.

Entre as aplicações medicinais da *Eugenia uniflora* L encontra-se seu uso como hipotensor, antigota, estomáquico, além de ter atividade antimicrobiana e hiperglicêmica (AURICCHIO E BACCHI, 2003). Na medicina popular tem se empregado as folhas em infusões para o tratamento do reumatismo, doenças gástricas, hipertensão, febre amarela (KADE et al., 2008). Estudos demonstraram que compostos presentes nas folhas possuem bioatividade como anti-inflamatório (SCHAPOVAL et al, 1994), anti-hiperglicemia e ant-ihipertrigliceridemia (ARAI et al., 1999), efeitos antimicrobiano e antifúngico (HOLETZ et al., 2002), anti-hipertensivo (CONSOLINI e SARRUBIO, 2002), efeito citotóxico (OGUNWANDE et al., 2005) e antioxidante (KADE et al., 2008)

Em 1977, Rücker e colaboradores isolaram vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora* principalmente sesquiterpenos, como furanoelemento, germacreno, γ -elemento, selina-4(14),7(11)-dieno. Weyerstahl et al. (1988) confirmam estes dados, detalhando a composição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, obtido com rendimento de 1 %, como um óleo amarelo do qual cariofileno (5,7 %), furanodieno (24 %), germacreno B (5,8 %), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17 %) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (14 %) são os componentes majoritários.

Morais et al., (1996) isolaram e identificaram os componentes do óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* L., colhidas na região Nordeste do Brasil, com rendimento de 0,74 %, do qual os componentes majoritários são selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona, com teores de 48,52 % e 17,33 % respectivamente.

A incidência dos flavonóides quercetina e miricetina foi assinalada por Schmeda-Hirschmann (1995), em folhas de *Eugenia uniflora* coletadas no leste do Paraguai. Lee et al. (1997), investigando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, relataram a presença de eugeniflorina D₁ (C₇₅H₅₂O₄₈) e eugeniflorina D₂

($C_{68}H_{48}O_{45}$), dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato metanólico das folhas.

Extratos supercríticos e frações voláteis foram obtidos por Peixoto et al. (2009) a pressões entre 100 e 300 bar e 50 e 60 °C. Os extratos supercríticos apresentaram rendimentos globais entre 1,45 % e 3,17 % (b.s), com presença de compostos majoritários como $C_{15}H_{20}O_2$, curzereno e germacreno B, no entanto a fração mais volátil apresentou rendimento global próximo a 0,1 %, como compostos majoritários o 3-hexen-1-ol e o curzereno.

Uma ampla variedade de solventes foi empregada na obtenção de extratos de folhas de *E. uniflora* L. Entre eles temos o metanol (EINBOND et al., 2004; VELAZQUEZ et al., 2003), etanol (BOSCOLO et al., 2007; GALHIANE et al., 2006), vapor d água (GALHIANE et al., 2006; de MORAIS et al., 1996; MELO et al., 2007), água (GALHIANE et al., 2006) e CO_2 no estado supercrítico (GALHIANE et al., 2006, CABRAL et al., 2006 e PEIXOTO et al., 2009).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Matérias primas e reagentes

As amostras das folhas de *B. dracunculifoliae* *E. uniflora*, foram coletadas no campo de cultivo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP) (Figura 3.1, Tabela 3.2). Foram desidratadas (por secagem em estufa ou por secagem natural), trituradas em moinho de facas (modelo MA-340, Marconi, Brasil), classificadas de acordo com tamanho usando peneiras vibratórias da serie Tyler (Bertel, Brasil) por 15 minutos. Após, as amostras foram empacotadas em sacos plásticos e estocadas em freezer doméstico (modelo 220, Consul, Brasil) a -10 °C.

Dióxido de carbono 99,5 % w/w (White Martins Gases Industriais, Brasil), etanol 99,5 %w/w (Synth, Brasil, lote 123134), água ultra pura Milli-Q (Millipore

direct-Q3 UV, Millipore Corporation, USA) foram empregados como solventes nos diferentes processos de extração.

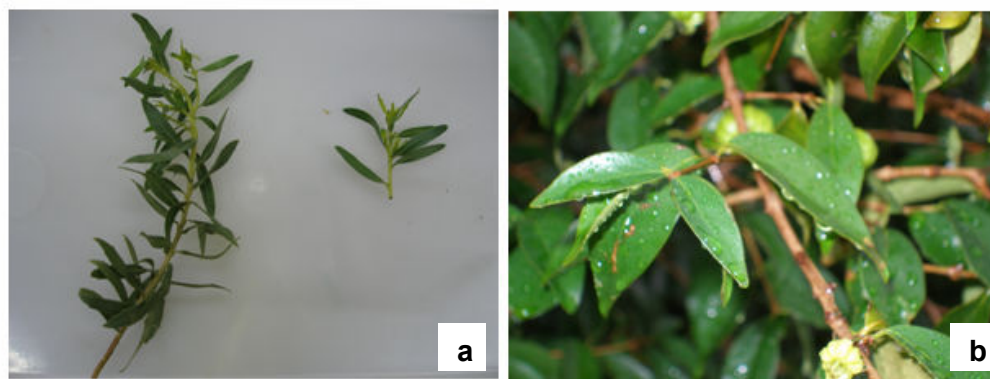


Figura 3. 1 – Fotos das folhas de *B. dracunculifolia* (a) e *E. uniflora* (b).

Tabela 3. 2 – Informações sobre as matrizes vegetais empregadas neste trabalho.

Planta	Parte usada	Colheita	Cond. de secagem
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	folhas	Dezembro 2007	Estufa com recirculação de ar 40 °C
<i>Eugenia uniflora</i> L	folhas	Dezembro 2007	Secagem natural à sombra por 5 dias

3.4.2 Caracterização física das matérias primas

Propriedades físicas das partículas livres e do leito formado na extração supercrítica foram quantificadas para as diferentes matérias primas.

3.4.2.1 Propriedades das partículas

Teor total de voláteis e umidade

O teor total de voláteis + umidade (VU %) foi determinado por método gravimétrico AOAC 930.04 (1997). O método emprega 2 g de amostra em uma cápsula previamente tarada e pesada em balança analítica (Precisa XT 220A, Precisa Instruments, Suíça) e submetida à secagem em estufa (Marconi, modelo MA-030/12, SP, Brasil) a 105 °C sob vácuo a 100 mm Hg (bomba Marconi, modelo MA-058, Brasil), tomando o peso a cada 2 horas até que a variação fosse menor ou igual a 3 mg.

Para o cálculo da porcentagem de massa seca empregou-se a Equação (3.1) a seguir:

$$VU = \left[\frac{m_{amostra} - m_{amostra\ dessecada}}{m_{amostra}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

O teor de umidade (U %) foi quantificado pelo método de Karl-Fisher (Metrohm 701 KF Titrino) equipado com forno (832 KF Thermoprep), a partir de 0,25 mg de amostra e prétratando-a a 105 °C durante 20 min, e vazão de Nitrogênio de 50 NmL/min (mililitros por minuto de nitrogênio a 1,01 bar e 0° C)

Diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio das partículas foi calculado pelo método ASAE (ASAE 1997) no qual a amostra triturada é introduzida num jogo de peneiras da série Tyler de tamanho 8 a 48 mesh (Apêndice A), onde é realizada a peneiragem durante 15 minutos com ajuda de um agitador eletromagnético de peneiras (Bertel, SP, Brasil). As diferentes frações retidas nas peneiras foram pesadas em balança semi-analítica (Marte AS5500C, Marte Balanças e Instrumentos de Precisão LTDA, Brasil). Os resultados estPara o cálculo do diâmetro médio geométrico empregou-se a Equação (3.2), a seguir:

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (3.2)$$

sendo que:

$$\bar{d}_i = (d_i \times d_{i+1})^{1/2} \quad (3.3)$$

onde $\bar{d}_i$ é o diâmetro médio geométrico, d_i e d_{i+1} representam a abertura da peneira i e $i+1$, w_i é a massa do material retido na peneira i .

Densidade real das partículas

A densidade real (ρ_r) foi determinada por picnometria de gás hélio (Micromeritics, Accu Pyr II 1340 V1.02) na central analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Os testes foram realizados a 25 °C. Os resultados são médias de 10 determinações por cada amostra.

Esfericidade

A esfericidade das partículas foi calculada a partir do processamento e análise de imagens, por meio do software ImageJ[®] v.1.42 (National Institute of Health, USA). Para cada matriz foram obtidas múltiplas imagens digitais em formato 2D, com resolução 128 pixel/mm em estereoscópio (Citoval 2, Zeiss, Alemanha) equipado com câmera digital (*Kodak EasyShare DX4530*). As imagens coloridas (2580 × 1932 pixels quadrados) foram convertidas em imagens de 8 bits, com brilho e contraste ajustado. O programa calcula o raio do círculo inscrito (R_{min}) e do circunscrito (R_{max}) e por meio do método de Curray (1951, citado por JAYAN e KUMAR 2004, CHO et al., 2006) foi calculada a esfericidade usando a Equação (3.4).

$$\phi = \frac{R_{\min}}{R_{\max}} \quad (3.4)$$

Microestrutura

Amostras das diferentes plantas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO 440i) para avaliação da sua microestrutura. Previamente as amostras foram depositadas sobre porta amostras providas de adesivo e foi aplicado recobrimento em ouro em um metalizador (Polaron).

3.4.2.2 Propriedades do leito de partículas

Porosidade

A porosidade do leito (ε , ou fração volumétrica de vazios no leito) foi calculada por meio do procedimento de Rahman (1996) a partir dos dados experimentais de densidade aparente (ρ_a) e real do material moído (ρ_r) é calculada pela Equação (3.5).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3.5)$$

Tortuosidade

A tortuosidade do leito de partículas (τ) é definida como a relação entre a distância real percorrida por um soluto através dos poros e a distância reta entre os dois pontos. A tortuosidade é um parâmetro que caracteriza a estrutura de empacotamento. Está associada aos fenômenos de transporte, em função da permeabilidade (escoamento de fluidos) e difusividade efetiva (transferência de massa) (DELGADO, 2006). As Equações (3.6) e (3.7) de Boudreau et al. (1996) e

de Lanfrey et al. (2010) respectivamente, foram empregadas para o cálculo da tortuosidade.

$$\tau = \sqrt{1 - \ln(\varepsilon^2)} \quad (3.6)$$

$$\tau = 1.23 \frac{(1 - \varepsilon)^{4/3}}{\varepsilon \phi^2} \quad (3.7)$$

Densidade aparente das partículas

A densidade aparente (ρ_a) foi calculada a partir da massa de cada uma das matrizes vegetais requerida para encher um volume de 10 cm³ (UQUICHE et al., 2004).

3.4.3 Metodología para a obtenção dos extratos

As diferentes matrizes vegetais foram submetidas a processos de extração em etapa única ou em duas etapas. No primeiro caso foram empregados diferentes solventes: CO₂ supercrítico (SC), água (A) e etanol (E) (Figura 3.2).

Processos de extração em duas etapas foram realizados a partir do material residual da extração SC, de onde se obteve extratos usando água (SCA) ou etanol (SCE) como solventes (Figura 3.3). As condições operacionais das diferentes extrações foram as mesmas para as cinco matrizes vegetais. No caso da extração supercrítica as condições de temperatura e pressão fixadas (60 °C e 400 bar) obedeceram à procura de uma máxima extração de compostos de baixa polaridade com scCO₂, enquanto que compostos de alta polaridade são extraídos em uma segunda etapa de processo, com etanol (SCE) e com água (SCA). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

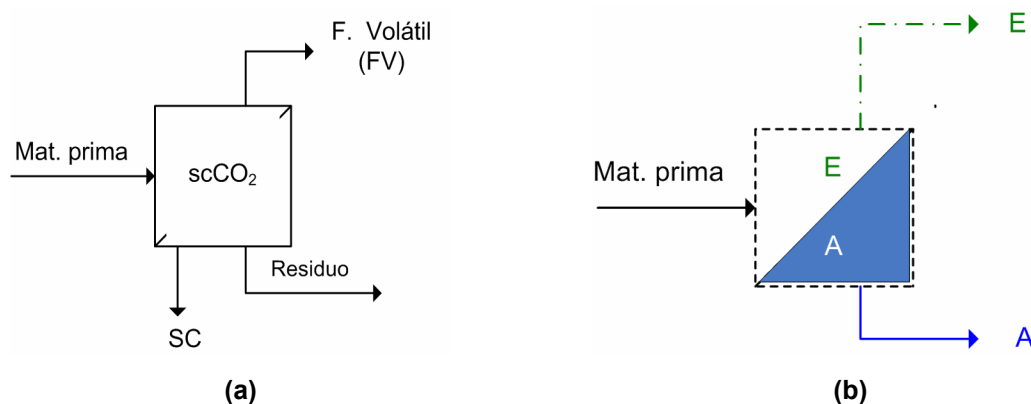


Figura 3.2 - Processo de extração em etapa única. (a) extração com CO_2 supercrítico, (b) Extração aquosa ou etanólica

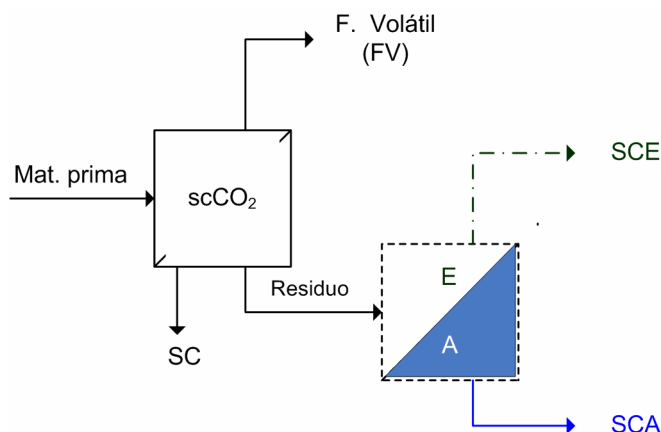


Figura 3.3 - Processo de extração em duas etapas.

A Figura 3.4 apresenta esquematicamente a atividade experimental de tratamento das matérias-primas e caracterização dos extratos.

3.4.3.1 Extratos etanólicos (E, SCE)

Os extratos etanólicos da *E. uniflora*, foram obtidos segundo a metodologia de Piantino et al. (2008) como algumas mudanças: foram misturadas 3 gramas de amostra seca com 20 mL de álcool etílico agitando a mistura em banho termostatzado a 25 °C por 42 horas. Após, a mistura é filtrada a vácuo, reservado

o filtrado, e ao resíduo sólido foi acrescentado 10 mL de álcool etílico e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos (centrífuga JOUAN, BR4i, França), após é refiltrado com ajuda de bomba de vácuo, assim este novo filtrado é misturado com o anterior constituindo o extrato etanólico (Figura 3.4).

No caso da *B. dracunculifolia* o extrato foi obtido misturando-se 3 g de folhas trituradas com 10 mL de álcool etílico por 42 horas a 25 °C. Ao final desta etapa foi acrescentado 10 mL de álcool e centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. Após filtração a vácuo o sobrenadante foi reservado e ao resíduo foi acrescentado mais 10 mL e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, recuperando-se um novo filtrado com ajuda de bomba de vácuo, este novo filtrado foi misturado com o filtrado anterior constituindo o extrato etanólico (Figura 3.5).

O solvente presente nos extratos etanólicos foi evaporado usando estufa (Marconi, MA 030-12, Brasil) a temperatura de 50 °C sob vácuo de 25 mmHg (bomba Marconi, MA 058, Brasil) ou com rotaevaporador (Marconi, MA-120, Brasil), até a obtenção do extrato seco.

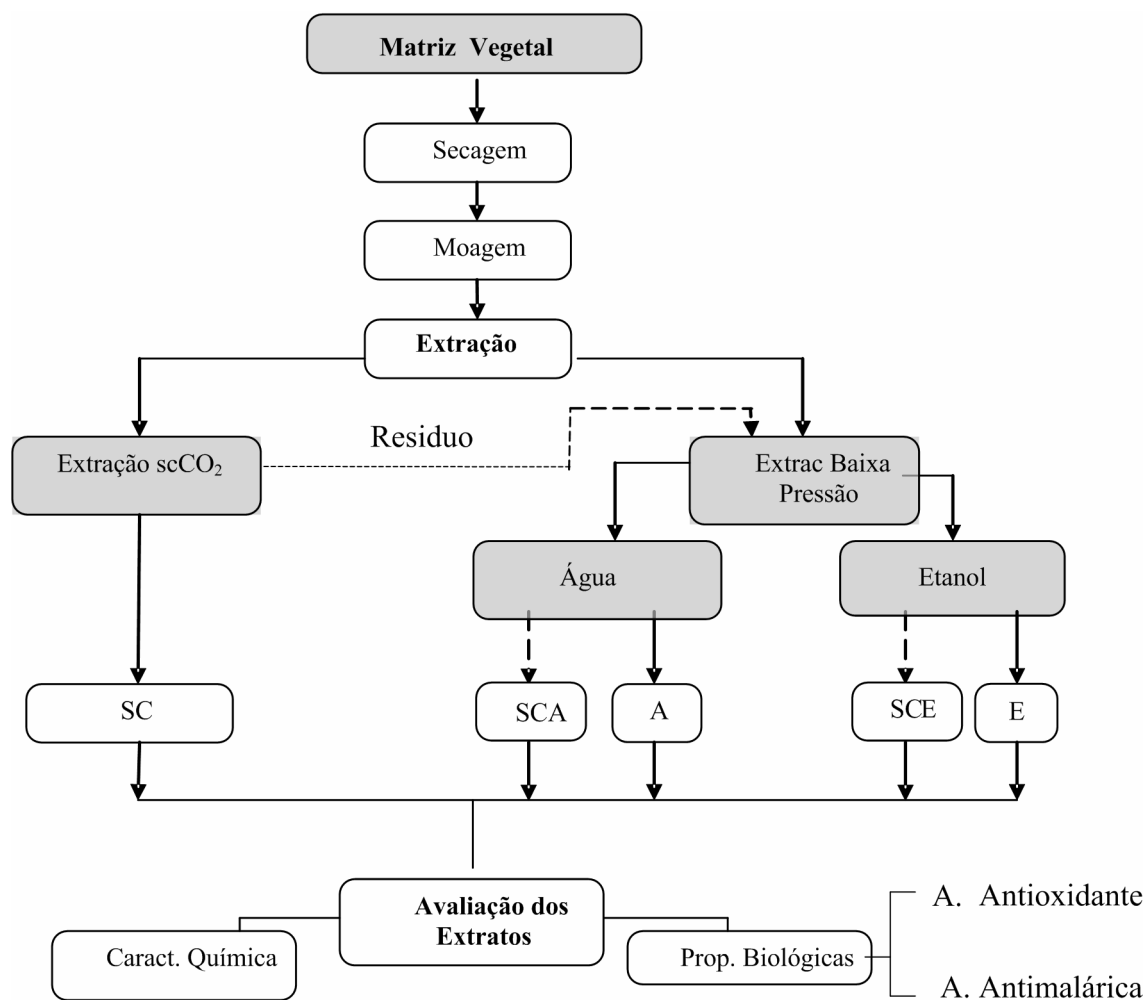


Figura 3.4 – Fluxograma de obtenção e avaliação dos extratos

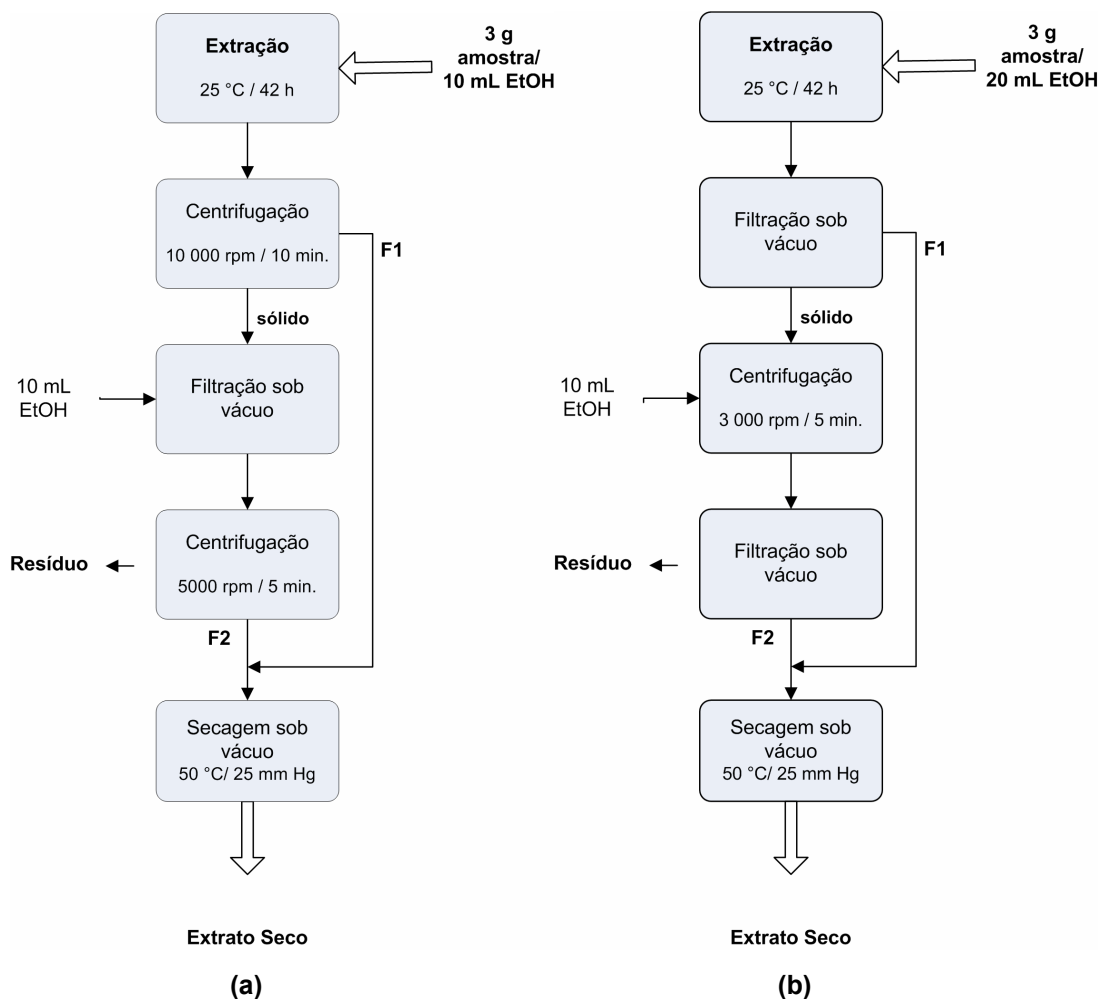


Figura 3.5 - Obtenção dos extratos etanólicos a baixa pressão. (a) *B. dracunculifolia*, (b) *E. uniflora* L.

3.4.3.2 Extratos aquosos (A, SCA)

Para todas as matrizes vegetais, os extratos aquosos foram obtidos de acordo com a metodologia de Cseke et al. (2006), na qual misturam-se 3 g de amostra desidratada com 60 mL de água a 60 °C em banho termostático (Tecnal, TE-184, Brasil) por 10 minutos, após a mistura é centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm (centrífuga JOUAN, BR4i, França), finalmente o extrato é obtido a partir da filtração a vácuo (Figura 3.6).

A água presente nos extratos foi evaporada em estufa (Marconi, MA 030-12) a temperatura de 323 K sob vácuo de 25 mmHg (bomba Marconi, MA 058, Brasil)

ou com rotaevaporador (Marconi, MA-120, Brasil), até a obtenção do extrato seco

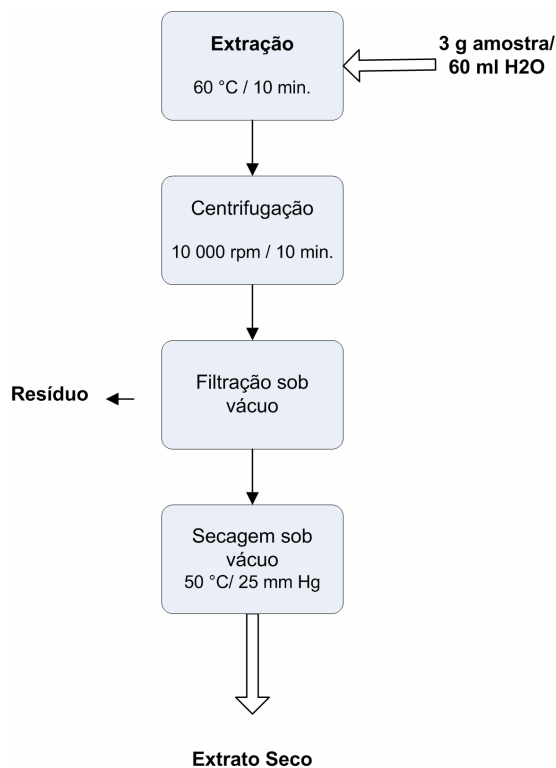


Figura 3.6 - Fluxograma para a obtenção dos extratos aquosos.

3.4.3.3 Extrato supercrítico (SC)

Os experimentos foram realizados em uma unidade experimental (Laboratório ExTrAE, UNICAMP, Brasil) conforme esquematizado na Figura 3.7. A unidade consiste basicamente de um cilindro de CO₂ (1), banho de refrigeração (2), bomba de alta pressão (3), tanque pulmão (4), extrator (5), coletor de extrato (7), medidor de vazão (9) totalizador de volume (10), banho termostatizado (11), armadilha com adsorvente Porapak –Q (80 /100 mesh, Supelco, EUA) (8) quando houver a necessidade de captura de voláteis, manômetros do tipo Bourdon no tanque pulmão e na entrada do extrator e bomba peristáltica (6), usada para injetar solvente e lavar as tubulações.

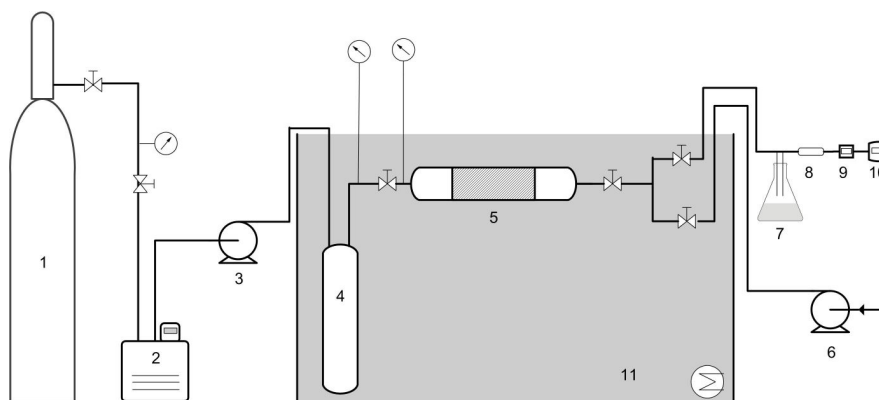


Figura 3. 7 - Esquema representativo do equipamento para a extração em leito fixo.

Em todos os casos o extrator (5) foi empacotado manualmente com uma quantidade aproximada de 7 g de material seco e triturado. Pérolas de vidro mesh 6 foram usadas para preencher os espaços vazios do extrator. Foram ajustadas as condições operacionais a 400 bar e 60 °C para os experimentos. Quando alcançadas as condições estabelecidas, adotou-se um período de 1 hora como tempo para estabilização e iniciou-se a extração escoando-se $4 \cdot 10^{-5}$ kg/s de CO₂ através do leito e coletando-se extrato no frasco coletor (7), o qual foi pesado em balança analítica (BFL Engineering, EUA). O CO₂ no estado gasoso que deixa o coletor (7) é escoado através de uma armadilha de poropak-Q (8) e conduzido a um medidor de vazão (9) e totalizador (10) para quantificar o dióxido de carbono usado. Durante a primeira hora foram obtidas 4 amostras de extrato, na segunda hora duas amostras e a partir da terceira hora uma amostra por hora. As extrações foram finalizadas depois de 6 horas (540 L de CO₂ a aproximadamente 0,93 bar e 25°C), realizando todos os testes em triplicata. Detalhes dos equipamentos e instrumentação do sistema experimental estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3. 3 - Especificações técnicas do equipamento e instrumentação da unidade de extração supercrítica.

EQUIPAMENTO - INSTRUMENTO	MARCA, MODELO
Válvula tipo agulha e micrométrica	Autoclave Engineers, EUA
Manômetros tipo Bourdon	Record, Brasil
Medidor de vazão	Cole-Parmer, 32908-69, EUA
Totalizador de volume	Lao-G1, Brasil
Banho termostatizado	Sulab, Brasil
Banho de refrigeração	Cole-Parmer, Polystat 12101-31, EUA
Bomba de alta pressão	Eldex Laboratories, PN 1018 AA-100-S, EUA
Extrator	aço inox AISI 316 de 50 mL, Suprilab, Brasil
Tanque pulmão	Aço inox AISI 316 de 500 mL, Suprilab, Brasil
Bomba peristáltica	Cole-Parmer, Masterflex 77200-62, EUA

3.4.3.4 Determinação do rendimento global de extração

Como parâmetro comparativo entre os diferentes métodos de extração empregou-se o rendimento global de extração, o qual expressa a relação entre a massa de extrato seco obtido em processos em etapa única (SC, A ou E) e a massa de matriz vegetal empregada no processo de extração (mp), este rendimento é baseado por unidade de massa matéria prima empregada ($R_{1,mp}$, Equação 3.8). Como os experimentos foram conduzidos em triplicata, o rendimento global é resultado da média aritmética dos valores experimentais

$$R_{l,mp} = \left[\frac{SC \text{ ou } E \text{ ou } A}{mp} \right] \times 100 \quad (3.8)$$

No caso das extrações supercríticas, o rendimento global de extração foi calculado como a relação entre a massa total do extrato (obtido na extração + obtido no processo de limpeza da linha) e a massa inicial da matéria prima seca. Nestas extrações o rendimento também foi calculado ao longo do processo, a partir das massas secas dos extratos obtidos em intervalos de tempo fixos: cada 15 minutos (ao longo da 1ª hora), cada 30 minutos (ao longo da 2ª hora), e depois da 2ª hora, de hora em hora até completar 6 horas totais.

O processo de extração em duas etapas emprega na 2ª etapa o resíduo proveniente da primeira extração; neste caso o rendimento da segunda etapa, baseado no resíduo (res) ($R_{2,res}$, Equação 3.10) é corrigido para ser expresso com base na matéria prima alimentada (mp) ao processo global ($R_{2,mp}$) e levando em conta os extratos obtido na primeira etapa: supercrítico (SC) e fração volátil (FV), mediante a Equação (3.8).

$$R_{2,mp} = R_{2,res} \left[1 - \frac{(SC + FV)}{mp} \right] \times 100 \quad (3.9)$$

onde:

$$R_{2,res} = \left[\frac{(SCE \text{ ou } SCA)}{Res} \right] \times 100 \quad (3.10)$$

3.4.4 Análises químicas dos extratos

Todos os extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, concentração de compostos específicos (artepillin C, nos extratos de *B. dracunculifolia*) e perfil de compostos presentes na fração volátil retida na armadilha de Porapak-Q.

3.4.4.1 Fenóis totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de SINGLETON et al. (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (EAG)/ g. A curva padrão de ácido gálico (> 99%, Vetec, Brasil) foi construída segundo o procedimento a seguir: uma alíquota de 1 mL foi retirada do extrato apropriadamente diluído em etanol ou das soluções aquosas padrão de ácido gálico (> 99%, Vetec, Brasil, lote 0806387) (0 – 100 mg/L) e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, contendo 9 mL de água. O reagente de Folin-Ciocalteu (1 mL) (Dinâmica, Brasil) foi adicionado e a mistura agitada. Após 5 minutos foram adicionados 10 mL de uma solução Na_2CO_3 7 % (Reagentes Carlo Erba, Itália) e o volume completado com água. Após permanecer 90 minutos a 23 °C na ausência de luz, a absorbância foi determinada a 750 nm em um espectrofotômetro (UV-VIS lambda 40, Perkin Elmer, USA). A solução referência utilizada como branco no espectrofotômetro foi acondicionada da mesma forma, com 1 mL de água ultra pura (Milli-Q). A curva padrão foi obtida a partir de testes em triplicata e apresentada no Apêndice B.

Para a medição de fenóis totais nas amostras dos extratos secos, estes foram inicialmente diluídos em etanol (pureza 99,5% v/v, Synth, Brasil) em proporção (20 mg/mL etanol), a partir do extrato diluído foi preparada a diluição aquosa, tomando quantidade apropriada do mesmo e depositada em um balão volumétrico de 5mL, completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, verificando-se que o valor obtido de absorbância permanecesse dentro da faixa de absorbância da curva padrão. Foram realizadas amostras em triplicata.

3.4.4.2 Flavonóides totais

Para a quantificação dos flavonóides totais foi empregado o método desenvolvido por ZHISHEN et al. (1999) e os resultados expressos em mg equivalente de catequina (mg EC)/g. Uma alíquota do extrato apropriadamente diluído ou das soluções aquosas padrão de catequina (> 98%, Sigma Aldrich inc,

USA, lote 31508270) (0 – 100 mg/L) foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL contendo 4 mL de água e em seguida foi adicionado 0,3 mL de uma solução de NaNO_2 5% (Ecibra, Brasil). Após 5 minutos, foi adicionado 0,3 mL de uma solução de AlCl_3 10% (Ecibra, Brasil), e após 6 minutos, 2 mL de NaOH 1 M (Reagentes Carlo Erba, Itália), completando-se o volume com água destilada. A absorbância da solução foi determinada a 510 nm em espectrofotômetro FEMTO (Tecnal, Brasil). Tanto para as medições nos extratos quanto para a curva padrão de catequina, foram feitas em triplicata; a curva padrão obtida é apresentada no Apêndice B.

Para a medição do teor de flavonóides totais nas amostras dos extratos secos, este, foram inicialmente diluídos em etanol (pureza 99,5% v/v, Synth, Brasil) em proporção (20 mg/mL etanol); a partir do extrato diluído foi preparada a diluição aquosa, tomando uma quantidade apropriada do mesmo e depositada em um balão volumétrico de 5mL completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, verificando-se que o valor obtido de absorbância estivesse dentro da faixa de absorbância da curva padrão. Foram realizadas amostras em triplicata.

3.4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-FR)

A análise de artemillin C foi efetuada com HPLC (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemanha), com bomba (Merck-Hitachi, modelo D-7100), rede de fotodiodos e injetor automático. As condições utilizadas foram: coluna em fase reversa Lichrochart (RP-18, 125 x 4 mm, 5mm) (Merck, Alemanha) utilizando-se como fase móvel água-ácido fórmico (95:5 v/v, solvente A, Merck) e metanol (solvente B-grau cromatográfico, Merck). A eluição foi desenvolvida em uma vazão de 1 mL/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção foi efetuada em comprimento de onda de 280 nm. A identificação de artemillin C foi efetuada pela comparação do tempo de retenção e espectro UV visível (200 – 400 nm) com padrão isolado. A quantificação foi feita

usando padrões externos. O programa utilizado para a análise de dados foi o Merck- Hitachi (modelo D-7100 Chromatography Data Station - DAD Manager). As análises foram feitas no laboratório de análises Natural Labor pela Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

3.4.4.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As frações voláteis retidas nas armadilhas de Porapak-Q nas extrações supercríticas (SC) foram analisadas com CG (cromatografia gasosa). O conteúdo do Porapak-Q foi eluído com 1 mL de acetato de etila e analisados para identificação no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC 6890N, Agilent 5975), com coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) e gás de arraste hélio 1mL/min. A programação de aquecimento da coluna utilizada foi: 55° - 120°C a 20°C/min, 120° - 150°C a 1,5°C/min, 150° - 250°C a 20°C/min, 250°C (10 min) para os extratos da *B. dracunculifolia* (Queiroga et al., 1990, e 60°C - 246°C a 3°C/min, para os extratos de *E. uniflora* (ADAMS, 1995). As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 250 °C, respectivamente. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com dados da literatura (ADAMS, 1995); com o banco de dados do sistema CG/EM – biblioteca Wiley e NIST; e com o índice de retenção relativo a uma série de n-alcanos (C9-C30,C32). As análises foram realizadas no equipamento do CPQBA/ UNICAMP pela Dra. Carmen Lucia Queiroga.

3.4.4.5 Atividade antioxidante

Método do DPPH

A capacidade do sequestro do radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) para os diferentes extratos foi determinada pelo método espectrofotométrico, o qual tem sido usado amplamente devido a sua

simplicidade, estabilidade e reprodutibilidade (KITTS et al., 2000), sendo útil para a determinação de atividade antioxidante tanto de espécies hidrofílicas quanto lipofílicas (KELEN e TEPE, 2007). Assim o composto antioxidante reage com o radical DPPH[•] doando hidrogênio e se reduzindo, observando-se uma diminuição na absorbância, por meio da reação apresentada na Figura 3.8.

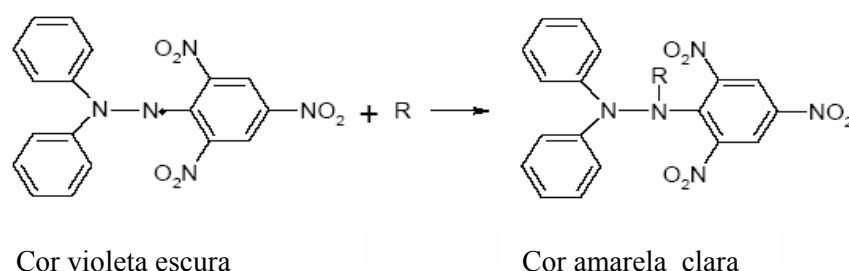


Figura 3. 8 - Reação de sequestro do radical livre (método do DPPH[•]).

A atividade antioxidante foi calculada para cada um dos extratos pelo método de Mensor et al. (2001), descrito a seguir. A solução estoque do extrato (1 mg/mL), foi preparada dissolvendo 1 mg de extrato seco em 1 mL de etanol em ultra-som por 5 min. A partir da solução estoque foram preparadas soluções com concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL em etanol. Transferiu-se 2,5 mL de cada solução para um tubo de ensaio sob proteção da luz. A cada tubo de ensaio foi acrescentado 1 mL de solução etanólica de DPPH[•] 0,28 mM (Sigma-Aldrich Chemie, Alemanha, lote S4869-348) recém preparada, agitando a mistura e aguardando 30 min à temperatura ambiente e no escuro. Depois as amostras foram transferidas a cubetas de quartzo e medida a absorbância em 517 nm.

Durante a reação, as mudanças de cor (roxo a amarelo claro) foram monitoradas em um espectrofotômetro UV/VIS (FEMTO, Tecnal, Brasil). A solução branco foi preparada misturando-se 1mL de etanol e 2,5 mL de extrato, o controle negativo foi preparado com 1mL de solução de DPPH[•] e 2,5mL de etanol, nas duas soluções foi medida a absorbância no mesmo comprimento de

onda (517 nm). O espectrofotômetro foi zerado com etanol 99,5 %. Como controles positivos foram empregados padrões: (+)- catequina (> 98%, Sigma Aldrich inc, USA, lote 31508270), ácido gálico (> 99%, Vetec, Brasil, lote 0806387) e ácido L (+) - ascórbico (> 99%, Ecibra, Brasil, lote 17752).

Os testes foram conduzidos em triplicata. Para cada uma das seis soluções a atividade antioxidante (AA) foi calculada a partir da Equação 3.10. A atividade antioxidante (AA) possui valores entre 0 e 100% e indica a porcentagem de inibição do radical DPPH.

$$AA(\%) = \left[\frac{A_{controle} - (A_{amostra} - A_{branco})}{A_{controle}} \times 100 \right] \quad (3.11)$$

A concentração efetiva (CE₅₀, µg/mL) é definida como a concentração de substrato (neste caso extrato) que causa 50 % do decréscimo da atividade inicial do DPPH (MOLYNEUX, 2004). O CE₅₀ facilita a comparação direta da atividade antioxidante entre substâncias diferentes, pois é Independente da concentração da amostra (LOCATELLI et al., 2009). O valor de CE₅₀ para cada extrato foi calculada a partir dos valores de AA (%) e por meio de análise das curvas dose-resposta e empregando análise de regressão. A análise dose-resposta é freqüentemente aplicado para avaliar a atividade de uma droga sobre um sistema biológico ou químico, em estudos *in vivo* e *in vitro*. A análise de curvas dose-resposta tem sido empregada para quantificar o valor do parâmetro CE₅₀, por meio de análise de regressão linear ou não linear (LOCATELLI et al., 2009, POUVREAU et al., 2008, MATKOWSKI et al., 2008, VICENTINO e MENEZES 2007, NICKAVAR et al., 2007, VILLANO et al., 2005, HEIMLER et al., 2005, KLECAKOVÂ et al., 2004).

Tabela 3. 4 - Modelos de regressão empregados no cálculo de CE₅₀.

Tipo de análise	Modelo	Equação
Linear		
	Faixa linear limitada	Linear FL
	Faixa linear completa	Linear FC
		$AA(\%) = a + bx$
Não linear		
Exponencial	Exponencial	Exp
	Exponencial com uma fase associada	Exp FA
		$AA(\%) = a(1 - e^{-bx})$
		$AA(\%) = a + \left[(b - a) (1 - e^{-cx}) \right]$
Logístico	Logístico 3 parâmetros	L3P
	Logístico 4 parâmetros	L4P
		$AA(\%) = \frac{a}{(1 + be^{-cx})}$
		$AA(\%) = a + \frac{(b - a)}{1 + 10^{(d-x).c}}$

AA, atividade antioxidante (%), x: concentração do extrato (µg/mL)

Os valores de AA (%) para cada uma das 7 concentrações de cada extrato foram graficadas contra as concentrações correspondentes (dose), sendo esta a curva dose-resposta, a partir da qual é calculado o valor de CE₅₀, empregando diferentes modelos de regressão, apresentados na Tabela 3.4.

A análise de regressão linear foi empregada no cálculo de CE₅₀ para as respostas AA(%) obtidas na faixa de concentração de 0 até 250 µg/mL. Uma segunda análise de regressão linear foi feita para uma faixa limitada de concentrações que produzissem valores de $AA \leq 70\%$ (BUENGER et al., 2006).

A análise de regressão não linear com modelos exponenciais e logísticos, permitindo levar em conta a não linearidade em repostas durante o teste de DPPH. O modelo logístico de 4 parâmetros tem sido usado para o ajuste de curvas dose-resposta em testes biológicos (JIMENEZ et al., 2005, CHÈVRE e BRAZZALE, 2008; POVREAU et al., 2008).

Para fins comparativos foi calculado o valor do coeficiente de determinação (r^2) e o valor da raiz quadrada do erro médio (RSME) por meio da Equação (3.12).

$$RSME = \left[\sum \frac{(AA_{exp} - AA_{calc})^2}{n} \right]^{1/2} \quad (3.12)$$

onde AA_{exp} representa a atividade antioxidante experimental, e AA_{calc} a atividade antioxidante calculada com o respectivo modelo, e n o número de medidas experimentais.

Método de descoloração do β -caroteno (Método DBC)

O método de descoloração do β -caroteno (DBC) é baseado no monitoramento espectrofotométrico da sua oxidação (descoloração), produzida por produtos de degradação do ácido linoléico, segundo método de Miller (1971).

Uma alíquota de 1 mL de solução (1 mg/10 mL) de β -caroteno (97 %, Fluka, EUA) em clorofórmio (99%, Ecibra, Brasil) foi adicionada a um frasco que continha 20 mg de ácido linoléico (99%, Sigma-Aldrich, EUA) e 200 mg de Tween 40[®] (Sigma-Aldrich, Alemanha). Esta mistura foi submetida a evaporação sob vácuo e 50 °C, em rotaevaporador (Marconi, MA-120, Brasil). Adicionou-se à mistura seca 50 mL de água Milli-Q oxigenada (borbulhando ar durante 30 minutos), sob agitação vigorosa em vórtex, obtendo uma emulsão. Transferiu-se 5 mL desta emulsão para um tubo de ensaio e adicionou-se 0,2 mL dos extratos diluídos (200 μ g/mL). Esta solução foi agitada e feita a leitura de absorbância a 464 nm em um espectrofotômetro UV/Visível (FEMTO, Tecnal, Brasil), sendo que esta leitura foi considerada como tempo zero. A solução controle foi preparada da mesma forma substituindo-se os extratos por 0,2 mL de etanol. Os tubos das amostras e controle foram submetidos a auto-oxidação térmica durante 180 minutos a 50 °C. Leituras de absorbância foram feitas em intervalos de tempo de 30 minutos. O branco empregado para zerar o espectrofotômetro foi preparado a partir de 5 mL de emulsão sem β -caroteno e 0,2 mL de etanol. A atividade

antioxidante (AA) foi calculada como a porcentagem de inibição relativa ao controle (100% oxidação), por meio da Equação (3.13).

$$AA(\%) = \left[\frac{(A_0^c - A_t^c) - (A_0^a - A_t^a)}{(A_0^c - A_t^c)} \times 100 \right] \quad (3.13)$$

onde “c” representa o controle e “a” a amostra, respectivamente, e A_0 e A_t são as absorbâncias a 0 e t minutos do teste. Soluções (200 µg/mL) de BHT ($\geq 98\%$ HPLC, EUA), quercitina ($\geq 99.0\%$ GC, EUA) e ácido ascórbico ($>99\%$, Ecibra, Brasil), foram usados como controles positivos (padrões). Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para identificar os tratamentos com as melhores respostas foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Nesta etapa foi empregando o software Statistica[®] versão 7.0 (StatSoft, EUA).

As análises de regressão para se obter os valores de CE_{50} no teste de atividade antioxidante foram feitas empregando-se Microsoft Excel[®] 2003, CurveExpert[®] V.1.38 (Daniel Hyams) e GraphPad Prism[®] V.5 (GraphPad Software, USA).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Caracterização das matérias primas

Tabela 3. 5 - Resultados caracterização das matérias primas.

Propriedade	<i>Baccharis dracunculifolia</i>		<i>E. uniflora</i> L.
	AM1	AM2	
partículas			
VU (%)	10.6 ± 0.3	11.87± 0.08	13.27 ± 0.05
<i>U</i> (%)	6,6 ± 0.3	7.7 ± 0.2	10,2 ± 0.2
ρ_r (g/cm ³)	1,39 ± 0.02	1,38 ± 0,03	1,48 ± 0,04
<i>d_{mg}</i> (mm)	0,796	0,802	0,817
ϕ	0,492	0,533	0,527
leito			
ρ_a (g/cm ³)	0,278 ± 0.006	0,348 ± 0.008	0,312 ± 0.004
τ^a	0,744	0,922	0,706
τ^b	1,203	1,257	1,214
ε	0,800	0,748	0,789

^a calculada apartir da equação de Lanfrey et al. (2010)

^b calculada apartir da equação de Boudreau et al. (1996)

A Tabela 3.5 apresenta as propriedades que caracterizam as amostras de *B. dracunculifolia* e *E. uniflora* L. No caso da *B. dracunculifolia*, estudaram-se duas amostras, a número 1 (AM1) composta por uma mistura de folhas desenvolvidas e folhas jovens, e a amostra 2 (AM2), composta apenas de folhas jovens. As duas amostras foram colhidas na mesma data e a partir das mesmas plantas.

Os resultados reportados na Tabela 3.5 mostram diferenças de 3 a 4% entre os valores da umidade determinada pelo método de *Karl Fisher* (%U) e o valor obtido pela determinação gravimétrica (%VU), sendo esta discrepância explicada pela evaporação de voláteis junto com a água no método gravimétrico, contabilizando erroneamente toda a massa evaporada como umidade (*World*

Health Organization - WHO, 1998; ISENGARD, 2001). Assim o método químico de *Karl Fisher* permite a quantificação direta de água em materiais como plantas medicinais e especiarias (MIRA et al., 1996, SUPARTONO et al., 1998; BRUTTEL e SCHILINK, 2003; GLISIC et al., 2008).

A esfericidade (ϕ) caracteriza o grau com o qual uma partícula está próxima à forma esférica, sendo que para a esfera o seu é valor igual a 1. Este parâmetro morfológico está diretamente relacionado com as características de empacotamento das partículas em um leito fixo de partículas, como aquele empregado em extrações com fluidos no estado supercrítico. As três matrizes vegetais apresentaram valor de esfericidade em torno de 0,5, cujo cálculo foi feito a partir do processamento das imagens (Figura 3.9).

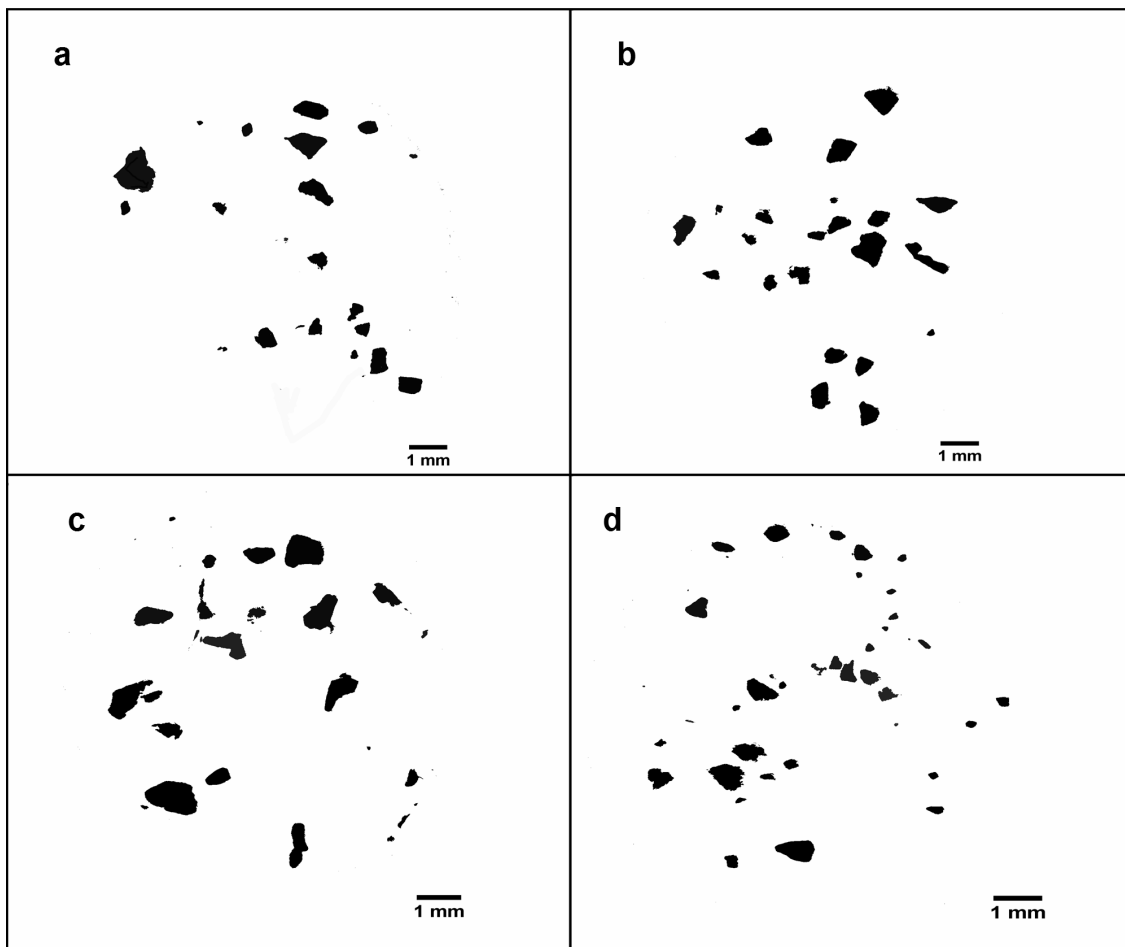


Figura 3.9 - Fotografias 8 bit das matrizes vegetais) após o processamento digital. *B. dracunculifolia* (AM1) (a) (AM2) (b), *E. uniflora* L. (c, d).

A tortuosidade do leito de partículas foi calculada a partir das correlações de Boudreau et al. (1996) e de Lanfrey et al. (2010). Com a última Equação a estimativa da tortuosidade ficou entre 0,70 e 0,92, sendo estes valores menores que os estimados por meio da equação de Boudreau (com valores próximos a 1,2). Lanfrey et al. (2010) reportaram que esse comportamento acontece com valores altos de porosidade. Quanto a processos de transferência de massa, os estudos de Shen e Chen (2007) reportam uma forte dependência entre a forma e tamanho das partículas com o coeficiente de difusão.

Avaliação da microestrutura das amostras antes e depois da extração supercrítica

Na Figura 3.10 são apresentadas as micrografias das diferentes matrizes vegetais obtidas com ajuda da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Antes da extração supercrítica a microestrutura das matrizes apresentam regiões com superfície mais compacta e homogênea (Figura 3.10a, 3.10c e 3.10e) do que as correspondentes matrizes após extração supercrítica, mostrando regiões com microestrutura mais aberta e porosa (Figura 3.10b, 3.10d e 3.10f).

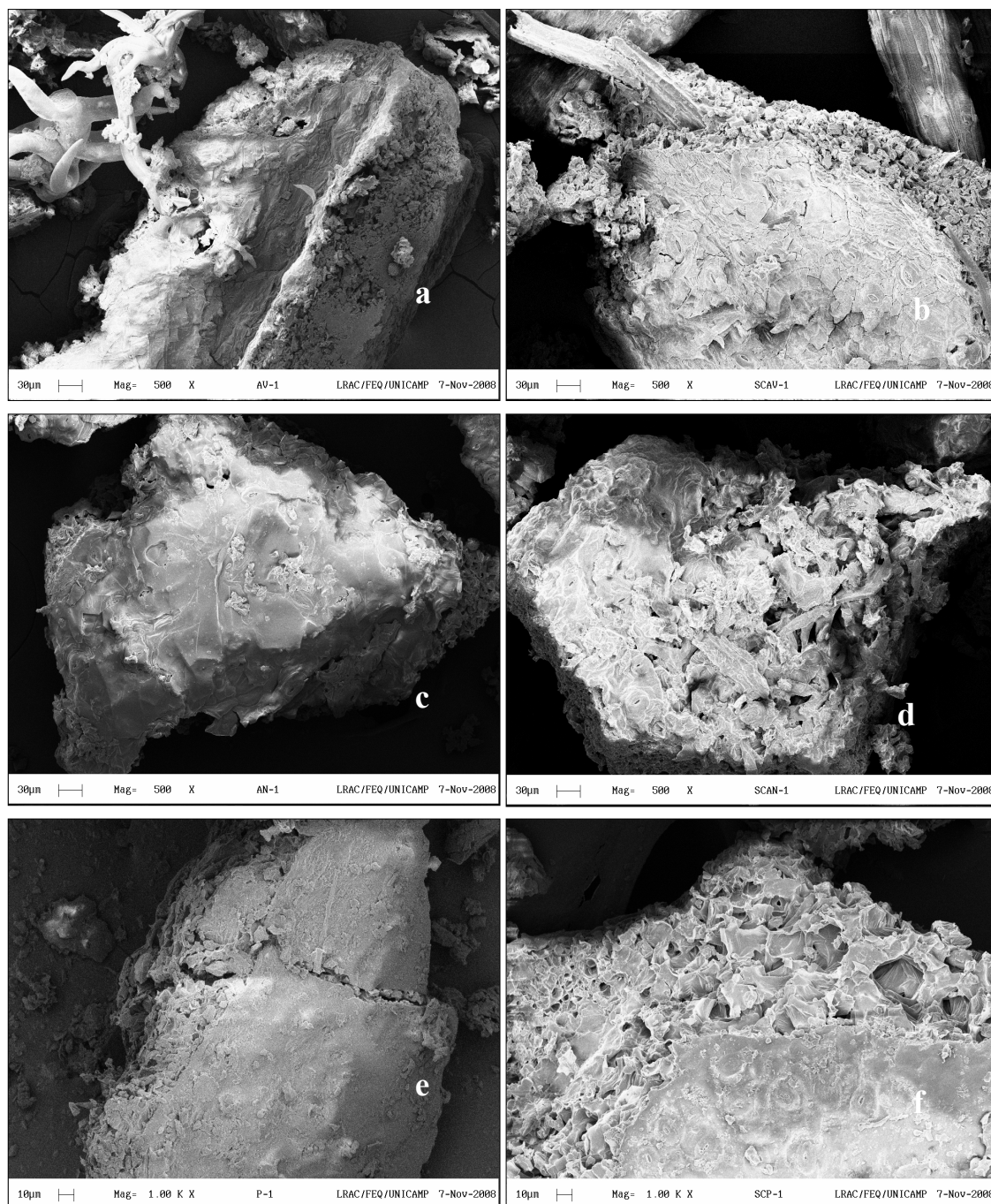


Figura 3.10 - Microestrutura das matrizes vegetais (x 500): *B. dracunculifolia* (AM1) (a) antes, (b) após extração supercrítica *B. dracunculifolia* (AM2) (c) antes, (d) após extração supercrítica, *E. uniflora* L. (e) antes, (f) após extração supercrítica

3.5.2 Rendimento e cinética de extração

A Tabela 3.6 apresenta valores de rendimento global de extração, concentração e rendimento de fenóis totais, de concentração e rendimento de flavonóides totais e de concentração e rendimento de artepillin C de extratos obtidos de 2 amostras de folhas de *B. dracunculifolia*.

Na Figura 3.11 comparam-se os rendimentos globais dos extratos obtidos por extração com scCO₂, (SC) ,extração a baixa pressão com água (A) e com álcool (E), extração aquosa precedida pela supercrítica (SCA), extração etanólica precedida pela supercrítica (SCE), e os rendimentos acumulados: extração supercrítica + aquosa posterior à supercrítica (SC+SCA), extração supercrítica + etanólica posterior à supercrítica (SC+SCE). Os resultados foram calculados a partir das médias de experimentos conduzidos em triplicata.

Para as amostras de *B. dracunculifolia*, amostra 1 (Figura 3.11a) e amostra 2 (Figura 3.11b), as extrações que empregaram água como solvente, seja como etapa única de extração (A) ou como segunda etapa de extração posterior a extração supercrítica (SCA), destacaram sobre as demais, resultando em rendimentos globais ao redor de 20% contra 11 e 8% para a extração com etanol e com scCO₂. Assim, o caráter do solvente empregado influiu sobre o rendimento global, indicando alto teor de substâncias polares e obtendo-se alto rendimento global quando comparado com etanol (polaridade mais baixa do que a água) e scCO₂ (solvente apolar).

Os rendimentos dos processos de extração E e SC em etapa única da amostra AM1 não apresentaram diferenças significativas entre si, o qual indicaria que, para esta amostra, o CO₂ supercrítico tem igual poder solvente do que o etanol. Já no caso da amostra 2 (AM2) os três tratamentos iniciais (Figura 3.11b) apresentam diferenças significativas entre si quanto ao rendimento global, inferindo se que esta amostra apresenta diferença quando comparada com a amostra 1, indicando que há diferença quanto aos metabólitos secundários

extraíveis com os solventes água (A), etanol (E) e dióxido de carbono supercrítico (SC).

Tabela 3. 6 - Concentração e rendimentos de extração de fenólicos e Artepilin C em extratos de *B. dracunculifolia*.

AMOSTRA 1 (AM1)								
	Extrato	Rendimento Global (%) [*]	Fenóis Totais		Flavonoides Totais		Artepilin C	
			Conc (mg EAG/ g extrato)	Rend (mg /g mp)	Conc (mg EC/ g extrato)	Rend (mg/g mp)	Conc. (mg/ g extrato)	Rend. (mg /g mp)
etapa única	SC	8,0 ± 0,6	48,4 ± 0,3	3,8 ± 0,3	46 ± 1	3,7 ± 0,3	17,13	1,36
		1,7 ± 0,8 ^a						
	A	18,7 ± 1,1	142,3 ± 0,5	27 ± 2	116,9 ± 0,5	22 ± 1	2,00	0,37
	E	9,7 ± 0,8	197 ± 3	19 ± 2	47 ± 1	4,6 ± 0,5	5,39	0,52
duas etapas	SCA	20,6 ± 0,2	158 ± 10	32 ± 2	128,4 ± 0,6	26,4 ± 0,4	1,26	0,26
	SCE	5,7 ± 0,6	188 ± 21	10,0 ± 0,6	102 ± 6	5,9 ± 0,4	0,84	0,05
	SC+SCA ^{**}	30,1 ± 0,6	-	36 ± 2	-	30,1 ± 0,7	-	1,62
	SC+SCE ^{**}	15,3 ± 0,2	-	14 ± 1	-	9,6 ± 0,7	-	1,41
AMOSTRA 2 (AM2)								
etapa única	SC	8,1 ± 0,2	69 ± 2	5,5 ± 0,3	35 ± 2	2,8 ± 0,2	26,40	2,13
		1,2 ± 0,2 ^a						
	A	21,2 ± 1,4	132 ± 3	28 ± 2	121,8 ± 0,4	26 ± 2	2,84	0,60
	E	11,5 ± 0,2	176 ± 2	20,2 ± 0,5	56 ± 2	6,4 ± 0,4	10,54	1,21
duas etapas	SCA	20,70 ± 0,06	169 ± 6	35 ± 1	131 ± 1	27,1 ± 0,3	3,25	0,67
	SCE	6,4 ± 0,2	180 ± 32	11 ± 2	71 ± 15	4,5 ± 0,6	0,40	0,03
	SC+SCA ^{**}	29,9 ± 0,4		41 ± 1		29,9 ± 0,5		2,80
	SC+SCE ^{**}	15,6 ± 0,6		17 ± 2		7,3 ± 0,8		2,16

* Rendimento (%, b. s.) ** Rendimento acumulado (% b. s.), ^a Rendimento da fração volátil capturada no Porapak- Q (%, b.s.). Extratos supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

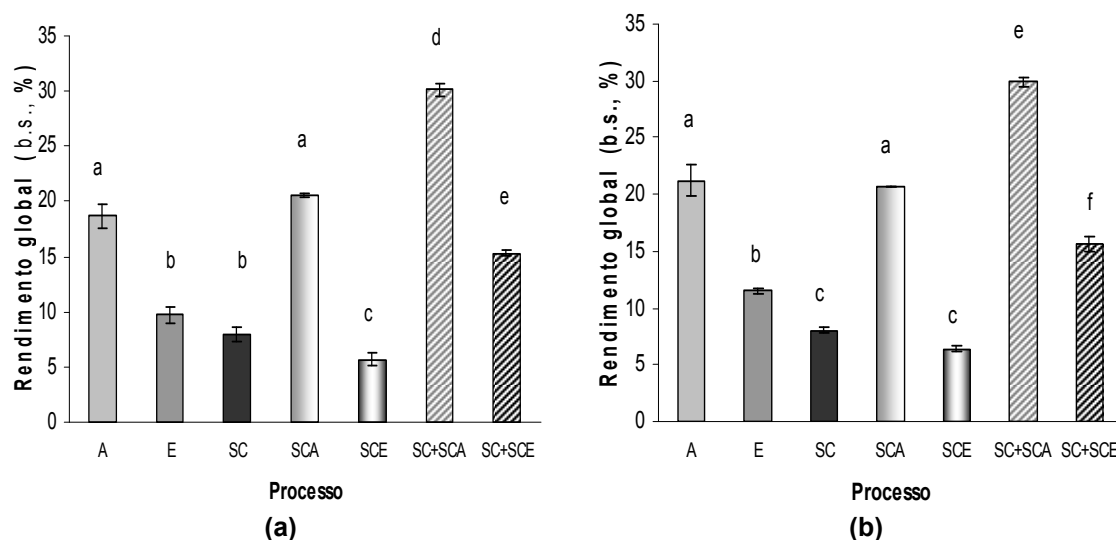


Figura 3.11 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração da *B. dracunculifolia*. (a) amostra 1, (b) amostra 2. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a 5% nível de significância).

Para as amostras 1 e 2, os resultados mostraram que a extração supercrítica (SC) prévia melhorou o rendimento da extração aquosa. Quando se considera a extração acumulada, tanto para a extração aquosa (SC+SCA) quanto para a etanólica (SC+SCE), houve diferenças apreciáveis entre estes processos.

A Tabela 3.7 relata os valores de rendimento global de extração, concentração e rendimento de fenóis e concentração e rendimento de flavonóides totais de extratos obtidos da amostra de folhas de *E. uniflora*.

Na Figura 3.12 estão apresentados os resultados dos diferentes processos empregados na extração das folhas de *E. uniflora*. Para esta matriz vegetal o caráter do solvente empregado influenciou bastante no processo de obtenção de substâncias extraíveis, pois o rendimento apresentou a tendência de aumento com o aumento da polaridade do solvente: extração aquosa (A) > extração etanólica (E) > extração scCO₂ (SC). Os solventes polares produzem altos rendimentos quando comparado aos solventes de baixa polaridade.

Tabela 3. 7 - Rendimentos de extração de *E. uniflora* nos diferentes processos estudados

Processo	Extrato	Rendimento Global(%)*	FT (mg EAG/ g exto)	Rendimento (mg FT /g folha)	FvT (mg EC/ g)	Rendimento (mg FvT /g folha)
etapa única	SC	3,5 ± 0,1 0,47 ± 0,01 ^a	51 ± 7	1,7 ± 0,3	63 ± 1	2,2 ± 0,1
	A	20 ± 2	138,9 ± 0,5	28 ± 2	38 ± 1	7,8 ± 0,7
	E	8,0 ± 0,1	407 ± 4	32,7 ± 0,7	46,5 ± 0,3	3,73 ± 0,07
duas etapas	SCA	21 ± 2	291 ± 15	61 ± 3	47,1 ± 0,9	9,9 ± 0,9
	SCE	4,2 ± 0,3	504 ± 15	21 ± 2	57 ± 4	2,4 ± 0,4
	SC+SCA**	25 ± 2		63 ± 3		12 ± 1
	SC+SCE**	8,1 ± 0,4		23 ± 2		4,6 ± 0,5

* Rendimento (% b.s.), ** Rendimento acumulado (% b.s.), ^a, rendimento da fração mais volátil capturada no Porapak-Q (% b.s.). FT: fenóis totais, FvT: flavonóides totais. Extratos supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

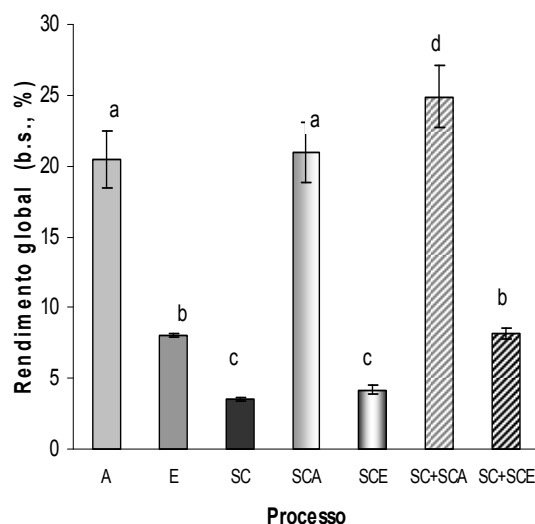


Figura 3.12 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração *E. uniflora*. As barras representam valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a 5% nível de significância).

A extração prévia com CO₂ supercrítico permitiu melhorar significativamente o rendimento acumulado quando ela é seguida da extração aquosa (SCA), não acontecendo o mesmo quando é usado etanol como 2ª etapa

extrativa (SCE), fato explicado pela natureza da matriz sólida e suas interações com os solutos, pois grande parte dos compostos solúveis são extraídos nos primeiros instantes na extração supercrítica, mostrando que compostos de baixa polaridade são extraídos na etapa SC, e possivelmente mudando as interações entre os solutos e a matriz sólida, ficando retidos compostos que deveriam ser extraídos com o etanol. Estes resultados concordam com o relatado por BENNER (1998) e GRIGONIS et al. (2005), os quais sugerem que a extração prévia de compostos lipofílicos com scCO_2 pode promover alterações entre as interações entre compostos e a matriz residual dificultando ou facilitando a sua extração posterior. Deve-se também mencionar que a extração prévia com scCO_2 promove também uma alteração na estrutura da matriz sólida devido ao emprego de alta pressão e posterior despressurização, como parecem indicar as micrografias da Figura 3.10.

Cinética de extração supercrítica

As curvas de extração supercrítica obtidas em triplicata a 400 bar, 60 °C e usando $4,0 \cdot 10^{-5}$ kg/s de scCO_2 estão apresentadas nas Figuras 3.13a (amostra 1) e 3.13b (amostra 2) para as folhas de *B. dracunculifolia* e na Figura 3.14 para as folhas de *E. uniflora* (os dados experimentais obtidos estão apresentados no Apêndice C). No caso da extração de *E. uniflora*, foram feitas duas curvas de extração (teste 1 e 2) e uma extração total (teste 3) para se obter um único extrato. Estas curvas mostram o rendimento de extrato acumulado em função da massa de solvente usada na extração, indicando com isso a facilidade ou a dificuldade com que os solutos são extraídos. Tendo em vista que a extração é influenciada pela solubilidade dos solutos no scCO_2 , tamanho das partículas e difusividade dos solutos e solvente na matriz sólida, a natureza dos solutos e o tamanho das partículas são determinantes para essas curvas.

As Figuras 3.13 e 3.14 mostram uma boa reprodutibilidade dos experimentos, apenas o teste 3 da extração de *B. dracunculifolia* da amostra 1 (Figura 3.13a) produziu resultados com rendimento menor e com isso gerando um

desvio médio de aproximadamente 8% nos rendimentos globais, bem acima do desvio de 2,4% da amostra 2. As curvas de extração para as folhas de *B. dracunculifolia* e para as folhas de *E. Uniflora* mostram ser diferentes entre si, pois se obtém para a *E. uniflora* mais de 90% da extração (90% do rendimento global) com apenas 200 g de CO₂ enquanto que para *B. dracunculifolia* se extrai ao redor de 60% com essa mesma quantidade. Como os diâmetros médios das partículas dessas duas matrizes são praticamente iguais (vide Tabela 3.5), a diferença pode ser explicada pela natureza dos extratos e pela estrutura da matriz. No caso da *E. uniflora* os compostos extraídos com scCO₂ são predominantemente terpenóides (Peixoto et al., 2009) enquanto que para a *B. dracunculifolia* predominam compostos fenólicos (Piantino et al, 2008), que são menos solúveis que terpenóides.

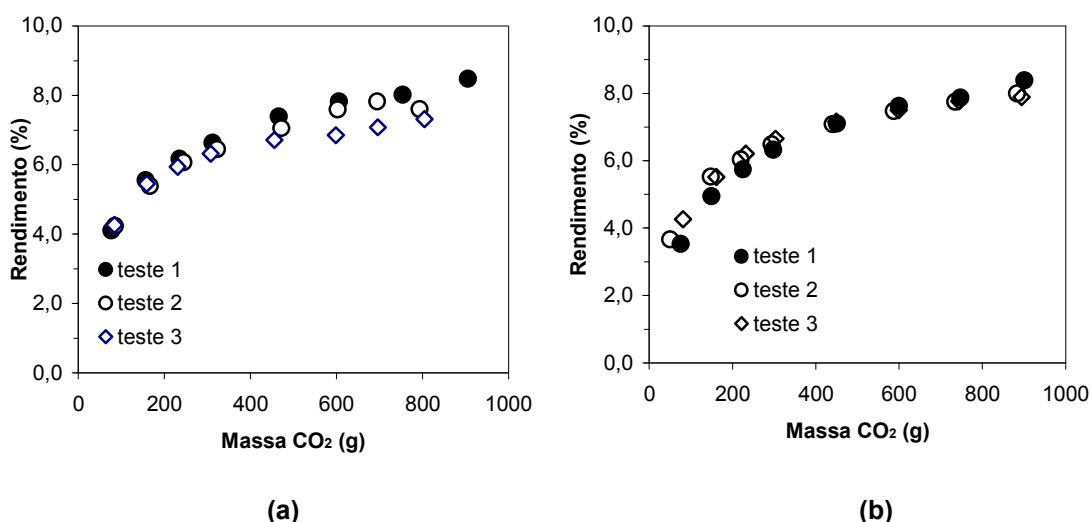


Figura 3.13 - Rendimentos e cinéticas de extração com CO₂ supercrítico da *B. dracunculifolia*. (a) amostra 1, (b) amostra 2.

Pode se observar que o rendimento de extração de *B. dracunculifolia* aumenta gradativamente a uma taxa crescente no início da extração e parece atingir uma taxa constante nos pontos finais da curva, o que indicaria que a matriz vegetal não foi totalmente esgotada durante o processo, indicando predomínio do

efeito difusional interno às partículas e possivelmente a menor solubilidade dos compostos mais pesados extraídos no final do processo.

Nos primeiros estágios do processo (Figura 3.14) da extração supercrítica de *E. uniflora*, entre 0 e 145 g CO₂ (o qual representa a primeira hora de processo), pode se observar uma alta taxa de remoção de extrato, depois desta fase, a curva parece atingir rapidamente um valor constante, o qual seria um indicativo que a matriz vegetal foi praticamente esgotada dos solúveis em scCO₂. A cinética do processo de extração indicaria que os compostos solúveis são facilmente extraíveis, e apresentando baixa resistência à transferência de massa.

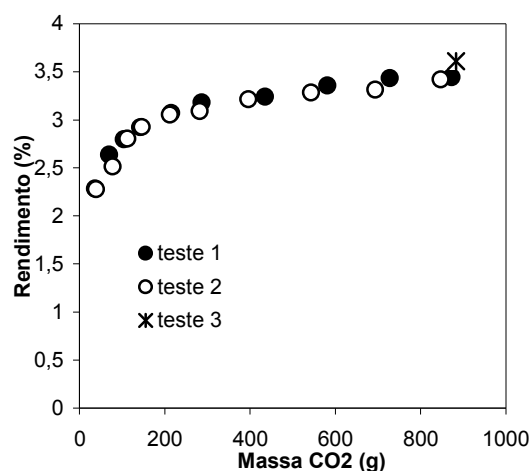


Figura 3.14 - Cinética e rendimentos na extração com CO₂ supercrítico da *E. uniflora*

3.5.3 Fenóis totais

Na Figura 3.15 comparam-se os conteúdos de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos obtidos a partir das folhas de *B. dracunculifolia* (AM1 e AM2) e de folhas de *E. Uniflora*, e na Figura 3.16 os respectivos rendimentos de extração, cujos dados são reportados nas Tabelas 3.6 e 3.7.

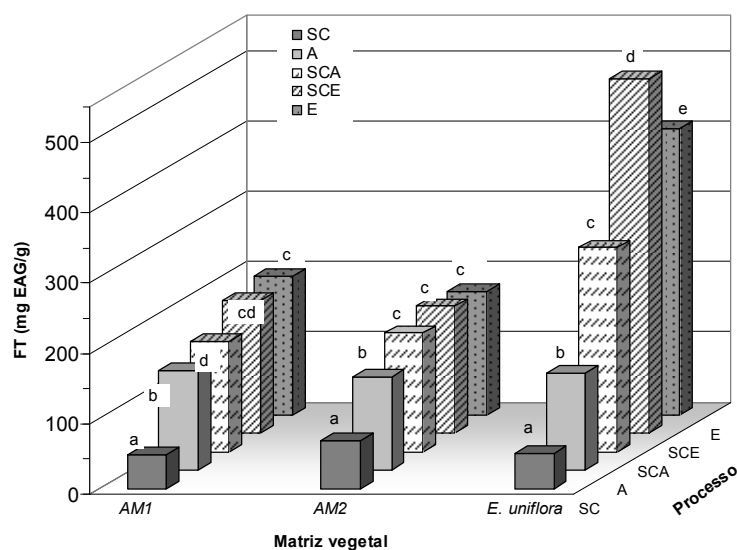


Figura 3.15 - Conteúdo de fenóis totais. As barras representam valor da média dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Na figura 3.15 pode ser observado o conteúdo de fenóis totais (mg EAG/g ext) para cada um dos extratos obtidos em uma ou em duas etapas. O teor de fenóis totais variou dependendo da matriz vegetal entre 48,4 e 197 mg EAG/g (para AM1), 69 e 180 mg EAG/g (para AM2) e 51 e 504 mg EAG/g (para *E. uniflora* L.), destacando se esta última matriz pelo alto teor de compostos fenólicos nos seus extratos, dados concordantes com os dados reportados por Peixoto (2008).

O processo em uma etapa é fortemente dependente da polaridade do solvente, onde as substâncias de carácter fenólico ficaram mais concentradas em primeiro lugar nos extratos etanólicos, depois nos extratos aquosos, e por fim, nos extratos supercríticos, tanto para a *B. dracunculifolia* quanto para a *E. uniflora*. Estes resultados sugerem a presença de compostos fenólicos de diferente polaridade nestas matrizes vegetais, sendo que no caso de *B. dracunculifolia*, a maioria deles são de carácter polar por causa de pouca diferença entre o teor de

fenóis entre os extratos E e A. No caso do extrato de *E. uniflora*, a concentração no extrato etanólico é bem superior do extrato aquoso.

O processo em duas etapas permite obter extratos aquosos mais concentrados em compostos fenólicos que o processo uma etapa única (SCA > A). O rendimento global de extração continua elevado na segunda etapa, mantendo a mesma ordem de grandeza do rendimento da extração aquosa convencional, portanto há um considerável aumento no rendimento de extração de fenólicos totais com a extração aquosa posterior à extração supercrítica. No caso da *B. dracunculifolia*, o rendimento de extração de fenólicos totais passa de aproximadamente 28 para 35 mg/g (AM2), e no caso da *E. uniflora*, o rendimento passa de 28 para 61 mg/g. Tanto nos processos de uma etapa quanto nos de duas etapas, os extratos obtidos com etanol (SCE, E) tiveram maior teor de substâncias fenólicas.

No caso da extração etanólica em duas etapas, o rendimento global de extração é menor na segunda etapa quando comparada à extração etanólica convencional. Na *B. dracunculifolia* as concentrações nos extratos obtidos em uma etapa ou em duas etapas são praticamente iguais, no entanto, devido à diminuição do rendimento global de extração, o rendimento de fenólicos totais diminui. No caso da *E. uniflora*, ocorre um aumento considerável na concentração de 407 para 504 mg/g, quando passamos da extração etanólica convencional para a extração etanólica posterior à extração supercrítica; no entanto devido à redução drástica no rendimento global de 8 para 4,2 %, diminuiu o rendimento de fenólicos totais de 33 para 21 mg/g .

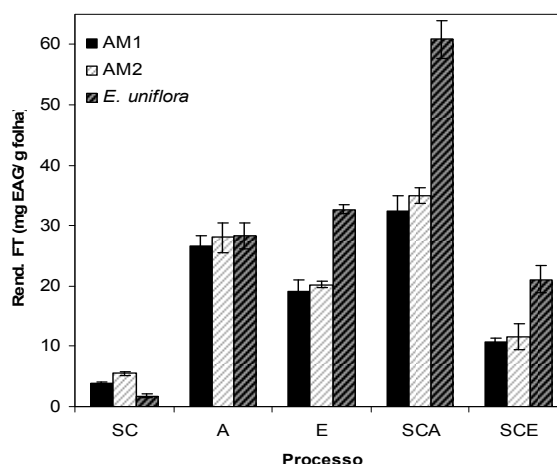


Figura 3.16 - Rendimento de extração de fenóis totais. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Comparando os valores de rendimentos totais de fenólicos pela Figura 3.16 e Tabelas 3.6 e 3.7, comprova-se que, no geral, os extratos aquosos foram maiores, principalmente em duas etapas com scCO_2 . Este resultado é previsível tendo em vista que as extrações aquosas são mais eficientes na extração de fenólicos, o qual é de se esperar por causa da polaridade da água (constante dielétrica 66,62), comparada com a do etanol (constante dielétrica 24,16) e do CO_2 supercrítico (constante dielétrica de 1 - 2). Estes resultados sugerem o uso de extração supercrítica seguida de extração aquosa se desejar-se extrair o máximo de fenólicos, ou extração etanólica posterior à extração supercrítica se desejar-se extratos mais concentrados em fenólicos totais. Estes resultados concordam com a tendência observada em teor de polifenóis em extração de chá mate e chá preto (TURKMEN et al., 2006).

Sousa (2007) identificou 14 substâncias de caráter fenólico em extratos hidroalcoólicos de folhas de *B. dracunculifolia*: ácido cafeíco, ácido cumárico, ácido ferúlico, aromadendrina-4'-metil eter, isosakuranetina, artepillin C, bacarina e veratraldeído, destacando como composto majoritário o ácido cafeíco. Em

extratos metanólicos das folhas da *E. uniflora* foi reportada a presença dos taninos eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2 (LEE et al., 1997)

3.5.4 Flavonóides totais

Na Figura 3.17 e Tabelas 3.6 e 3.7, comparam-se os conteúdos de flavonóides dos diferentes extratos obtidos a partir da *B. dracunculifolia* (AM1 e AM2) e da *E. Uniflora*. O teor de flavonóides totais variou entre 46 e 128 mg EC/g (para AM1), 35 e 131 mg EC/g (para AM2) e 38 e 63 mg EC/g (para *E. uniflora* L.).

Para as extrações de *B. dracunculifolia* obtidas em uma única etapa, os extratos aquosos foram os mais concentrados em flavonóides, seguidos pelos etanólicos e supercríticos, sendo que, para a amostra AM1, estes dois últimos extratos foram da mesma ordem de grandeza. Mas se considerarmos o rendimento de extração, os extratos etanólicos foram superiores aos supercríticos. Para a amostra AM2, o extrato etanólico foi mais concentrado que o supercrítico. A extração prévia com scCO₂ melhora um pouco o rendimento da extração aquosa em uma segunda etapa posterior à supercrítica.

Observa-se também que no caso da extração supercrítica (Tabela 3.6), a concentração de flavonóides é aproximadamente igual à concentração de fenóis totais da amostra AM1. Como os flavonóides estão incluídos nos fenóis totais, a concentração de flavonóides deve ser inferior ou igual a de flavonóides totais. No caso das extrações supercríticas, os valores foram de 48 e 46 mg/g para fenóis e flavonóides respectivamente na amostra AM1 de *B. dracunculifolia*, de 69 e 35 na amostra AM2 de *B. dracunculifolia* que são folhas mais novas, mostrando maior conteúdo de fenóis totais que flavonóides. No caso da *E. uniflora*, obteve-se um valor aparentemente incoerente de 51 ± 7 mg/g para fenóis totais e um valor maior de 63 ± 1 para flavonóides, no entanto o alto desvio obtido de 7 para os fenóis totais pode explicar essa diferença, sendo que a concentração de fenóis totais deve ser da ordem de 51 mg/g.

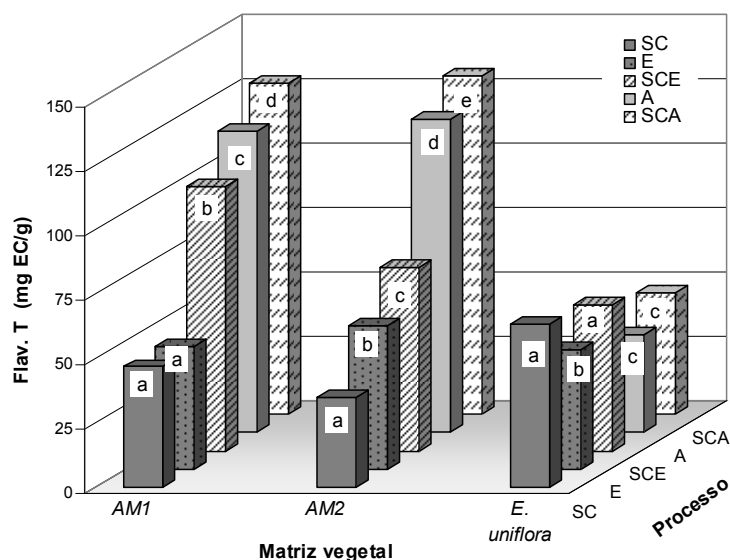


Figura 3.17 - Conteúdo de flavonóides totais. As barras representam valor da média dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Nos extratos de *E. uniflora* obtidos em processo de etapa única, a concentração de flavonóides foi maior nos extratos supercríticos, em segundo lugar no extrato etanólico e por último no extrato aquoso; no entanto, quando se considera o rendimento de extração, o resultado se inverte: a extração aquosa é superior, em seguida a etanólica e por fim a supercrítica. Isto se deve a grande diferença dos rendimentos globais. Para o processo em duas etapas, tem-se um aumento de 46,5 para 57 mg EC/g quando se passa do extrato etanólico em 1 etapa para o processo de 2 etapas, no entanto com diminuição do rendimento de 3,73 para 2,4 mg/g de folhas. Para a extração com água, ocorre um aumento na concentração e no rendimento. O efeito da extração prévia com CO₂ supercrítico no esquema de processo em duas etapas permite obter extratos com maior conteúdo de flavonóides totais, além de se produzir extratos com características diferentes.

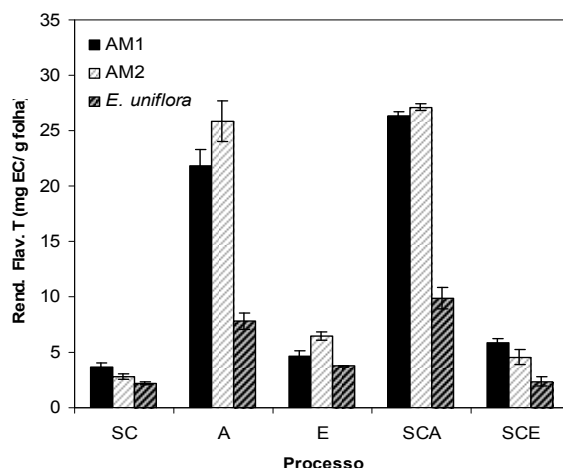


Figura 3.18 - Rendimento de extração de flavonóides totais. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

3.5.5 Teor de ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C) nos extratos de *B. dracunculifolia*

A Tabela 3.6 e Figura 3.19 mostram valores de concentração do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C) nos extratos de *B. dracunculifolia*, que foi quantificado mediante HPLC-FR. Mostra também o valor calculado do rendimento de extração em cada um dos processos estudados.

As maiores concentrações e rendimentos de artepillin C foram obtidos nos extratos supercríticos (SC), com valores de 17,13 mg/g para a amostra AM1 e de 26,40 mg/g para a amostra AM2 (Tabela 3.6). Em seguida a extração foi melhor com etanol e por último com água. No entanto, a extração aquosa usando-se o processo combinado (extração aquosa após scCO₂) foi melhor em termos de concentração e rendimento que a etanólica após scCO₂.

A amostra AM2 de *B. dracunculifolia*, compreendida por folhas mais jovens e em estado prévio à floração, apresentam maior concentração de artepillin C nos seus extratos e maiores rendimentos de extração quando comparados com a

amostra de folhas desenvolvidas (AM1) (Figura 3.19b). Este tipo de comportamento pode estar associado à sazonalidade dos metabólitos secundários nos diferentes estágios de maturidade. Park et al. (2004) relataram valores de 40,54 , 13,75 e 1,68 mg de artepillin C/ g de extrato em extratos etanólicos de brotos, de folhas em estado de desenvolvimento e em folhas desenvolvidas, respectivamente. Piantino et al. (2008) relataram valores de 7,84 mg artepillin C/ g para extratos etanólicos e 20,13 mg artepillin C/g para extrato supercrítico obtido de amostras equivalentes à AM1 desse trabalho, mas de acesso diferente e colhida em época diferente, mas nas mesmas condições de extração supercrítica deste trabalho, de 400 bar e 60 °C. No geral, os valores de concentração e de rendimento de extração supercrítica e etanólica para Artepillin C deste trabalho e dos valores relatados por Piantino et al. (2008) concordam entre si em termos da vantagem da extração supercrítica para a extração desta substância, onde a extração com scCO₂ produz extratos da ordem de 2,5 a 3 vezes mais concentrados que os extratos etanólicos e com rendimentos ao redor de 2 vezes superiores.

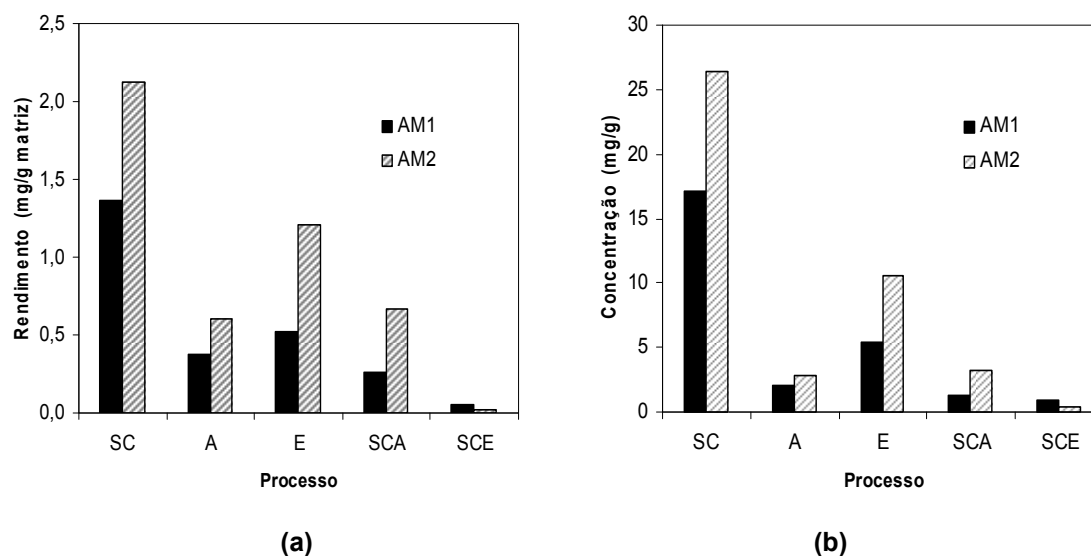


Figura 3.19 - Extração de artepillin C nas amostras de *B. dracunculifolia*. (a) rendimento de extração, (b) concentração de artepillin C. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Processos em duas etapas que envolvem água como solvente na segunda extração são mais vantajosos que uma segunda etapa com etanol, pois produzem um segundo extrato com alto rendimento e de maior concentração de artepillin C que um segundo extrato de etanol; além de ser mais concentrado em fenóis e flavonóides totais.

As Figuras 3.20 e 3.21 representam os cromatogramas dos extratos obtidos a partir das amostras AM1 e AM2, respectivamente. Nos cromatogramas são observados um número alto de compostos com diferentes tempos de retenção nos extratos E, SCE. No entanto as amostras aquosas (A, SCA) apresentam perfil rico em compostos com tempos de retenção baixos. Diferenças na seletividade dos solventes usados nos processos de extração explicam as mudanças na composição dos extratos das duas amostras de *B. dracunculifolia* estudadas.

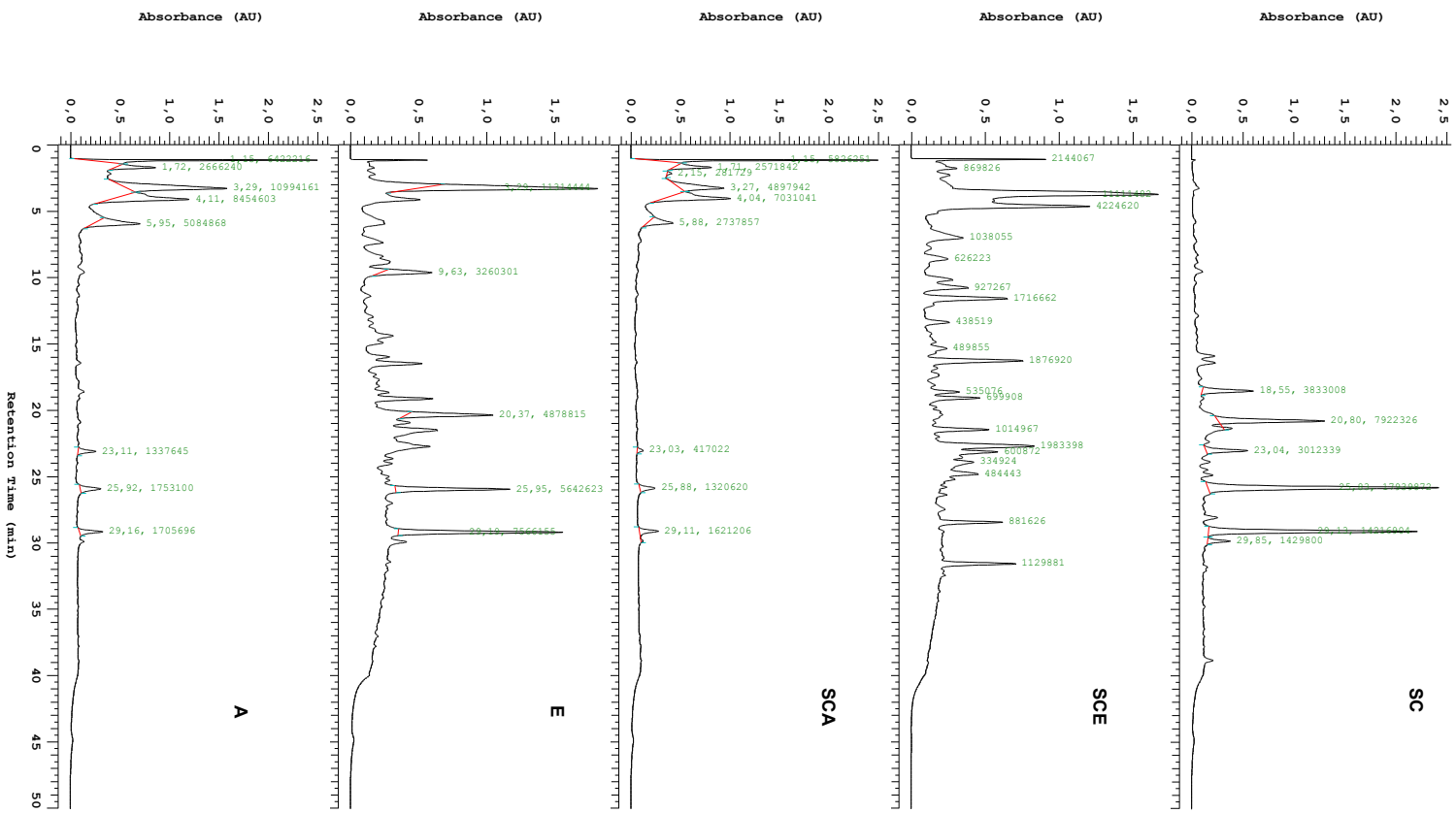


Figura 3.20 - HPLC-FR dos extratos obtidos para amostra AM1.

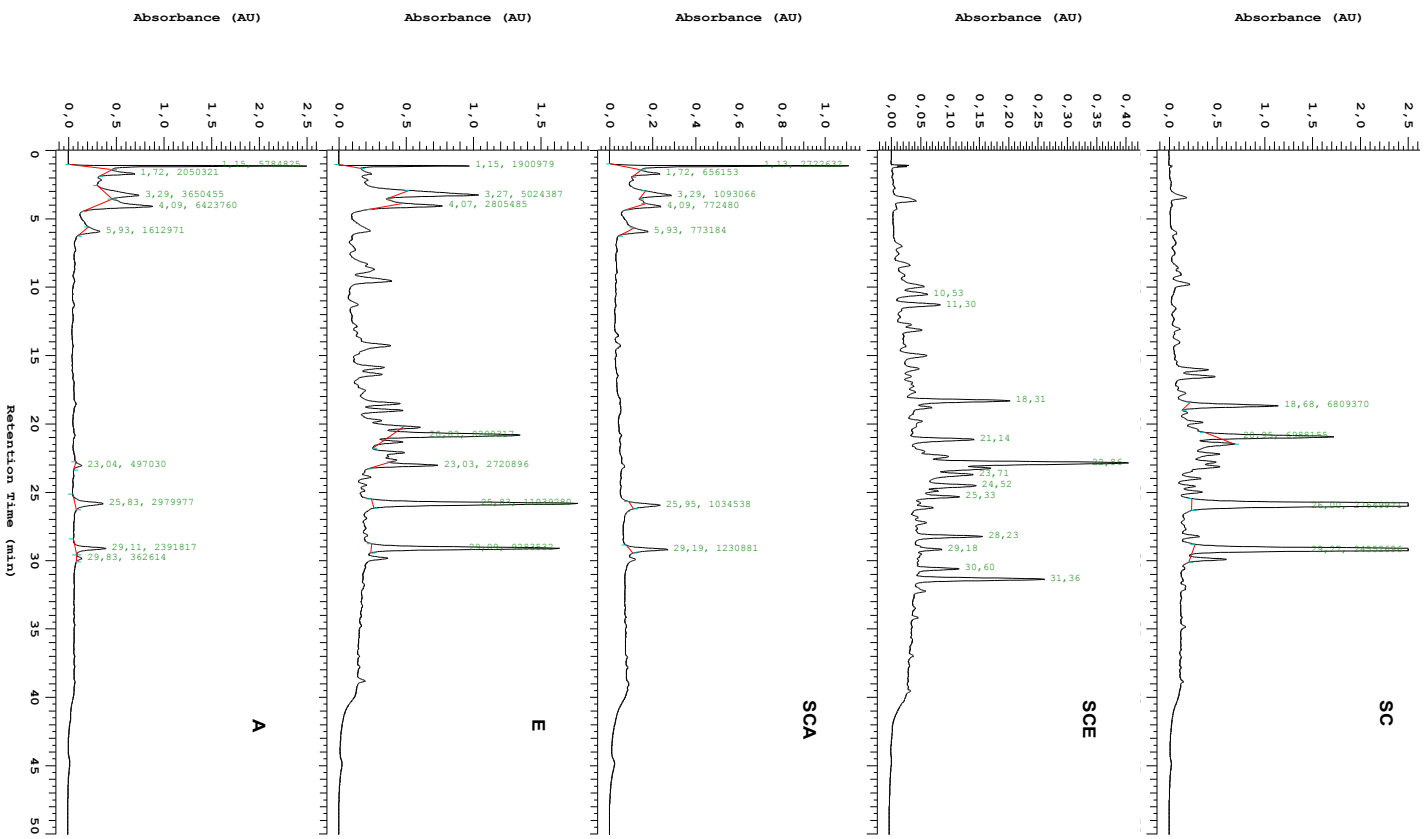


Figura 3.21 – HPLC-FR dos extratos obtidos para amostra AM2

A Figura 3.22 mostra as curvas de extração de artepillin C com scCO₂ das duas amostras de *B. dracunculifolia*. Grande diferença foi observada na extração do artepillin C entre estas duas amostras. A extração foi rápida na amostra AM1, na qual, aproximadamente 200 g de CO₂ (70 min) extraem praticamente todo o Artepillin C, enquanto que, para a amostra AM2 com 900 g de CO₂ (360 min); ainda continua extraindo, isto provavelmente se deve ao maior conteúdo de artepillin C. Os correspondentes cromatogramas estão apresentados no Apêndice D.

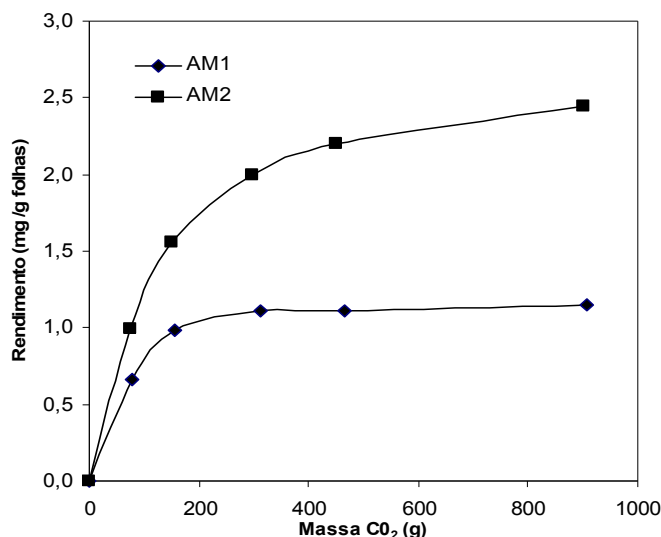


Figura 3.22 - Rendimento de extração de Artepillin C. nas amostras de *B. dracunculifolia*.

3.5.6 Caracterização da fração mais volátil (CG-EM)

A fração volátil retida na armadilha de Porapak- Q ao longo da extração supercrítica Foi recuperada e analisada quanto à composição química (de acordo com a Seção 3.4.3.3) para as duas amostras da *B. dracunculifolia* e amostra de *E. uniflora*, os resultados estão apresentados nas Tabelas 3.8 e 3.9; os correspondentes cromatogramas no Apêndice E.

As amostras de *B. dracunculifolia* apresentaram rendimento da fração volátil (base seca) de $1,7 \pm 0,8$ % para a amostra AM1 e $1,2 \pm 0,2$ % para a amostra AM2. O rendimento da fração rica em compostos voláteis das duas amostras foi superior ao valor de 0,6 % (b.s.) obtido por Massignani et al. (2009) pelo método de hidrodestilação; 0,27 % (b.s) obtidos por Queiroga et al. (2008) pelo método de arraste a vapor; 0,21 % (b.u) relatado por Lago et al. (2008) pelo método de hidrodestilação; 0,32 a 0,34% (base não reportada) descrito por Frizzo et al (2008) pelo método de hidrodestilação; 0,36% e 0,38% relatado por Cassel et al. (2000) obtido por hidrodestilação e extração com scCO_2 . Estas diferenças estão associadas ao método de extração e a possíveis características da amostra, como diferenças em parâmetros microclimáticos, altitude, maturidade e idade da planta junto com disponibilidade de nutrientes (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). As condições do processo ao longo da extração supercrítico (60 °C/ 400 bar) poderiam ter permitido que parte da fração pesada fosse arrastada para a armadilha de adsorvente (Porapak-Q).

A composição química da fração rica em compostos voláteis apresenta perfil similar para as duas amostras, com algumas variações na presença/ausência de compostos e/ou na quantidade dos mesmos (Tabela 3.8). Destacam-se como compostos majoritários nas duas amostras: germacreno D (12,99 e 8,79 %), trans-cariofileno (6,81 e 7,71 %), nerodilol (5,73 e 6,50 %). Estes compostos são também reportados como majoritários por Piantino (2008) em amostras de folhas *B. dracunculifolia*. Diferenças no estado de maturidade da folha pode ter causado a ausência do biciclogermacreno na AM1 e γ -elemeno na AM2. Diferentes pesquisadores relataram a presença destes e outros compostos (LOAYZA et al 1995, SOUSA, 2007, PIANTINO 2008, MASSIGNANI et al., 2009, SCHOSSLER et al., 2009).

Tabela 3. 8 - Composição da fração rica em compostos voláteis de *B. dracunculifolia* (AM1 e AM2).

Pico	Composto	tr (min)	IR ^a	IR ^b	Obs	% Relativa	
						AM1	AM2
1	limoneno	7,80	1028	1031	EM	0,45	0,51
2	*	8,5	1049			1,02	1,50
3	*	8,70	1054			0,44	0,71
4	α - cubebeno	20,42	1349	1351	EM	0,49	1,47
5	Ylangeno	21,29	1370	1375	EM	tra	0,49
6	α -copaeno	21,48	1375	1376	EM	0,47	1,13
7	β -cubebeno	22,08	1389	1388	EM	0,25	0,22
8	α -gurjuneno	22,86	1408	1409	EM	0,81	1,10
9	trans-cariofileno	23,25	1418	1418	EM	6,81	7,71
10	β -copaeno	23,64	1428	1432	ADAMS/EM	nd	0,78
11	aromadendreno	24,02	1437	1441	EM	0,87	2,70
12	α - cariofileno	24,6	1451	1454	EM	1,36	1,48
13	allo-						
	aromadendreno	24,86	1458	1460	NIST-EM	0,38	0,62
14	-	24,99	1461				0,51
15	γ -muuroleno	25,58	1476	1479	NIST-EM	0,53	1,86
16	germacreno D	25,75	1480	1485	NIST-EM	12,99	8,79
17	-	25,81	1481			nd	1,03
18	γ -himacheleno	25,82	1482	1482	ADAMS/EM	0,86	nd
19	β -selineno	25,91	1484	1490	NIST-EM	nd	0,49
20		26,14	1490			nd	0,32
21	biciclogermacreno	26,35	1495	1500	EM	nd	8,22
22	γ -elemeno	26,37	1496	1476	EM	11,49	nd
23	α -muuroleno	26,51	1499	1500	EM	0,33	0,65
24	-	26,67	1503			0,52	0,34
25	γ -cadineno	27,03	1513	1513	EM	1,36	nd
26	t-cadineno	27,03	1520		NIST-EM	nd	2,12
27	δ -cadineno	27,41	1522	1524	EM	2,15	nd
28	γ -cadineno	27,42	1523	1523	EM	nd	3,74
29	nerodilol	29,02	1564	1563	EM	5,73	6,50
30	espatulenol	29,45	1576	1578	EM	3,81	4,55
31	-	29,67	1581			0,53	0,84

^a calculado, ^b reportado por Adams (1995), **tr**: tempo de retenção, **IR**: índice de retenção, **Obs**: tipo de identificação por comparação com espectro de massa obtidos por Adams (**EM**), ou base de dados de NIST (**NIST-EM**), **tra**: traço, **n.d**: não detectado, - não identificado * contaminante.

Foi recuperada a fração volátil ao longo da extração supercrítica da *E. uniflora*. O rendimento da fração volátil (base seca) foi $0,47 \pm 0,01$ %. Peixoto et al. (2009) relataram rendimentos de $0,54 \pm 0,04$ % e 0,1 % na extração de folhas de pitanga por hidrodestilação e fração mais volátil capturada em Porapak-Q da extração com scCO_2 (100–300 bar, 50 – 60 °C). Melo et al. (2007) relataram valores entre 0,5 e 1%, na extração de óleo volátil de diferentes amostras de

folhas pelo método de destilação por arraste a vapor. Galhiane et al. (2006) relataram rendimento de 0,42 % pelo método de hidrodestilação. Maia et al. (1999) relataram 1,8 %, Moraes et al. (1996) descreveram 0,74 % e Weyerstahl et al. (1988) 1,0 %.

Desprezando os contaminantes presentes na amostra da fração volátil analisada, a análise por GC-EM apresenta como compostos majoritários a selina-1,3-7(11)-trien-8-epóxido (15,54 %) e selina-1,3-7(11)-trien-8-ona (11,59 %), na sequência aparecem germacreno-B, germacreno-D e trans-cariofileno (Tabela 3.9). Segundo Weyersthal et al. (1988) esta amostra de *E. uniflora* corresponderia ao quimiotipo I, o qual possui em predominância destes dois sesquiterpenos da Selina. Estes compostos também foram encontrados na fração volátil de extratos supercríticos de folhas de pitanga (MORAIS et al., 1996, OGUNWANDE et al., 2005).

Tabela 3. 9 - Composição da fração rica em compostos voláteis da *E. uniflora*

Pico	Composto	tr (min)	IR ^a	IR ^b	Obs	% Relativa
1	β-mirceno	6,63	991	990	NIST-EM	0,47
2	*	8,53	1049			21,34
3	*	8,72	1055			10,12
4	*	8,91	1061			1,83
5	*	9,74	1085			0,46
6	copaeno	21,48	1375	1375	NIST-EM	1,10
7	β-elemeno	22,17	1391	1389	EM	0,97
8	trans-cariofileno	23,26	1418	1419	EM	6,38
9	-	23,86	1433			0,67
10	α- humuleno	24,60	1451	1452	EM	0,54
11	germacreno D	25,74	1480	1485	EM	7,70
12		26,35	1495			5,97
13	-	26,67	1503			1,46
14	δ- cadineno	27,41	1522	1522	EM	0,73
15		28,68	1556			9,32
16	espatulenol	29,44	1575	1578	NIST-EM	0,80
17	trien-8-ona	31,50	1631	1634 ^c	^c	11,59
18	trien-8-epóxido	36,62	1745	1748 ^c	^c	15,54
19	-	38,85	1839			1,41
20	-	44,9	2027			1,09

^a calculado, ^b reportado por Adams (1995), ^c IR a partir de Costa et al. (2009), **tr**: tempo de retenção, **IR**: índice de retenção, **Obs**: tipo de identificação por comparação com espectro de massa obtidos por Adams (**EM**), ou base de dados de NIST (**NIST-EM**), - não identificado * contaminante.

3.5.7 Atividade antioxidante dos extratos

Método do DPPH

A capacidade de sequestro do radical DPPH expresso como atividade antioxidante (AA%) dos extratos de *B. dracunculifolia* (AM1, AM2) e *E. Uniflora*, foi analisada na faixa de concentração entre 0–250 µg/mL (Figura 3.23 e Apêndice F). Nos extratos da *B. dracunculifolia*, tanto AM1 (Figura 3.23a) quanto AM2 (Figura 3.23b), todos os extratos apresentaram comportamento crescente de AA com o acréscimo da concentração para toda a faixa de concentração estudada e tendência não linear na maior parte deles.

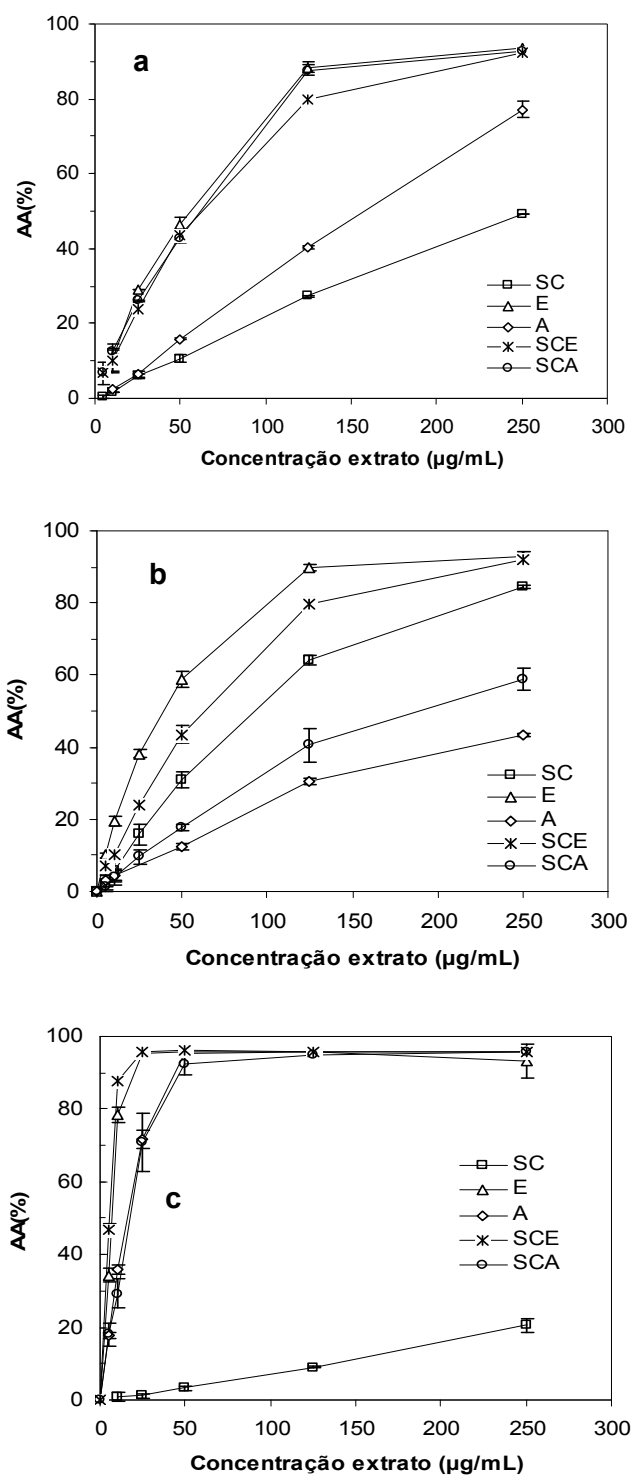


Figura 3.23 - Atividade de sequestro do radical DPPH nos extratos. **(a)** AM1, **(b)** AM2, **(c)** *E. uniflora*. Os valores representam média $\pm$ DP. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

No caso da *E. uniflora* os resultados da capacidade sequestrante do radical DPPH (AA) estão apresentados na Figura 3.23c, na qual é possível observar que, para todos os extratos exceto SC, os valores de AA crescem rapidamente com a concentração de extrato até atingir um máximo (aproximadamente 96%), região na qual os extratos apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos : SCE -E e SCA - A. Depois de atingido este máximo o valor da AA é praticamente constante não apresentando mais diferenças significativas entre os diferentes processos ($p < 0,05$). Todos os extratos apresentaram comportamento crescente de AA com o acréscimo da concentração para toda a faixa de concentrações estudadas e com tendência não linear em todos os extratos, exceto SC. Vale mencionar que os processos nos quais o etanol foi empregado tanto em etapa única (E) quanto na segunda etapa (SCE), não apresentaram diferenças significativas na curva dose-resposta, caracterizando-se por uma alta capacidade sequestrante do radical DPPH. A relação entre concentração de extrato e AA% no extrato SC foi praticamente linear, com valores de r^2 de 0,9948 , o qual é típico dos extratos obtidos com solventes de baixa polaridade (de CAMPOS et al., 2008).

Cálculo da concentração efetiva (CE₅₀)

A partir dos resultados de atividade antioxidante foram calculados valores de CE₅₀ para o método de DPPH, com os diferentes tipos de regressão, junto com os valores de coeficiente de determinação (r^2) e raiz quadrada do erro médio (RSME), dados apresentados nas tabelas 3.10 a 3.12. As Figuras 3.24a e 3.24b, representam as curvas dose-resposta dos extratos supercrítico (SC) e etanólico (E) da *B. dracunculifolia* (AM1).

A partir destes gráficos é possível observar as respostas para AA em função da concentração dos extratos. Dependendo do extrato estudado e da sua composição química, a relação entre AA e a concentração do antioxidante (extrato) pode apresentar comportamento linear ou não linear na faixa de concentração estudada, comportamento este determinado pela natureza dos

Tabela 3. 10 - Valores do CE_{50} para os extratos de *B. dracunculifolia* (AM1) com os diferentes modelos de regressão.

MÉTODO	SC		A		E		SCE		SCA	
	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*
Linear FL	248,6 ± 0,5 ^a	0,9967 (0,971)	161 ± 3 ^a	0,9987 (0,936)	52 ± 2 ^a	0,9845 (2,107)	57 ± 2 ^a	0,9969 (1,441)	55 ± 3 ^a	0,983 (1,981)
Linear FC	248,6 ± 0,5 ^a	0,9967 (0,971)	161 ± 3 ^a	0,9987 (0,936)	94 ± 3 ^b	0,831 (14,691)	84 ± 2 ^b	0,8872 (11,427)	97 ± 1 ^b	0,8476 (8,979)
Exp	254 ± 2 ^a	0,9992 (0,477)	158,2 ± 0,9 ^a	0,9988 (0,891)	51 ± 3 ^a	0,9924 (3,1)	55 ± 3 ^a	0,9976 (3,417)	53,58 ± 0,03 ^a	0,9894 (3,638)
Exp FA	255 ± 2 ^a	0,9995 (0,376)	157,7 ± 0,9 ^a	0,9990 (0,603)	50 ± 3 ^a	0,9858 (2,996)	53 ± 4 ^a	0,9808 (2,454)	53,37 ± 0,06 ^a	0,9793 (3,620)
L3P	284 ± 12 ^b	0,9997(0,344)	144 ± 2 ^b	0,9999 (0,335)	51 ± 2 ^a	0,9954 (3,393)	56 ± 2 ^a	0,9983 (3,170)	55,1 ± 0,4 ^a	0,9993 (4,096)
L4P	255 ± 1 ^a	0,9996 (0,330)	155 ± 2 ^a	0,9999 (0,318)	49 ± 2 ^a	0,9919 (3,069)	53 ± 3 ^a	0,9933 (3,403)	52,8 ± 0,3 ^a	0,9887 (3,769)

Valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, na mesma coluna letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

* Coeficiente de determinação, r^2 ; raiz quadrada do erro médio RSME (entre parêntese).

Tabela 3. 11 -. Valores do CE_{50} para os extratos de *B. dracunculifolia* (AM2) com os diferentes modelos de regressão.

MÉTODO	SC		A		E		SCE		SCA	
	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*	CE_{50} (µg/mL)	ajuste*
Linear FL	94 ± 4 ^a	0,9883 (2,410)	270 ± 2 ^a	0,9654 (3,174)	40 ± 2 ^a	0,9697 (4,266)	39 ± 1 ^a	0,9805 (3,087)	196 ± 13 ^a	0,967 (3,775)
Linear FC	126 ± 4 ^b	0,9327 (7,905)	270 ± 2 ^a	0,9654 (3,174)	83 ± 2 ^b	0,7699(16,768)	80 ± 2 ^b	0,7565 (17,802)	196 ± 13 ^a	0,967 (3,775)
Exp	91 ± 7 ^a	0,9992 (0,830)	362 ± 17 ^{ab}	0,9944 (1,176)	36 ± 2 ^a	0,9982 (1,436)	35 ± 2 ^a	0,9978 (1,631)	183 ± 22 ^a	0,9988 (0,715)
Exp FA	887 ± 4 ^a	0,9988 (0,728)	350 ± 12 ^{ab}	0,9904 (1,102)	37 ± 2 ^a	0,9970 (1,331)	35 ± 2 ^a	0,9976 (1,616)	182 ± 22 ^a	0,9980 (0,641)
L3P	90 ± 5 ^a	0,9997 (0,732)	-	0,9948 (1,617)	40 ± 2 ^a	0,9974 (2,10)	38 ± 2 ^a	0,9971 (2,705)	157 ± 16 ^a	0,9996 (0,523)
L4P	86 ± 4 ^a	0,9996 (0,642)	403 ± 98 ^b	0,9957 (1,045)	35 ± 2 ^a	0,9954 (2,325)	36 ± 0,00 ^a	0,9947 (2,568)	179 ± 23 ^a	0,9995 (0,485)

Valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, na mesma coluna letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

* Coeficiente de determinação, r^2 ; raiz quadrada do erro médio RSME (entre parêntese).

Tabela 3. 12 - Valores do CE₅₀ para os extratos de *E. uniflora* com os diferentes modelos de regressão.

MÉTODO	SC		A		E		SCE		SCA	
	CE ₅₀ (µg/mL)	ajuste [*]	CE ₅₀ (µg/mL)	ajuste [*]	CE ₅₀ (µg/mL)	ajuste [*]	CE ₅₀ (µg/mL)	ajuste [*]	CE ₅₀ (µg/mL)	ajuste [*]
Linear FL	618 ± 40 ^a	0,9948 (0,687)	15 ± 2 ^a	0,9853 (3,436)	6,6 ± 0,2 ^a	0,949 (2,294)	5,6 ± 0,1 ^a	0,9985 (1,381)	18 ± 2 ^a	0,9968 (1,469)
Linear FC	618 ± 40 ^a	0,9948 (0,687)	31 ± 12 ^b	0,2576 (27,451)	-30 ± 9 ^b	0,2789 (30,218)	-57 ± 4 ^b	0,2576 (29,702)	43 ± 9 ^b	0,5048 (26,481)
Exp	646 ± 57 ^a	0,9876 (0,747)	13 ± 2 ^a	0,9942 (2,816)	5,8 ± 0,3 ^a	0,9761 (5,478)	4,3 ± 0,2 ^a	0,9817 (19,220)	16 ± 2 ^a	0,99021 (3,715)
Exp FA	-	0,8361 (2,107)	13 ± 2 ^a	0,9904 (2,570)	5,8 ± 0,3 ^a	0,9551 (5,261)	4,4 ± 0,2 ^a	0,9645 (4,566)	16 ± 2 ^a	0,9832 (3,443)
L3P	-	0,9996 (0,182)	14 ± 3 ^a	0,9979 (2,415)	6,6 ± 0,3 ^a	0,9999 (0,287)	5,3 ± 0,2 ^a	0,9999 (0,137)	18 ± 3 ^a	0,9967 (3,054)
L4P	-	0,9824 (0,956)	12 ± 2 ^a	0,961 (2,331)	6,2 ± 0,2 ^a	1 (0,24)	5,2 ± 0,1 ^a	1 (0,064)	15 ± 2 ^a	0,9941 (2,891)

Valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, na mesma coluna letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

^{*} Coeficiente de determinação, r^2 ; raiz quadrada do erro médio RSME (entre parêntese).

extratos. Portanto o tipo de análise matemática conduzente a obter o valor do CE_{50} por meio de análise de regressão influe no valor final do mesmo e na sua exatidão.

Tanto o comportamento linear quanto o não linear estão exemplificados, como os extratos supercrítico (SC) e etanólico (E) da *B. dracunculifolia* nas Figuras 3.24a 3.24b, respectivamente. Pode se observar, no primeiro caso que os dados da curva dose – resposta apresenta valores de AA < 50 % sob toda a faixa de concentração estudada (0 – 250 $\mu\text{g/mL}$) resultando em uma relação linear ($r^2 = 0,9967$) entre os mesmos na faixa de concentrações estudada (Figura 3.24a). O extrato etanólico apresenta uma atividade antioxidante maior que o extrato supercrítico, produzindo valores de AA próximos a 100 % para a mesma faixa de concentrações, e apresentando claramente uma relação não linear entre os dados experimentais da curva dose – resposta (Figura 3.24b). O ajuste linear e não linear dos dados experimentais está apresentado nas Figuras 3.24a e 3.24b.

No caso do extrato supercrítico (Figura 3.24a), os modelos ajustados apresentaram pequenas diferenças (Tabela 3.10). A análise pelo modelo linear (linear FL) é mais adequada a que com os outros modelos, pois fornece informações de CE_{50} mais confiáveis em termos de grau de ajuste (r^2 e RSME). Comentário adicional merece o modelo faixa linear limitada (Linear FL), o qual neste caso emprega toda a faixa estudada (0 – 250 $\mu\text{g/mL}$), sendo que a resposta (AA) máxima foi de 49,22 %, e por tanto, coincidindo com o modelo faixa linear completa (Linear FC).

Os valores de CE_{50} dos modelos lineares (linear FC e Linear FL) não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com o valor de CE_{50} dos modelos exponencias (Exp e Exp FA) e logístico (L4P). Isto significa que, as análises pelos modelos lineares fornecem informações com exatidão próximas aos modelos não lineares, resultando em uma metodologia adequada para a determinação do valor do CE_{50} . Este comportamento foi obtido também

nos extratos aquosos (A) de *B. dracunculifolia* AM1 (Tabela 3.10), AM2 (Tabela 3.11), SCA de *B. dracunculifolia* AM2, e SC de *E. uniflora* (Tabela 3.12).

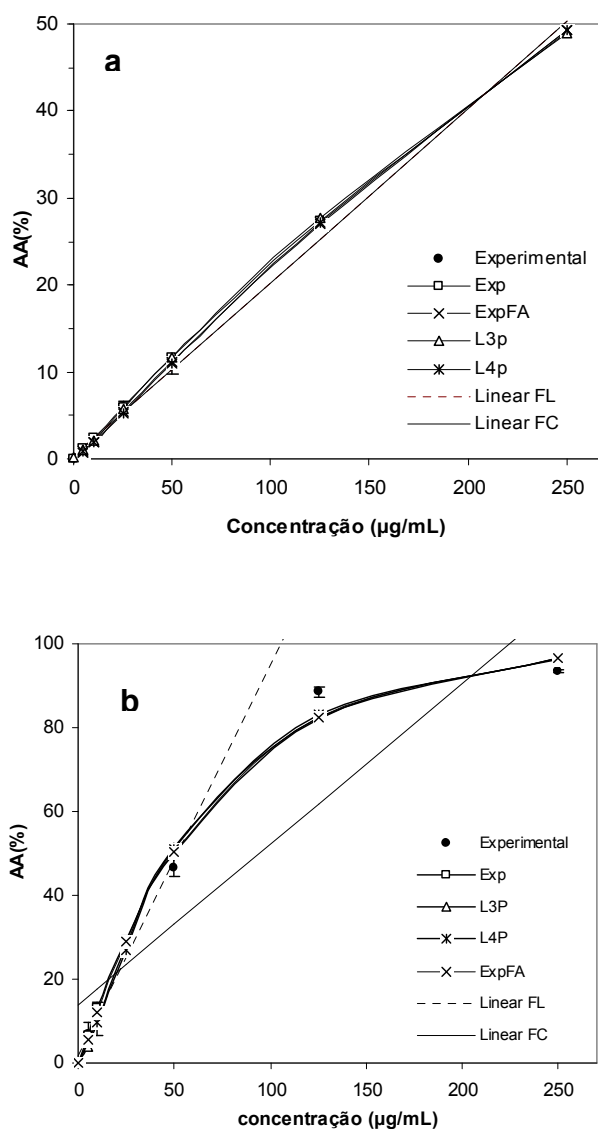


Figura 3.24 - Atividade antioxidante do extratos de *B. dracunculifolia* (AM1). (a) supercrítico, (b) etanólico. Os valores representam média $\pm$ DP. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Na Figura 3.24b é apresentado o resultado do teste da atividade antioxidante e o comportamento previsto pelos diferentes modelos para o extrato

etanólico (E) de *B. dracunculifolia* (AM1). A diferença do extrato supercrítico, os dados experimentais apresentam claramente uma tendência não linear na faixa estudada, em decorrência disto foi comprovado que o modelo linear FC não descreveu o comportamento experimental de forma adequada ($r^2 = 0,831$). Este comportamento, é ajustado adequadamente com os modelos não lineares: exponencial (Exp), exponencial com uma fase associada (Exp FA), logístico de 3 parâmetros (L3P) e logístico de 4 parâmetros (L4P). A partir dos valores do CE_{50} e o grau de ajuste, pode se concluir que o modelo que apresentou melhor confiabilidade no cálculo do CE_{50} foi o modelo Exp FA. O valor de CE_{50} (52 $\mu\text{g/mL}$) do modelo Linear FL apresenta boa aproximação ao valor escolhido como adequado (50 $\mu\text{g/mL}$, como o modelo Exp FA), obtido pelo ajuste não linear dos dados experimentais. Este comportamento não linear das respostas AA em função de concentração dos extratos foi também obtido para os extratos E, SCE e SCA (da amostra AM1), SC, E, SCE (da amostra AM2), A, E, SCE, SCA (da *E. uniflora*).

Destaca-se o ajuste feito com o modelo linear FL, o qual resulta em uma aproximação razoável para o cálculo do CE_{50} , enquanto o modelo linear FC subestima a capacidade antioxidante do extrato (alto valor do CE_{50}). Assim, quando comparado os dois comportamentos apresentados, pode ser dito que o uso da análise de regressão linear em toda a faixa estudada (modelo linear FL) para a obtenção do parâmetro CE_{50} resulta adequado quando as respostas do teste de DPPH apresentam uma relação linear. No caso das respostas apresentarem comportamento não linear, e levando em conta que o valor de CE_{50} reflete uma característica do extrato e, portanto não depende da faixa de concentrações estudadas, análises mediante modelos não lineares resultam mais adequados e o modelo linear FL só permite obter uma aproximação do valor do CE_{50} , pois os modelos não lineares permitem obter com maior exatidão o valor do CE_{50} .

Villaño et al. (2005) apontam que a relação entre AA e a concentração do antioxidante é linear só em uma faixa limitada de concentrações. Buenger et al. (2006) sugerem o emprego das respostas experimentais na faixa de concentrações na qual $AA < 70\%$, para obter resposta linear de AA vs concentração dos extratos no teste de DPPH.

A partir destas informações pode se inferir que a análise de regressão linear dos dados das curvas dose - resposta (AA vs concentração) nem sempre resulta em uma estratégia adequada para a predição do valor correto do CE_{50} . Diferentes pesquisadores têm apontado este fato efetuando análises não lineares para o cálculo do parâmetro CE_{50} (KLECAKOVÁ et al., 2004, HEIMLER et al., 2005, VILLAÑO et al., 2005, NICKAVAR et al., 2007, VICENTINO e MENEZES 2007, MATKOWSKI et al., 2008, POUVREAU et al., 2008, LOCATELLI et al., 2009).

Nas Tabelas 3.10 a 3.12 pode ser observado que o valor de CE_{50} obtidos em cada caso está fortemente ligado ao tipo de ajuste empregado (linear ou não linear), ao modelo empregado (linear, exponencial, logístico), à natureza do extrato (aquoso, etanólico, supercrítico) e o tipo de resposta ao teste DPPH (linear ou não linear). Nestas Tabelas, pode-se observar que os extratos que apresentam respostas não lineares ao teste DPPH, se obtém diferenças significativas entre o modelo linear FC e os demais. Para estes extratos, observa-se que não existem diferenças significativas entre os valores de CE_{50} calculado com o modelo linear FL e o calculado com os modelos não lineares, confirmando se desta maneira que a predição com este modelo resulta mais próxima ao valor real.

Em geral, foi possível ajustar os dados experimentais de AA a dos tipos de modelos estudados, porém não foi possível o cálculo de CE_{50} em alguns casos: extratos aquosos de AM2, e de *E. uniflora*, como também para o extrato SCA da *C. longa*. Nesses casos, os modelos não lineares não permitiram o cálculo de CE_{50} , isto por causa de que a baixa atividade antioxidante no teste DPPH,

apresentando AA baixos (3-43%), assim os modelos não conseguiram extrapolar o comportamento até uma AA igual a 50% e assim calcular o valor de CE_{50} .

No Apêndice F, são apresentados os resultados para os valores de CE_{50} das substâncias empregadas como padrão (ácido ascórbico, catequina e ácido gálico). Para estas substâncias puras obteve-se atividade antioxidante no teste do DPPH na seguinte ordem: ácido gálico > catequina > ácido ascórbico. Podem se observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o modelo linear (linear FC) e os modelos não lineares (Exp, Exp FA, L3p, L4p) e o linear (linear FL).

Os valores finais de CE_{50} para cada extrato são apresentados na Tabela 3.13 e Figura 3.25 para os extratos das três matrizes vegetais. Segundo a classificação de Reynertson et al. (2005), extratos com $CE_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ podem ser considerados muito ativos, entre 50-100 moderadamente ativos, entre 100-200 ligeiramente ativos e $CE_{50} > 200$ inativos.

Assim, levando-se em consideração os valores descritos na Tabela 3.13, pode se concluir que a maioria dos extratos estudados apresentaram atividade seqüestradora ($CE_{50} < 200$) do radical DPPH (em termos de CE_{50}), obtendo resultados de alta atividade no maior número de extratos, moderada em outros e inativos para os extratos SC (AM1 e *E. uniflora*) e A (AM2).

Tabela 3. 13 - Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para os diferentes extratos.

Planta	Extrato					
	SC	A	E	SCE	SCA	
AM1	> 200	158 ± 1 ^a	50 ± 3 ^b	53 ± 4 ^b	54 ± 4 ^b	
AM2	90 ± 5 ^c	> 200	36 ± 2 ^d	35 ± 2 ^d	157 ± 16 ^e	
<i>E. uniflora</i> L.	> 200	15 ± 3 ^f	6,2 ± 0,3 ^g	5,2 ± 0,1 ^g	15 ± 2 ^f	
Padrões	catequina	5,40 ± 0,02	ácido gálico	1,87	ácido ascórbico	10,9 ± 0,6

Valor da média $\pm$ DP, na mesma fila letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). extratos supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA)

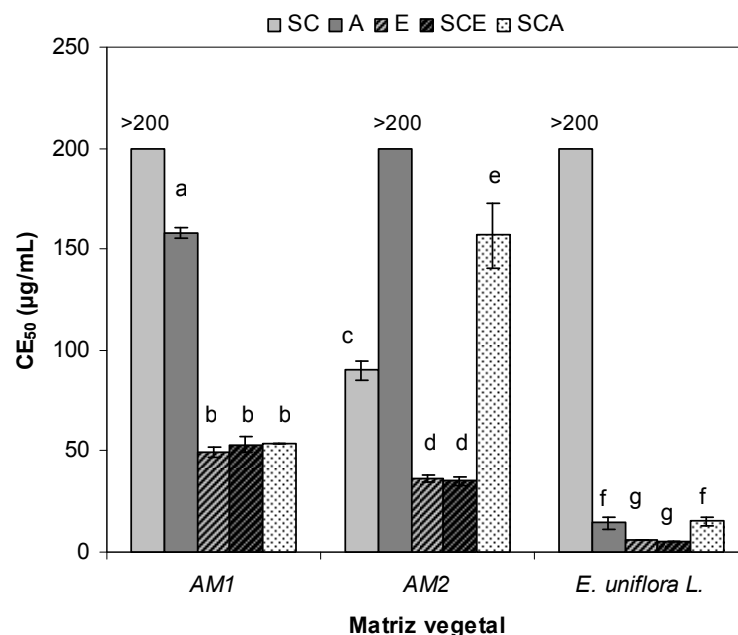


Figura 3.25 - Valores de CE_{50} pra os extratos. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Destacam-se especialmente os extratos etanólicos em uma e duas etapas de extração como muito ativos ($CE_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$). Vale mencionar a alta atividade dos extratos aquosos e etanólicos em 1 ou em 2 etapas de processo para as folhas de *E. uniflora* com valores ao redor de $15 \mu\text{g/mL}$ para os extratos aquosos (uma etapa) e de 6 e $5 \mu\text{g/mL}$ (duas etapas), comparáveis ao padrão de catequina pura ($CE_{50} = 5,40 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) e superiores ao ácido ascórbico puro ($CE_{50} = 10,92 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$). Nota-se um comportamento diferenciado entre os extratos AM1 e AM2 de *B. dracunculifolia*, onde o extrato supercrítico, o etanólico e o etanólico posterior à extração supercrítica da amostra AM2 apresentaram maior atividade que a amostra AM1 e o contrário aconteceu com o extrato aquoso em uma ou em duas etapas.

No caso da *B. dracunculifolia*, o esquema de extração em etapa única apresentam a seguinte relação: $E > A > SC$ (para AM1) e $E > SC > A$ (para AM2).

Enquanto que no esquema em duas etapas pode se afirmar que, com a extração prévia com scCO_2 , favoreceu muito mais a atividade (valor de CE_{50}) dos extratos SCA que dos extratos SCE. Estes resultados indicam que a atividade antioxidante dos extratos é fortemente dependente do solvente empregado, o qual extrai substâncias com diferente capacidade de sequestro do radical DPPH. Czyewski et al. (2008) relataram valor de CE_{50} de 109 $\mu\text{g/mL}$ em extratos etanólicos de folhas de *B. dracunculifolia*. Piantino (2008) relatou valores de CE_{50} de 36,81 e 26,68 $\mu\text{g/mL}$ para extratos SC e etanólicos das folhas da *B. dracunculifolia* (concentração DPPH 60 μM).

A atividade antioxidante alta e moderada em alguns extratos da *B. dracunculifolia* poderia estar associada à possível presença de ácidos fenólicos nos seus extratos. A este respeito Piantino et al. (2008) descreveram a presença majoritária do flavonóide canferide e dos ácidos fenólicos (artepillin C e ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico) nos extratos supercríticos (40–60°C, 200–400 bar), e nos extratos etanólicos e metanólicos foram majoritariamente compostos pelo ácido p-cumárico. Fukuda et al. (2006) relataram a presença de compostos como timol, carvacrol, p metoxitimol, espatulenol, óxido de cariofileno e naringenina nos extratos etanólicos das folhas de *B. dracunculifolia*.

No caso da *E. uniflora*, o efeito dos solventes no esquema de etapa única na atividade antioxidante dos extratos obtidos provocou tendência crescente da capacidade antioxidante com o aumento da polaridade nos mesmos. A natureza não polar do extrato obtido com scCO_2 pode explicar sua inatividade como antioxidante obtida no teste de sequestro do radical DPPH (ZARENA e SANKAR, 2009; de CAMPOS et al., 2008). O efeito da extração com scCO_2 favoreceu a obtenção de extratos com maior atividade antioxidante quando empregou-se etanol na 2ª etapa de extração.

Peixoto (2008) obteve valores de CE_{50} para extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* de 4,75 $\mu\text{g/mL}$. Oliveira e Sawaya (2009) obtiveram valores de CE_{50} de 40 e 114 $\mu\text{g/mL}$ para extratos aquosos e etanólicos de folhas de pitanga (concentração de DPPH 60 μM). Velázquez et al. (2003) relataram valor de CE_{50}

de 9,7 µg/mL em extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* L. (concentração de DPPH 20 mg/L).

Tanto para a *B. dracunculifolia* quanto para a *E. uniflora* L, em etapa única, os resultados de atividade antioxidante com solventes de diferente polaridade sugerem que compostos antioxidantes de diferente polaridade estão presentes em cada uma destas matrizes vegetais.

A correlação entre o teor de fenóis totais e valores de CE₅₀ por meio do valor do coeficiente de determinação (r^2) permitiu obter valores de 0,90, 0,05 e 0,49 nas diferentes matrizes vegetais (*B. dracunculifolia* AM1, AM2 e *E. uniflora*, respectivamente).

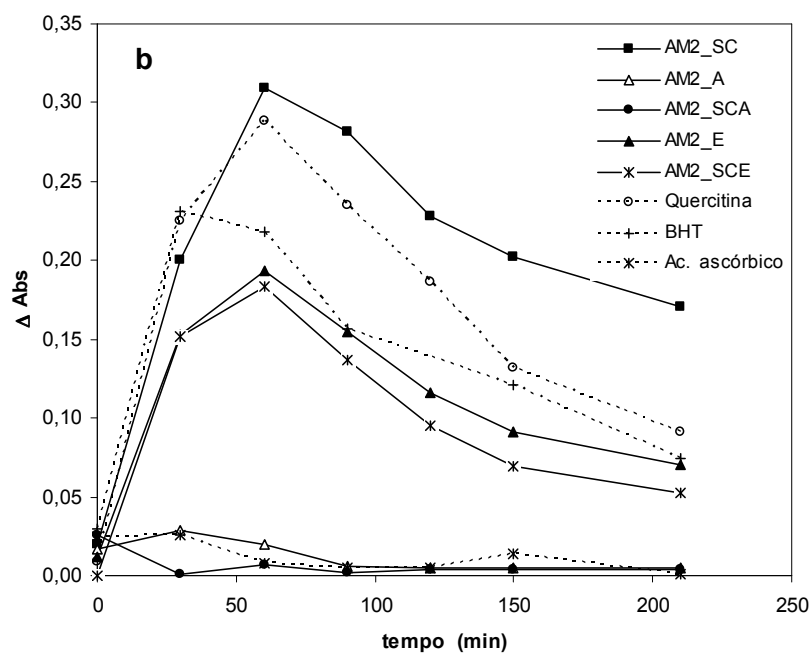
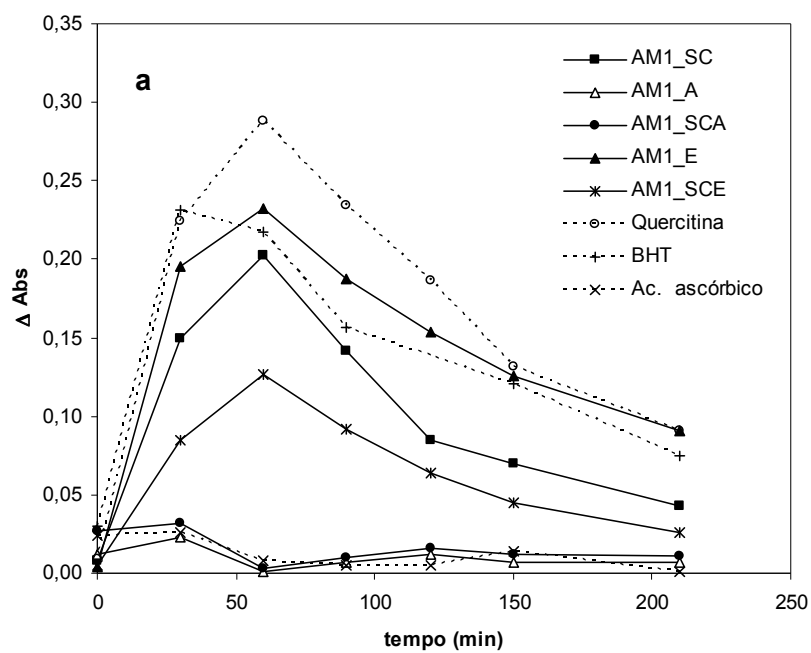
Valores de r^2 baixos concordam com os relatados em outros estudos (KÄHKÖNEN et al., 1999; HINNEBURG et al., 2006; NICKAVAR et al., 2007; MATKOWSKI et al., 2008). Estes extratos podem ser considerados como uma mistura complexa de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos não fenólicos produzindo resposta a atividade antioxidante ligada a possíveis efeitos sinérgicos entre os diversos compostos (KELEN e TEPE, 2007; WU et al., 2009) ou à presença de substâncias oxigenadas que atuam como pró-oxidantes (CÁVAR et al., 2008). Além disto, diversos estudos tem apontado que a atividade antioxidante é dependente da localização e número de grupos hidroxila na estrutura dos compostos fenólicos (KOLEVA et al., 2000; BURDA e OLESZEK et al., 2001; SILVA et al., 2002; KHANDUJA e BHARDWAJ, 2003; EKLUND et al., 2005; VILLANO et al., 2007; POUVREAU et al., 2008).

Método de descoloração do β-caroteno (Método DBC)

O sistema β-caroteno/ácido linoléico é considerado um sistema aquoso-lipídico em forma de emulsão, no qual a atividade antioxidante é medida pela capacidade de um extrato em inibir o processo de oxidação do β-caroteno. Este processo está relacionado com a presença de radicais peroxila gerados pela degradação do ácido linoléico.

Na Figura 3.26 são apresentados os resultados do teste DBC, para cada extrato, durante os 180 min do teste. Os resultados estão apresentados como diferença de absorbância⁶ (Δabs). Sendo que um alto valor de delta abs é proporcional à alta atividade antioxidante da amostra. Os extratos que envolvem etanol como solvente (E, SCE) e CO₂ supercrítico (SC) da *B. dracunculifolia* (AM1 e AM2) apresentaram comportamento semelhante aos padrões antioxidantes (quercitina, BHT) apresentando alta atividade antioxidante. No caso dos extratos aquosos (A, SCA), sua capacidade de inibição da oxidação é baixa (baixa atividade antioxidante).

⁶ calculada a partir da subtração entre a absorbância do controle e da amostra correspondente



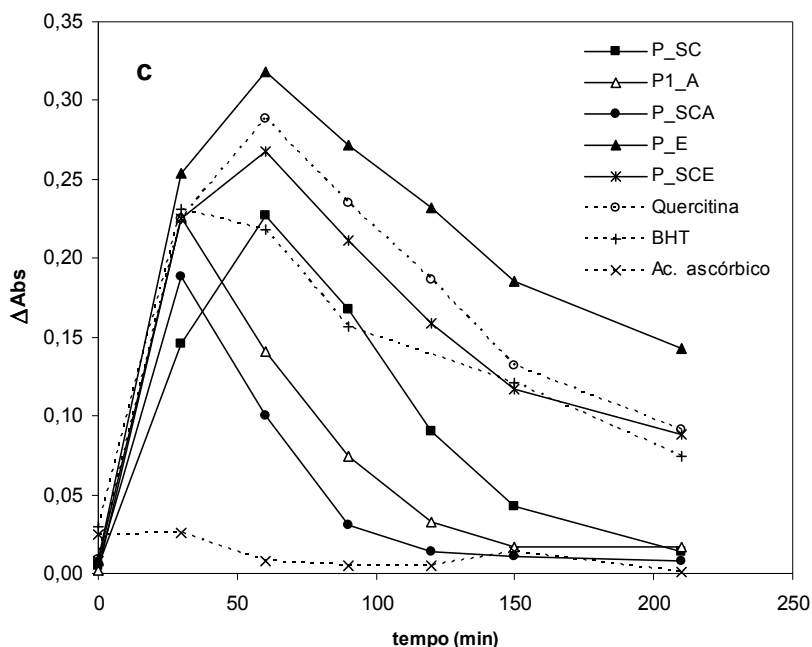


Figura 3.26 - Atividade antioxidante pelo método DBC. (a) AM1, (b) AM2, (c) *E. uniflora*. Os valores representam a média dos ensaios em triplicata. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Entretanto, os extratos etanólicos (E, SCE) obtidos da *E. uniflora*, apresentam alta atividade antioxidante, seguidos do extrato supercrítico (SC), com comportamento similar às soluções de quercitina e BHT. Os extratos aquosos (A, SCA) apresentaram menor atividade quando comparado com os padrões quercitina e BHT, além disso, observou-se que seu comportamento decresce rapidamente com o tempo.

Uma melhor comparação da atividade antioxidante dos extratos neste teste pode ser feita com resultados expressos como porcentagem de inibição a 120 minutos (AA_{120}), calculada a partir da Equação (3.13). Os resultados obtidos para os extratos estão apresentados na Tabela 3.14. Para a amostra AM1, o extrato E apresentou o maior valor de atividade antioxidante do processo realizado em etapa única. Enquanto isso, para a amostra AM2 da mesma planta, o extrato SC apresentou o maior valor de atividade antioxidante dos processos em etapa única. Nas duas amostras (AM1 e AM2), a extração supercrítica prévia à aquosa (SCA)

consegue melhorar o valor de AA_{120} quando comparado com etapa única (A). Observou-se que o extrato E da *E. uniflora* apresentou alta atividade antioxidante comparável com a de solução de antioxidante comercial (BHT).

Tabela 3. 14 - Atividade antioxidante (%) para os diferentes extratos pelo método DBC (t=120 min).

Planta	Extrato				
	SC	A	E	SCE	SCA
AM1	19 ± 3 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^b	39 ± 14 ^c	17 ± 7 ^b	6 ± 2 ^b
AM2	51 ± 1 ^a	5,4 ± 0,5 ^b	27 ± 5 ^c	20 ± 1 ^d	7,3 ± 0,7 ^{eb}
<i>E. uniflora</i> L.	23 ± 9 ^{ad}	10,2 ± 0,5 ^{abf}	46 ± 2 ^c	35 ± 10 ^{cd}	5 ± 2 ^{ef}
Padrões	BHT 46 ± 5	Quercitina 57 ± 9	Ac. Ascórbico 6,3 ± 0,8		

Valor da média ± DP, na mesma fila letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).
extratos supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE),
aquoso prévia extração supercrítica (SCA)

Ressalta-se que os resultados de atividade antioxidante, por meio do teste DBC podem ser fortemente dependentes da polaridade da amostra em teste, pois extratos com característica apolar apresentam atividade antioxidante alta em sistemas emulsionados, pelo fato que eles se concentram na interfase ar/lipídeo. Isso pode ser responsável pela proteção da emulsão, pois antioxidantes polares permanecem na fase aquosa e, portanto, são menos efetivos na proteção dos lipídeos, fenômeno conhecido como “paradoxo polar” (PORTER et al., 1993; FRANKEL et al., 1994). Este fenômeno pode explicar os resultados obtidos para o ácido ascórbico, o qual é um antioxidante polar e não apresenta propriedades antioxidantes para o teste do DBC (Figura 3.26), sendo que para o teste do DPPH apresentou alta atividade antioxidante (Tabela 3.13). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Kulisic et al.(2003) e Duarte-Almeida, et al.(2006). A polaridade dos extratos explicaria os resultados para extratos obtidos com CO_2 supercrítico (SC) das amostras da *B. dracunculifolia*, os quais apresentaram melhores repostas no teste DBC que os extratos envolvendo água como solvente

(A, SCA). No caso dos extratos da *E. uniflora*, as características estruturais (como número e localização de grupos hidroxila) ou fenômenos de partição dos compostos antioxidantes presentes nos extratos nas fases da emulsão, podem ser mais importantes que a polaridade dos mesmos (KOLEVA et al., 2002).

Comparação dos métodos de avaliação de atividade antioxidante

As metodologias empregadas para medir a atividade antioxidante atuam por mecanismos de reação diferentes. No teste de DPPH, a atividade é quantificada por meio da capacidade do extrato em reduzir o radical DPPH por meio de mecanismo de transferência de elétron de um composto antioxidante, enquanto o teste DBC procede por mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (PRIOR et al., 2005). Koleva et al (2002) e Prior et al. (2005), relatam a importância de se avaliar a AA utilizando pelo menos por dois mecanismos distintos. O presente estudo comprova tal observação a partir dos resultados obtidos para os extratos estudados, obtendo em alguns casos respostas diferentes aos dois testes. Pode se afirmar que a AA mostrou-se dependente do solvente e do processo de extração empregado, como foi previamente observado por Sharififar et al.(2009). A diferença anterior pode explicar a intensidade das respostas obtidas, observando que o radical DPPH apresenta-se mais sensível à ação antioxidante por parte dos extratos do que o radical peroxila (gerado no teste DBC), quando comparados na mesma concentração (200 µg/mL), pois apresentaram valores de AA maiores (Figura 3.23). Em geral, pelas duas metodologias os extratos etanólicos (E, SCE) apresentam respostas elevadas para as três matrizes vegetais. Sendo de grande relevância esclarecer que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante em cada um dos métodos não são necessariamente os mesmos, visto que os extratos representam misturas complexas de compostos, tornando-se possível apresentarem diferentes interações (antagônicas ou sinérgicas).

3.6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que o processo de extração em duas etapas permite recuperação de extractos com diferente composição e funcionalidade. Quanto a *B. dracunculifolia* a primeira etapa (supercrítica) permite a recuperação, principalmente de extratos ricos em artepillin C. Na segunda etapa de extração produz extratos com altos valores de fenóis totais (FT) quando o etanol é utilizado como solvente (SCE). Extratos obtidos quando a água foi empregada (SCA) apresentaram alto teor de flavonóides totais.

No caso da *E. uniflora*, a extração supercrítica prévia extração etanólica exerceu influência positiva no processo SCE, produzindo extração de FT e flavonóides totais superior ao processo SCA, devido a diferenças nos rendimentos obtidos. O uso da extração supercrítica (primeira etapa), seguida por extração aquosa ou etanólica (segunda etapa) depende do objetivo do processo: a extração máxima do FT e flavonóides totais ou extratos mais concentrados nestas substâncias.

Quanto à atividade antioxidante, os extratos obtidos com etanol, tanto em uma quanto em duas etapas, apresentaram maior atividade antioxidante em relação às extrações aquosas.

Os diferentes extratos estudados apresentaram um tipo de resposta ao teste de atividade antioxidante no teste do DPPH: linear ou não linear. O comportamento linear foi característico daqueles extratos com baixo poder antioxidantes ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). No entanto, os extratos cujas respostas experimentais, em termos de AA, que apresentaram comportamento tipicamente não linear são aqueles que possuem atividade antioxidante media - alta ($CE_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Em geral as curvas dose – resposta para os diferentes extratos testados de cada uma das matrizes vegetais estudadas apresentaram um dos dois tipos de comportamento.

É possível observar nos resultados diferenças substanciais no rendimento global de extração e seletividade de diferentes solventes sobre o processo de separação de duas etapas, devido às diferenças na matriz sólida, polaridade do solvente e do tipo de contato (líquido / sólido ou fluido supercrítico / sólido).

3.6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography –mass spectrometry**. *Allued Publ. Corp.*, Carol Stream, IL, 469 pp, 1995.
- AJILA, C.M., NAIDU K.A., BHAT S.G., PRASADA RAO, U.J.S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982–988, 2007.
- AK, T., GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions** 174 (1), pp. 27-37, 2008.
- ALENCAR, S. M., AGUIAR, C. L., PAREDES-GUZMAN, J., PARK, Y. K., Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, **Cienc. Rural**, v. 35 p. 909-915, 2005.
- AOAC. **Official Methods Of Analysis**, 16th Edn. Washington, DC: Association Of Official Analytical Chemists, 1997.
- ANDRADE, G. F., VIEIRA.J.B., RAMOS, J. Ministerio de Agricultura, Pecuária y Abastecimento. **pitanga: culturas atendidas**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/>. Acesso em: 22 ago. 2007.
- ARAI, I., AMAGAYA, S., KOMATSU, Y., OKADA, M., HAYASHI, T., KASAI, M., ARISAWA, M., Momose, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n.1-3, p.307-314, 1999.
- AURICCHIO, M.T., BACCHI, E.M.. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p. 55 - 61, 2003.
- A.S.A.E. Standards, Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving, **ASAE S319.3**, 547. 1997.
- BENNER, B.A. Summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples, **Analytical Chemistry**. v.70, n.21, p. 4594–4601,1998.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. da; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 30 p. (Série Frutas Nativas, 1) apud de Abreu et al., 2005.
- BURDA, S., OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.2774-2779, 2001
- BOSCOLO. O. H.; MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**., Botucatu, v.9, n.1, p.8-12, 2007.
- BOUDREAU, B.P. The diffusive tortuosity of fine-grained unlithified sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.60, p.3139–3142, 1996.

- BRUTTEL, P., SCHILINK, R. Water determination by Karl Fischer titration. **Metrohm Monograph** 8.026.50003, Suíça, 2003.
- BUENGER, J, ACKERMANN, H., H-JENTZSCH, A., MEHLING, A., PFITZNER I., REIFFEN K.A. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials, **International Journal of Cosmetic Science**, v.28, p.135–146, 2006.
- CABRAL, F. A., PEIXOTO, C. A., PAZ JARA J. L., LOPES de OLIVEIRA, A. composition of supercritical extracts of *Eugenia Uniflora* leaves. In proceedings of the 8th Conference on Supercritical Fluids and their Applications, Reverchon, E., Ed, ISASF, Ischia, Italy, p.28-31, 2006.
- CASSEL, E., FRIZZO C. D., VANDERLINDE R., ATTI-SERAFINI L., LORENZO D., DELLACASSA, E., Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 39 p. 4803-4805. 2000
- CÁVAR, S., MAKSIMOVIC, M., SOLIC, M.E., JERKOVIC-MUJKIC, A., BESTA, R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**, v.111, n. 3, p.648-653, 2008.
- ĆETKOVIĆ, G.S., DJILAS, S.M., CANADANOVIĆ-BRUNET, J.M., TUMBAS, V.T. Antioxidant properties of marigold extracts , **Food Research International**, v.37, n.7, p. 643-650, 2004.
- CHÈVRE, N; BRAZZALE, a. R. Cost effective experimental design to support modeling of concentration-response functions. **Chemosphere**, v.72, p.803-810, 2008.
- CHO, G-C, DODDS, J., SANTAMARINA, J.C. particle shape effects on packing density, stiffness, and strength: natural and crushed sands. **J. Geotech. and Geoenviron. Engrg.** v.132, n. 5, p. 591-602, 2006.
- CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacol**, Limeric. v. 81, p. 57-63, 2002.
- CSEKE, L. J., KIRAKOSYAN, A., KAUFMAN, P B., WARBER, S. L., DUKE, J, A., BRIELMANN, H. L. **Natural Products From Plants**. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 2006.
- COSTA, D.P., SANTOS, S.C., SERAPHIN, J.C., FERRI, PH. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* Leaves, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, p.1287- 1293, 2009.
- CURRAY, J.K. Analysis of sphericity and roundness of quartz grains. **M.Sc. thesis in minerology**. The pennsylvania state university, university park, 1951, citado por Jayan e Kumar, 2004.
- CZYEWSKI , E., BARBISAN , E. M., ROSA , R. D. L., CANSIAN, R. L., EMMERICH, D. J., LOCH, C., PAROUL. N. Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Carqueja (*Baccharis trimera*) e Vassoura (*Baccharis dracunculifolia*) XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). Disponível em: http://www.furb.br/temp_sbqsul/_app/_FILE_RESUMO_CD/716.pdf
- DA SILVA FILHO, A.A, DE SOUSA, J.P.B., SOARES, S., FURTADO, A.J.C., ANDRADE E SILVA, M.L., CUNHA, W.R., GREGÓRIO, L.E., NANAYAKKARA, N.P.D., BASTOS, J.K. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C.

- (Asteraceae). Zeitschrift fur Naturforschung - Section C **Journal of Biosciences** ,v. 63, n.1-2, p.40-46, 2008.
- DASTMALCHI, K., DAMIEN DORMAN, H.J., OINONEN, P.P., DARWIS, Y., LAAKSO, I., HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract . **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.3, p.391-400, 2008.
- DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMINGUEZ, H., PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.7, p.2441-2469, 2006.
- DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMINGUEZ, H., PARAJO, J. C. Antioxidant Extraction by Supercritical Fluids, in: **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**, Ed. J. L. Martinez, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2008.
- De ABREU, N.A., MENDONÇA, V., FERREIRA, B.G., TEIXEIRA, G.A., DE SOUZA, H.A., ANTUNES, H., RAMOS, J.D. Crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) em substratos com utilização de superfosfato simples. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1117-1124., 2005.
- De ANDRADE, C.A.; CLOCKER, C.; BORA, K.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.231-235, 2007.
- De CAMPOS, L.M.A.S., LEIMANN, F.V., PEDROSA, R.C., FERREIRA, S.R.S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p.8413-8420, 2008.
- Del VALLE, J.M., ROGALINSKI, T., ZETZL, C., Brunner, G. Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. **Food Research International**, v.38, n.2, p 203-213, 2005.
- DELGADO, J. M.P.Q. A simple experimental technique to measure tortuosity in packed beds. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v 84, p.651-655, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R.J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, 2006.
- EKLUND, P.C., LÅNGVIK, O.K., WÄRNÄ, J.P., SALMI, T.O., WILLFÖR, S. M., SJÖHOLM, R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic and Biomolecular Chemistry**, n.3, p.3336 - 3347, 2005.
- EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28, 2004.
- ERKAN, N., AYRANCI, G., AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v.110, n.1, p 76-8,22008.

- FAUDALE, M., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., POLI, F., CODINA, C. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56,n.6, p. 1912-1920, 2008.
- FRANKEL, E.N., HUANG, S.W., KANNER J., GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1054–1059, 1994.
- FRIZZO, C.D., ATTI-SERAFINI, L., LAGUNA, .E., CASSEL, E., LORENZO, D., DELLACASSA, E. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.2, p.99-106, 2008.
- FUKUDA, M., OHKOSHI, MAKINO, M., FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. **Chemical & pharmaceutical bulletin**. v.54, n.10, p.1465-1468, 2006.
- FUNARI, C. S., FERRO, V. O., Propolis analysis, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 171-178, 2006
- GALHIANE, M.S., RISSATO, S. R., CHIERICE, G.O., ALMEIDA, M.V., SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v. 70, p. 286–292, 2006.
- GLISIC, S. SMELCEROVIC, A., ZUEHLKE, S., SPITELLER, M., SKALA, D. Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.45, n.3, p.332-337, 2008.
- GOBBO-NETO, L., LOPES N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.32, n.2, p.374-381, 2007.
- GRAMZA, A., KORCZAK, J., Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems, **Trends in Food Science & Technology**, v.16,n 8, p.351-358, 2005.
- GRIGONIS, D., VENSKUTONIS, P.R., SIVIK, B., SANDAHL, M., ESKILSSON, C.S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.33, n.3, p.223-233, 2005.
- HAYASHI, K., KOMURA, S., ISAJI, N., OHISHI, N., YAG, K. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v.47, n.11, p.1521—1524 ,1999.
- HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., GRESSIER, B., JOSEPH, H., BAILLEUL, F. Antioxidant and Neurosedative Properties Of Polyphenols And Iridoids From *Lippia Alba*. **Phytotherapy Research**, v.22, n.2, p. 256-258, 2008a.
- HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., BAILLEUL, F. Ethnopharmacology Of *Lippia Alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, n.2, p.211-222, 2008b.
- HEIMLER, D., VIGNOLINI, P., DINI, M, G., ROMANI, A. Rapid test to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, n.8, 3053-3056, 2005.

- HINNEBURG, I., DORMAN, H.J. D., HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 122-129, 2006.
- HOLETZ, F.B, PESSINI, G.L, SANCHES, N.R, CORTEZ, D.A, NAKAMURA, C.V, FILHO, B.P. Screening Of Some Plants Used In The Brazilian Folk Medicine For The Treatment Of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-31, 2002.
- IACOPINI, P., BALDI, M., STORCHI, P., SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions . **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21,n.8, p. 589-598, 2008.
- ISENGARD, H.-D. Water content, one of the most important properties of food. **Food Control**, v. 12, n.7, p.395-400. DOI: 10.1016/S0956-7135(01)00043-3, 2001.
- JANG, H. D., CHANG, K. S., HUANG,Y. S., HSU, C. L.,LEE, S. H., SU, M. S. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p.749-756, 2007.
- JANISCH, K.M., ÖLSCHLÄGER , C., TREUTTER, D., ELSTNER, E.F. Simulated digestion of Vitis vinifera seed powder: Polyphenolic content and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54,n.13, p. 4839-4848, 2006.
- JAYAN, P. R., KUMAR, V. J. F. Planter design in relation to the physical properties of seeds. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 42, n.1-2, p. 69-71, 2004.
- JIMENEZ, N., LONDOÑO J., ARANGO, G. L. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la familia annonaceae. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 24, n.3, p.337342, 2005.
- JUN, M., TOHRU, U., IANZHANG, L., TAKESHI, F. Identification and evaluation of antioxidant activities of bamboo extracts. **Forestry Studies in China**, v.6, n. 2, 2004.
- KADE, I.J., IBUKUN, E.O., NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.4-5, p.365-371, 2008.
- KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.10, p. 954-3962, 1999.
- KELEN, M., TEPE, Z. Screening of Antioxidative Properties and Total phenolic compounds. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.3, p.403-408, 2007.
- KHANDUJA, K.L., BHARDWAJ, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.40, p.416-422, 2003.

- KIM, J.K., KIM, Y., NA, K.M., SURH, Y.J. KIM,T.Y. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression *in vitro* and *in vivo*, **Free Radical Research**. v, 41, p.603–614, 2007.
- KIMOTO, T., AGA, M., HINO, K., KOYA-MIYATA, S., YAMAMOTO, Y., MICALLEF, M. J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M., KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**. 21, p.221-228, 2001a.
- KIMOTO, T., KOYA-MIYATA, S., HINO, K., MICALLEF, M. J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA M., KURIMOTO M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. **Virchows Archiv**. V.438, p.259-270, 2001b.
- KITTS, D. D; WIJEWICKREME, A. N.; HU C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.203, p.1-10, 2000.
- KITZBERGER, C.S.G., SMÂNIA JR, A., PEDROSA, R.C., FERREIRA, S.R.S., Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids, **Journal of Food Engineering** , v.80,p. 631–638, 2007.
- KLECAKOVÂ, J., CHOBOT, V., JAHODÂR, L., LAAKSO, I., VÎCHOVÂ, P. antiradical activity of petals of Philadelphus coronaries l. **Cntr Eur J Publ Health**, v.12, 39-40, 2004.
- KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., BONO, A. Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n.4, p.97-104, 2007.
- KOLEVA, I.I., NIEDERLÄNDER, H. A.G., VAN BEEK T.A. An on-Line HPLC Method for Detection of Radical Scavenging Compounds in Complex Mixtures. **Analytical Chemistry**, v.7, n.10, p.2323-2328, 2000.
- KOLEVA II, VAN BEEK TA, LINSEN JPH, DE GROOT AE , EVSTATIEVA LN, Screening of plant extracts for antioxidant activity - a comparative study on three testing methods. **Phytochem Anal**, 13, p.8-17, 2002.
- KULKARNI, A., SUZUKI, S., ETOH, H., Antioxidant compounds from Eucalyptus grandis biomass by subcritical liquid water extraction . **Journal of Wood Science**, v.54, n.2, p. 153-157, 2008.
- KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, n.4, p.633-640, 2004.
- LAGO, J.H.G., ROMOFF, P., FÁVERO, O.A., SOARES, M.G., BARALDI, P.T., CORREA, A.G., SOUZA, F.O. Composition of essential oils from the leaves of six species of the Baccharis genus from "campos de altitude" of the atlantic forest of São Paulo. **Química Nova**, v.31, n.4, 727-730 , 2008.
- LANFREY, P.-Y., KUZELJEVIC, Z.V., DUDUKOVIC, M.P. Tortuosity model for fixed beds randomly packed with identical particles, **Chemical Engineering Science**, v.65, n.5, p.1891-1896, 2010.

- LEE, Y.N., CHEN, C.R., YANG, H. L., LIN, C.C., CHANG, C.M. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions, **Separation and Purification Technology**, v. 54 , p.130–138, 2007.
- LEE, M-I., NISHIMOTO,S., YANG,L-L., YEN,K-Y., HATANO,T., YOSHIDA,T., OKUDA,Y. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p.1343-1349, 1997.
- LOAYZA I, ABUJDER D, ARANDA R, JAKUPOVIC J, COLLIN G, DESLAURIERS H, JEAN FI. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *Baccharis latifolia* and *Baccharis dracunculifolia*, **Phytochemistry**, v 38, p.381-389,1995.
- LOCATELLI, M, GINDRO, M., TRAVAGLIA, F., SOISSON, J-D., RINALDI, M., ARLORIO., M. Study of the DPPH_-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, p.889–897, 2009.
- MAIA, J.G.S., ANDRADE, E.H.A., Da SILVA, M.H.L. and ZOGHBI, M.G.B.. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 11, p.727–729, 1999.
- MAIER, T., SCHIEBER, A., KAMMERER, D.R., CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v.112,n.3, p. 551-559, 2009.
- MASSIGNANI, J. J., LEMOS, M., MAISTRO, E. L., SCHAPHAUSER, H. P., JORGE, R. F., SOUSA, J .P. B., BASTOS, J. K., ANDRADE, S .F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**. DOI: 10.1002/PTR.2624. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2624> 2009.
- MATKOWSKI, A., TASARZ , P., SZYPUŁA. E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.2, n.11, 321-330, 2008.
- MELO, R.M., CORRÊA, V.F.S., AMORIM, A.C., MIRANDA, A. L., REZENDE,C.. Identification of Impact Aroma Compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) Leaf Essential Oil. **Journal of Brazilian Chemical Society**., v. 18, n. 1, p. 179-183, 2007.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v.15, p.127-130, 2001.
- METROHM. Automated Karl Fischer water determination with the 774 Oven Sample Processor, application bulletin 280/1e. disponível em : www.metrohm.com.
- MILLER, H.E. A Simplified Method for The Evaluation of Antioxidant. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.
- MÍKOVÁ, K., The regulation of antioxidants in food, in **Food Chemical Safety**, Vol. 2: *Additives*, 1st ed., Watson, D.H., Ed., CRC press, Boca Raton, FL, 2000.
- MIRA, B., BLASCO, M., SUBIRATS, S., BERNA, A. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.9, n.4, p.238-243, 1996.

- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **The Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.
- MORAIS, S. M., CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I.L., ALENCAR, J.W., MATOS, J.A. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p.449-451, 1996
- MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. CRC Press, Boca Raton, USA, 2000.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, USA. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov>. Acesso em 10 Fev. 2010.
- NICKAVAR, B., KAMALINEJAD, M., IZADPANAH, H. In vitro free radical scavenging activity of five salvia species. **Pak. J. Pharm. Sci**, v.20, n.4, p.291-294, 2007.
- OGUNWANDE, I.A., OLAWORE, N.O., EKUNDAYO, O., WALKER, T.M., SCHMIDT, J.M., SETZER, W.N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.147-152, 2005.
- OLIVEIRA, A. L. LOPES, R.B. CABRAL, F. A., EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.), **Food Chemistry**, v.99, n.1, 2006, p.1-5, 2006.
- OLIVEIRA, E.A; SAWAYA, F.A.C. Atividade antioxidante da pitanga. I jornada de iniciação científica e tecnológica da Uniban. Disponível em: <http://www.uniban.br>. 2009.
- OREOPOULOU, V. extraction of natural antioxidants. In: TZIA, C e LIADAKIS, G. **Extraction optimization in Food Engineering**, cap. 10. Marcel Dekker, 2003.
- PARK, Y. K., PAREDES-GUZMAN, J. F., AGUIAR, C. L., ALENCAR, S. M., FUJIWARA, F. Y., Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis, **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 52 p.1100-1103, 2004
- PAULINO, N., ABREU, S.R.L., UTO, Y., KOYAMA, D., NAGASAWA, H., HORI, H., DIRSCH, V.M., VOLLMAR, A.M., SCREMIN, A., BRETZ, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in *Brazilian propolis*. **European Journal of Pharmacology**, v.587, n.1-3, p.296-301, 2008.
- PEIXOTO, C. A., Extração supercrítica de folhas de *Eugenia Uniflora* L. 2008. 153p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- PEIXOTO, C. A., OLIVEIRA, A. L., CABRAL, F. A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) LEAVES. **Journal of Food Process Engineering**. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2008.00311.2010.
- PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenolicos de alecrim-do-campo (Baccharis dracunculifolia) com dióxido de carbono supercrítico**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

- PIANTINO, C.R., AQUINO, W.B., FOLLEGATTI-ROMERO, L.A., CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ Extraction of Phenolic Compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of supercritical Fluids**, v.47, p.209–214, 2008.
- PORTER, W., BLACK, E.D., DROLET, A.M. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast on relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, p. 615–624, 1989.
- POUVREAU, J-B., MORANÇAS, M., TARAN, F, ROSA, P., DUFOSSÉ, L., GUÉRARD, F., S. PIN, FLEURENCE, J., PONDAVEN, P. Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Marennine, a Blue-Green Polyphenolic Pigment from the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen Responsible for the Natural Greening of Cultured Oysters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6278–6286, 2008.
- PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized Methods for The Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics In Foods And Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.
- PREETHI, K.C., KUTTAN, G., KUTTAN, R. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n.9, p. 691-697, 2006.
- PUERTAS-MEJÍA, M., HILLEBRAND, S., STASHENKO, E., WINTERHALTER, P. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, n.5, p.380-384, 2002.
- QUEIROGA, C. L. ; BASTOS, J. K. ; SOUSA, J. P. B. ; MAGALHÃES, P.M.. Comparison of the chemical composition of the essential oil and the water soluble oil of *Baccharis dracunculifolia* dc. (asteraceae). **The Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 111-114, 2008.
- QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of vassoura. **J. Braz. Chem. Soc.**, 1, 105-109, 1990.
- QUEZADA, N., ASECIO, M., DEL VALLE, J.M., AGUILERA, J.M., GOMEZ, B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. **Journal of Food Science**, v. 69,n.5, p. C371-C376, 2004.
- RAHMAN, M.S., PERERA, C.O., DONG CHEN, X., DRISCOLL, R.H., LAL POTLURI, P. Density, shrinkage and porosity of calamari mantle meat during air drying in a cabinet dryer as a function of water content. **Journal of Food Engineering**, v.30, n.1-2, p.135-145, 1996.
- REYNERTSON, K. A., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v 3, p. 25-36, 2005.
- RÜCKER, G., ASSIS BRASIL E SILVA, G., BAUER, L., SCHIKARSKI, M. Neue inhaltsstoffe aus *Stenocalyx Michellii*. **Planta Medica**, v.31, p.305-340, 1977.
- RUSAK, G., KOMES, D., LIKIĆ, S., HORŽIĆ, D., KOVAČ, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110,n 4, p.852-858, 2008.
- SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76,

- p.270-276, 1998.
- SCHAPOVAL, E.E.S., SILVEIRA, S.M., MIRANDA, M.L., ALICE C.B, HENRIQUES A.T., Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, pp.137–142, 1994.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v.16, p.373-374, 1995.
- SCHOSSLER, P., SCHNEIDER, G. L., WUNSCH, D., SOARES, G. L. G., ZINI, C. A. volatile compounds of *baccharis punctulata*, *baccharis dracunculifolia* and *eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 277-287, 2009.
- SHARIFIFAR, F., DEHGHAN-NUDEH, G., MIRTAJALDINI, M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, v.112, n. 4, p.885-888, 2009.
- SHEN, L., CHEN, Z. Critical Review Of The Impact Of Tortuosity On Diffusion, **Chemical Engineering Science**, v.62, n.14, p.3748-3755, 2007.
- SHIMIZU, K., K. SWADESH, D., HASHIMOTO, T., SOWA, Y., YOSHIDA, T., SAKAI, T., MATSUURA, Y., KANAZAWA, K. Artepillin C in Brazilian propolis induces G₀/G₁ arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells, **Mol. Carcinog**, v.44, p.293-299, 2005.
- SILVA FILHO, A. A. DA, BUENO, P. C. P., GREGÓRIO, L. E., ANDRADE E SILVA, M. L., ALBUQUERQUE, S., BASTOS, J. K. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v 56, 1195-1199, 2004.
- SILVA, M.M, SANTOS M. R, CAROÇO, G, ROCHA, R, JUSTINO G, MIRA L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free radical research**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.
- SINGLETON V. L., ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v.299, p.152-178, 1999
- SIRAMON, P., OHTANI, Y. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. **Journal of Wood Science**, v.53, n.6, p. 498-504, 2007.
- SOUSA, J. P. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia de fases gasosa e líquida**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas (Cromatografia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, 164p, 2007
- SUDJAROEN, Y., HAUBNER, R., WÜRTELE, G., HULL, W.E., ERBEN, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Owen, R.W. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.11, p. 1673-1682, 2005.

- SUPARTONO, W., RUCKOLD, S. ISENGARD, H.-D. Karl Fischer titration as an alternative method for determining the water content of cloves. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, n.4, p.402-405, 1998.
- TAO, Q.F., XU, Y., LAM, R.Y.Y., SCHNEIDER, B., DOU, H., LEUNG, P.S., - SHI, S.Y., - ZHOU, C.Y., - YANG, L.X., - ZHANG, R.P., - XIAO, Y.C., - WU, X., - STÖCKIGT, J., - ZENG, S., - CHENG, C.H.K., - ZHAO, Y. Diarylheptanoids and a monoterpene from the rhizomes of *Zingiber officinale*: Antioxidant and cytoprotective properties. **Journal of Natural Products**, v.71,n.1, p. 12-17,2008.
- TURKMEN, N., SARI,F., VELIOGLU, Y.S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods, **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p.835-841, 2006.
- 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, n.1, p.55-66, 2004.
- VELAZQUEZ, E., TOURNIER, H.A., MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P., SAAVEDRA, G., SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts, **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.91-9, 2003.
- VICENTINO, R. R. A., MENEZES, F. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia DPPH. **Revisita Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 3, p.384-387, 2007
- VILLANO, D., FERNANDEZ-PACHÓN, M. S., TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLA, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in Vitro. **Analytica Chimica Acta**, 538, 391-398, 2005.
- VILLANO D., FERNANDEZ-PACHON M.S., MOYA M.L., TRONCOSO A.M., Garcia-Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, **Talanta**, v.71, n.1, p. 230-235, 2007.
- VIUDA-MARTOS, M., RUÍZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean Region, **Acta Chimica Slovenica**, v.54, n.4, p.921-926, 2007.
- WANG, W. WU, N., ZU, Y.G., FU, Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, n 3, p.1019-1022, 2008.
- WEYERSTAHL, R., CHRISTIANSEN, C., MARSCHALL, H., Constituents of brazilian vassoura oil, **Flavour Fragrance Journal**. v..11, p.15-23, 1996.
- WEYERSTAHL, P., MARSCHALL-WEYERSTAHL, H., CHRISTIANSEN, C., OGUNTMEIN, B O., ADEOYE, A O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. **Planta Medica**. v.54, n.6, p.546-549, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Inglaterra, 1998, 123p.

- WU, N., FU, K., FU, Y.J., ZU, Y.G., CHANG, F.R. CHEN Y.H. CHEN, Y. H., LIU, X. L., KONG, Y., LIU, W., GU, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Molecules** 14, p.1032–1043., 2009.
- YANISHLIEVA, N. V., MARINOVA, E., POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p.776–793, 2006.
- ZARENA A.S., SANKAR K.U. A study of antioxidant properties from *Garcinia mangostana* L. pericarp extract. *ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. v.8, n.1, p.23-34, 2009
- ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.555-559, 1999.

4 EXTRATOS COM POTENCIAL ANIPLASMÓDICO A PARTIR DA
Curcuma longa, Artemisia annua E Bidens pilosa

4.1. INTRODUÇÃO

Os extratos naturais são fontes de inúmeros compostos bioativos para tratamento terapêutico de diversas doenças. A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que nos países da África, Ásia e América Latina, a medicina alternativa (aquela que usa extratos naturais) é praticada por 80 % da população na medicação primária, e quase 25 % dos medicamentos modernos são feitos de plantas que são empregadas na medicina alternativa (WHO, 1998). Uma das doenças de maior impacto em populações carentes é a malária, que afeta mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo e causa de 1 a 2 milhões de mortes todos os anos. A malária é uma infecção causada por parasitas unicelulares (gênero *plasmodium*) que entram no sangue pela picada do mosquito *Anopheles*.

4.2. ANTIMALÁRICOS

Os medicamentos empregados para tratar a malária, como a cloroquina, a quinidina, e a amodiaquina, perderam eficiência em razão da resistência desenvolvida por parte do *Plasmodium falciparum*. Na atualidade, terapias farmacológicas baseadas na combinação destas substâncias com derivados da artemisinina (ACTs) são empregadas com muita eficácia (WHO, 2006).

A síntese química da artemisinina foi comprovada, mas os seus altos custos fazem das folhas da *Artemisia annua* a única fonte natural deste composto, por isso, o grande interesse no estudo pela melhora nos processos de extração. Tradicionalmente são empregados os solventes hexano e etanol, mas fatores como segurança ambiental, legislação pública e rendimentos medianos das extrações, têm levado às pesquisas com a tecnologia de extração com fluidos supercríticos, a qual se apresenta como uma alternativa promissora para obter extratos com altos conteúdos de artemisinina (LAPKIN et al., 2006).

Garavito et al. (2006) obtiveram extratos com importante atividade antimalárica empregando soluções de etanol-água (70-30 %) por 48 h e 25 °C

(rendimento de extração: 10-20 %), as plantas estudadas foram *Abuta grandifolia*, *Sandwith*, *Acacia farnesiana*, *Acnistus arborescens*, *Croton leptostachyus* Kunth, *Piper cumanense* Kunth, *Piper holtonii* C., e *Xylopia aromática*. Nesse estudo a atividade antiplasmodica foi avaliada em testes *in vitro* e *in vivo*. Outros extratos foram testados pela sua atividade antimalárica: Agbedahunsi et al. (1998) empregaram hexano como solvente na obtenção de extratos de *Khaya grandoliola*, Benoit-Vical et al. (1998) obtiveram extratos aquosos de *Nauclea latifolia*, Rahman et al. (1999) empregam separadamente clorofórmio e metanol na obtenção de extratos de *Andrographis paniculata* e *Tinospora crispa*. Óleos essenciais de *Myrtus communis* e *Rosmarinus officinale*, *Tetradelia riparia*, foram também testados (CAMPBELL et al., 1997, MILHAU et al., 1997).

Segundo Lapkin et al (2006) os solventes orgânicos são pouco seletivos e coextraem grandes quantidades de compostos indesejáveis. Os autores relataram o uso de $scCO_2$ como solvente na obtenção de extratos de *Artemisia annua*. Este processo tem sido usado também por Kohler et al. (1997), Della Porta et al. (2004), Quispe-Condori et al (2005) e Tzeng et al. (2007).

Outras espécies vegetais com a *Bidens pilosa* L apresenta atividade antimalárica nos seus extratos brutos devido à presença de flavonóides (quercitin-3,3'-dimetoxi-7-O ramnoglucopiranosa) e de poliacetileno (1-fenil-1,3-dien-5-en-7-ol-acetato), (BRANDÃO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2004). Reddy et al. (2005) demonstraram a atividade biológica da curcumina presente na *Curcuma longa* L. como terapia antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Nandakumar et al. (2006) sugeriram o efeito sinérgico de combinações de curcumina e artemisinina para combater a malária em testes *in vivo*.

4.3. MATRIZES VEGETAIS

4.3.1 Cúrcuma (*Curcuma longa* L.)

A *Curcuma longa* (*C. longa*), também chamada de “turmeric” e de “falso açafrão” (no Brasil), pertence à família *Zingiberaceae*, e compreende 49 gêneros e 1400 espécies. É uma planta herbácea originária do sul e sudeste da Ásia tropical (ROTH et al., 1998), é perene de colheita anual; dependendo da variedade pode atingir uma altura de até 1 m sob condições agrotecnológicas favoráveis. Por baixo da terra produz um rizoma, o qual é principalmente explorado e transformado em pó para uso como especiaria. O rizoma primário é uma extensão do talo, a partir dele crescem muitos rizomas secundários de menor tamanho e de forma cilíndrica (YU, 2006).

Seu interesse comercial baseia-se principalmente na produção de pigmento natural (curcumina), oleoresinas, extratos e como ingrediente principal do “curry”, o qual é empregado como especiaria (MANZAN et al, 2003). O oleoresina é uma mistura da curcumina, frações voláteis, óleo não volátil e resinas, a qual é obtida por meio da extração com solventes orgânicos (como metanol, etanol, dicloroetileno ou acetona). O oleoresina é a fonte industrial da curcumina, e a concentração desta última caracteriza a qualidade da oleoresina (NEGI et al., 1999).

O extrato obtido dos rizomas possui propriedades medicinais para combater várias doenças, devido às propriedades anti-inflamatória, antioxidante, anti-bacteriana, atividade contra protozoários, alguns fungos e leveduras (NORAJIT et al., 2007; BALBI-PEÑA, et al., 2006; KHATTAK et al., 2005), antimutagênica e anticarcinogênica (BRAGA et al., 2003); também foi relatada a atividade dos extratos da *C. longa* contra o envenenamento por mordida de cobra (MELO et al., 2005).

Os rizomas secos da *C. Longa* L. possuem entre 2-5 % de óleo essencial e 0,02-2% de curcumina (BEGAN et al., 2000). A curcumina (Figura 4.1) possui um grupo alifático principal insaturado e um grupo arilo (ARAÚJO e LEON, 2001), o

qual é responsável pela cor, junto com a dimetoxicurcumina e a bis-dimetoxicurcumina. Destacam-se também sesquiterpenos como ar-turmerona e turmerona, representando até 60 % do óleo (BEGAN et al., 2000), seguido de α e β turmerona, sendo também uma fonte de alcalóides, terpenóides, flavonóides, entre outros, os quais são responsáveis pelas propriedades medicinais atribuídas pela medicina alternativa no tratamento de algumas doenças.

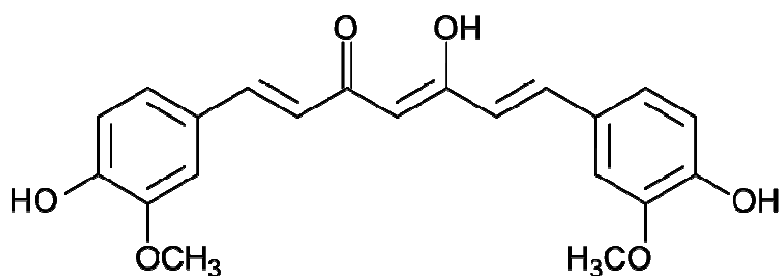


Figura 4.1 - Estrutura da curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona)

Na obtenção de extratos a partir da *C. Longa* foram empregados solventes como etanol (XIA et al., 2007; KHATTAK et al., 2005), dióxido de carbono supercrítico (BEGAN et al., 2000; CHASSAGNEZ-MENDEZ et al., 2000; BRAGA et al., 2003; CHANG et al., 2006) e álcool isopropílico (BRAGA et al., 2003). O uso de co-solventes como modificadores na EFS melhoram a extração, assim o uso de etanol até 30% foi relatado na extração de *C. longa* (SU et al., 2004), o metanol como co-solvente melhora a extração da curcumina (SANAGI et al., 1993). Nos trabalhos citados anteriormente foram avaliadas as atividades antioxidantes e anticarcinogênica, mas não foi avaliada a atividade antimalárica.

4.3.2 Artemísia (*Artemisia annua* L.)

A *Artemisia annua* (*A. annua*) também conhecida como *Caohao*, *Cao Qinghao*, (chinês), *sweet* ou *annual wormwood* (inglês), pertence à família *Asteraceae* e compreendem cerca de 400 espécies, muitas delas empregadas como medicamento na cultura chinesa e nos países asiáticos. É uma planta

aromática de caule ereto que pode atingir 1 m ou 2 m de altura. Suas folhas são alveoladas com 3 a 5 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura (WHO, 2006). Destaca-se o uso das folhas secas na medicina tradicional chinesa para tratamento de febre e de malária (WHO 2006, TARANTO, et al., 2006; PARK et al., 2003; SCHWIKKARD e VAN HEERDEN, 2002). As plantações comerciais de *A. annua* encontram-se em países da Ásia e da Europa, destacando-se a China; recentemente foi relatada a seleção de genótipos de *A. annua* adaptados dos híbridos ao clima tropical do sudeste Brasileiro (Campinas, SP) com alto rendimento de princípios ativos (Jornal da Unicamp, 2002).

Os produtos da *A. annua* compreendem uma fração volátil e uma não volátil; a fração volátil pode corresponder até 4 % das folhas (LAPKIN et al., 2006) e possui principalmente: canfeno, β -canfeno, isoartemisia cetona, 1-cânfora, β cariofileno e β pineno em maior quantidade, enquanto que artemisia cetona, 1,8 cineol, canfeno hidratado, carvacrol, timol e cuminal estão presentes em menores quantidades. Na fração não volátil, encontram-se principalmente flavonóides, sesquiterpenóides (artemisinina, ácido artemísico, artemisilactona, artemisinol e ácido epoxiarteanuínico), cumarinas, proteínas (β galactoxidase e β glucosidases) e esteroides (β sitosterol e estigmasterol) (WHO, 2006).

A *A. annua* apresenta atividade farmacológica para o tratamento da malária e febre (TZENG et al., 2007), possuindo também atividade analgésica, antipirética, antibacteriana, antiinflamatória (WHO, 2006) e antifúngica (WOERDENBAG e PRAS, 2002). A artemisinina, composto presente nas folhas e flores entre 0,01 % até 0,8 % do seu peso seco (VAN AGTMAEL et al., 1999 *apud* BARLINT 2001); sua atividade está ligada ao combate do *Plasmodium falciparum* multirresistente. A artemisinina é recomendada pela WHO, para estar presente nos medicamentos empregados de combate à malária (WHO, 2006). Outro uso da fração volátil (óleo essencial) da *A. annua* encontra-se na indústria de perfumaria e cosmética, devido ao seu aroma.

A artemisinina (Figura 4.2) é uma lactona sesquiterpênica e possui um grupo endoperoxídeo ao qual se deve sua atividade (SCHWIKKARD e VAN

HEERDEN, 2002; BARLINT, 2001). Os seus processos de síntese química são muito complexos, pouco eficientes e caros, características que fazem dos extratos oriundos da *A annua* a única fonte natural da artemisinina (SCHWIKKARD e VAN HEERDEN, 2002).

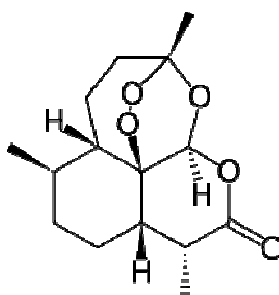


Figura 4.2 - Estrutura química da artemisinina.

Na obtenção dos extratos que contém artemisinina, o processo em escala industrial emprega éter de petróleo em múltiplas etapas; do mesmo modo foi relatado o emprego do hexano, heptano e tolueno. O uso de etanol como solvente permite separar a artemisinina por cristalização em processo de múltiplas etapas; entretanto, este extrato contém geralmente grandes quantidades de compostos indesejáveis como clorofilas e resinas, sendo processos com baixa seletividade (LAPKIN et al., 2006). Rodrigues et al. (2006) relatam o uso de etanol na obtenção de extratos brutos ricos em artemisinina.

O dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) foi demonstrado ser mais seletivo para extração de artemisinina quando comparado com processos convencionais de extração, mas ainda não foi avaliada a atividade antimalárica nos extratos obtidos (KOHLE et al., 1997; QUISPE-CONDORI et al., 2005; TZENG et al., 2007).

4.3.3 *Bidens pilosa* L.

A *Bidens pilosa* (*B. pilosa*) pertence à família *Asteraceae*, no Brasil é conhecida popularmente como “picão” ou “picão-preto”. Nativa da América do Sul

encontra-se amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, atingindo até 1 m de altura (DEBA et al., 2008).

É considerada uma erva daninha e invasora, porém é utilizada na medicina popular no tratamento de icterícia, disenteria, malária, além de doenças inflamatórias (LERMEN et al., 2006). Estudos reportam sua bioatividade antireumática, diurética, antibiótica, antidiabetes (BRANDÃO et al., 1998), antitumoral (KVIECINSKI et al., 2008), anti-hiperglicêmico (UBILLAS et al., 2000), anti-hipertensiva (DIMO et al., 2001), antiulcerogênica (ROJAS et al., 2006, TAN et al., 2000), imunossupressor (PEREIRA et al., 1999), antibacteriana (RABE e VAN STADEN, 1997), antimicrobiana e hipoglicemiante (KHAN et al., 2001), imunomodulatória (CHANG et al., 2007), antioxidante e antifúngica (DEBA et al., 2008). Outros estudos experimentais mostram que os extratos etanólicos brutos dos rizomas têm atividade contra o parasita *Plasmodium falciparum* responsável pela transmissão da malária (ANDRADE-NETO et al., 2004; BRANDÃO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2004; RABE e VAN STADEN, 1997). Os constituintes mais importantes dos extratos alcoólicos são poliacetilenos e flavonóides.

Entre os compostos bioativos da *B. pilosa* encontram-se alcalóides, esteróis, taninos (KHAN et al., 2001), glicosídeos fenilpropanóides, poliacetilenos, flavonóides e flavonas glicosiladas (CHIANG et al., 2004). No óleo essencial foram identificados 44 compostos, entre os quais a maioria são terpenos, principalmente β -cariofileno (10,9 %) e τ -cadineno (7,82 %) entre outros (DEBA et al., 2008).

Para obtenção dos extratos empregando-se solventes como o etanol (ANDRADE-NETO et al., 2004; BRANDÃO et al., 1997; KHAN et al., 2000), a água e o metanol (CHANG et al., 2007, ABAJO et al., 2004, RABE e VAN STADEN, 1997). Não foram relatados estudos relacionados à extratos empregando dióxido de carbono supercrítico.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Matérias primas e reagentes

Folhas de *A. annua* e raízes de *B. pilosa* foram coletadas na fazenda experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP), e a amostra de rizomas de *C. longa* é oriunda do estado de Mato Grosso (Figura 4.3 e Tabela 4.1). As amostras de *B. pilosa* e *C. longa* foram desidratadas em estufa com circulação de ar, enquanto que a *A. annua* foi desidratada ao sol. Depois disto, as plantas foram trituradas em moinho de facas (modelo MA-340, Marconi, Brasil), classificadas de acordo com o tamanho usando peneiras vibratórias da serie Tyler (Bertel, Brasil) por 15 minutos. Após, as amostras foram empacotadas em sacos plásticos e estocadas em freezer doméstico (modelo 220, Cônsul, Brasil) a -10°C .



Figura 4.3 – Fotos dos rizomas de *C. longa* (a), de folhas de *A. annua* (b) e das raízes de *B. pilosa* (c).

Tabela 4. 1 - Detalhes das matrizes vegetais empregadas neste trabalho.

Planta	Parte usada	Colheita	Condições de secagem
<i>Artemisia annua</i> L.	folhas	Março 2008	Secada ao sol durante 3 dias
<i>Curcuma longa</i> L.	rizomas	Outubro 2007	Estufa com recirculação de ar 40 °C
<i>Bidens pilosa</i> L.	raízes	Março 2008	Estufa com recirculação de ar 40 °C

Dióxido de carbono 99,5 % w/w (White Martins Gases Industriais, Brasil), etanol 99,5 %w/w (Synth, Brasil, lote 123134), água ultra pura Milli-Q (Millipore direct-Q3 UV, Millipore Corporation, USA) foram empregados como solventes nos diferentes processos de extração.

4.4.2 Caracterização física das matérias primas

As matérias primas foram caracterizadas quanto a propriedades das partículas e propriedades do leito fixo de partículas.

4.4.2.1 Propriedades das partículas

O teor total de voláteis e umidade, o diâmetro médio das partículas, a densidade real, a esfericidade e a microestrutura, foram determinadas de acordo aos métodos descritos na Seção 3.4.2.1.

4.4.2.2 Propriedades do leito de partículas

A porosidade, tortuosidade e densidade aparente do leito de partículas formado para as extrações com scCO₂, foram determinadas de acordo aos métodos descritos na Seção 3.4.2.2.

4.4.3 Metodologia para a obtenção dos extratos

As diferentes matrizes vegetais foram submetidas a processos de extração em etapa única ou em duas etapas. No primeiro caso foram empregados diferentes solventes: CO₂ supercrítico (SC), água (A) e etanol (E). Processos de

extração em duas etapas foram estudados a partir do material residual da extração SC, quando re-extraído com água (SCA) ou etanol (SCE). Todas as extrações foram realizadas em triplicata de acordo a metodologia descrita na Seção 3.4.3.

4.4.4 Análises químicas dos extratos

Nos diferentes extratos foram determinados o teor de fenóis totais, flavonóides totais e atividade antioxidante (extratos de *C. longa*), segundo a metodologia descrita na Seção 3.4.4.

4.4.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-FR)

Quantificação de curcumina

Foi determinada a quantidade de curcumina presente nos diferentes extratos da *C. longa* L. por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi empregado um cromatógrafo líquido (Waters Alliance, modelo 2695) acoplado a detector de índice ultra-violeta (Waters, modelo 2996), com coluna Symmetry C-18 (75* 2,1 mm, 3,5 µm), gradiente de água (0,25 % ácido acético)/metanol como fase móvel (vazão 0,2 mL/min.), 48 °C de temperatura de coluna. A curva analítica foi preparada a partir do padrão de curcumina (Aldrich referência C138-5G, lote 048K0704).

Quantificação de artemisinina

Foi determinada a quantidade de artemisinina presente nos diferentes extratos da *A. annua*, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi empregado um cromatógrafo líquido (Waters, modelo 515) acoplado a detector de índice de refração (Waters, modelo 2414), com coluna Phenomenex Luna CN-100 (250* 4,6 mm, 5 µm), água/metanol (60:40) como fase móvel (vazão 1,0 mL/min.), 35 °C foi a temperatura do detector. A curva analítica foi preparada a

partir do padrão de artemisinina com grau de pureza de 98 % (Aldrich, referência 361593, lote 0720DH).

4.4.4.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os compostos voláteis capturados na coluna com Porapak-Q na ESC foram eluídos com 1 mL de acetato de etila e analisados para identificação. As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC 6890N, Agilent 5975), com coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) e gás de arraste hélio 1mL/min. A programação de aquecimento da coluna utilizada foi de 60°C - 246°C a 3°C/min (ADAMS, 1995). As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 250 °C, respectivamente. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com dados da literatura (ADAMS, 1995); com o banco de dados do sistema CG/EM - biblioteca Wiley e NIST; e com o índice de retenção relativo a uma série de n-alcanos (C9-C30, C32).

4.4.4.3. Atividade antioxidante

Nos extratos da *C. longa* foi avaliada a atividade antioxidante através da capacidade de sequestro do radical DPPH e do teste DBC, segundo as metodologias descritas na Seção 3.4.4.5.

4.4.4.4. Atividade antimalárica

Nos extratos da *B. pilosa* foi avaliada a atividade antimalárica, os testes foram realizados no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob colaboração e coordenação do Prof. Dr. Fábio T.M. Costa.

Ensaio de Citotoxicidade

O extrato e as frações foram solubilizados em meio DMSO 1,25% em RPMI nas seguintes concentrações: 1600, 400, 100 e 25 µg/mL. Em uma placa de 96 poços, acrescentou-se a cada poço 100 µL do extrato e/ou das frações diluídas e 100µL da solução de hemácias sadias. Após 48 horas de incubação a quantidade de eritrócitos presentes foi avaliada através da contagem em câmara de Neubauer e a toxicidade dos compostos foi estimada comparando-se o número de eritrócitos presentes no grupo tratado e no grupo controle.

Cultura de eritrócitos infetados com *Plasmodium falciparum*

Eritrócitos infetados (IE) com *P.falciparum* 3D7 foram cultivados em eritrócitos humanos O⁺ (Hemocentro- UNICAMP) até atingir 4% de hematócritos em meio completo (RPMI 1640; Sigma) suplementado com 10% de plasma humano, ajustado até pH 7,2.

Teste *in vitro*

A atividade dos extratos foi determinada como previamente descrita por Lopes et al. (2009), avaliando a incorporação de [³H]-hipoxantina (Amersham Biosciences, UK) ao crescimento do parasita. Os testes empregam 96 placas com volume final de 200 µL, dos quais 100 µL foram de meio RPMI sem drogas (controle) ou com drogas (contendo os extratos a avaliar) e 100 µL de suspensão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (hematócitos finais de 2% e parasitemia de 1%).

As drogas foram preparadas a partir dos extratos, que foram dissolvidos em DMSO ($\leq 0,25$ % v/v) no meio de cultura; assim, nos respectivos controles foi adicionado DMSO até conter a mesma quantidade que nas drogas.

Depois de 30 h de incubação a 37 °C foi acrescentado 50 µL de meio contendo 10 µCi [³H]-hipoxantina em cada uma das placas; depois de 18h a 37 °C as células

foram rompidas e a sua radioatividade (CPM) medida em contador (Beckman, L-5600 TA, USA). A radioatividade de fundo foi determinada pela incubação dos eritrócitos não infectados (nIE) nas mesmas condições descritas acima.

As drogas foram testadas no mínimo em triplicata e o crescimento do parasita foi comparado com as placas de controle, que representam os 100% de crescimento do parasita. A inibição do parasita é calculada com a seguinte Equação (4.1).

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\left(\frac{\text{CPM amostra} - \text{CPM nIE}}{\text{CPM placa controle} - \text{CPM nIE}} \right) * 100 \right] \quad (4.1)$$

A eficácia das drogas foi determinada pela comparação do valor do IC₅₀, o qual mede a concentração que produz 50% de inibição.

4.4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para identificar os tratamentos com as melhores respostas foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Nesta etapa foi empregado o software Statistica[®] V.7.0 (StatSoft, EUA). As análises de regressão conduziram a obter os valores de CE₅₀ (no teste de atividade antioxidante) e IC₅₀ (no teste de atividade antiplasmodica), foram feitas empregando Microsoft Excel[®] 2003, Curveexpert V. 1.38 (Daniel Hyams) e GraphPad Prism[®] v.5 (GraphPad Software, USA).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Caracterização das matérias primas

As diferentes propriedades que caracterizam as amostras de *A. annua*, *C. longa* e *B. pilosa* estão apresentadas na Tabela 4.2. Os valores para

voláteis+água (%VU) para as diferentes amostras variaram entre 10 e 13%; no entanto a medida de umidade pelo método de *Karl Fisher* (%U) apresentam valores entre 7 a 10 %, diferença explicada pelas condições do teste gravimétrico, pois além da umidade contabiliza os voláteis liberados (WHO, 1998; ISENGARD, 2001). O método *Karl Fisher* permite a quantificação direta de água em plantas medicinais e especiarias (MIRA et al., 1996, SUPARTONO et al., 1998, BRUTTEL e SCHILINK, 2003, GLISIC et al., 2008).

A esfericidade (ϕ) é um parâmetro morfológico que está diretamente relacionado com as características de empacotamento das partículas no leito. A *C. longa* apresenta o maior valor de esfericidade (0,56) e a *B. pilosa* apresentou o menor valor (0,34). As Figuras 4.4c 4.4d evidenciam que a maioria das partículas da *B. pilosa* são alongadas e com aspecto de fibra, possivelmente devido a serem procedentes da raiz de esta planta.

A tortuosidade do leito de partículas calculada a partir da equação de Boudreau apresentara valores entre 1,14 a 1,38, no entanto, com a equação de Lanfrey os valores estiveram entre 0,76 a 1,6. As predições feitas com a equação de Boudreau possuem maior significado físico, pois os valores de tortuosidade são maiores que 1 ($\tau > 1$). A subestimação predita pela equação de Lanfrey acontece com valores altos de porosidade (LANFREY et al., 2010). Quanto a processos de transferência de massa, estudos de Shen e Chen (2007) relataram uma forte dependência entre a forma e tamanho das partículas com o coeficiente de difusão.

Tabela 4. 2 - Resultados caracterização das matérias primas.

	<i>Artemisia annua</i> L	Cúrcuma longa L	<i>Bidens pilosa</i> L
partículas			
VU (%)	10,47 ± 0,08	13 ± 1	10.01 ± 0,06
U (%)	8,1 ± 0,2	6,9 ± 0,1	9,7 ± 0,2
ρ_r (g/cm ³)	1,44 ± 0,04	1,42 ± 0,03	1,52 ± 0,03
d_{mg} (mm)	0,838	0,823	0,893
ϕ	0,473	0,555	0,339
leito			
ρ_a (kg/m ³)	279 ± 4	516 ± 6	213 ± 4
τ^a	0,765	1,629	0,903
τ^b	1,196	1,380	1,141
ε	0,806	0,636	0,860

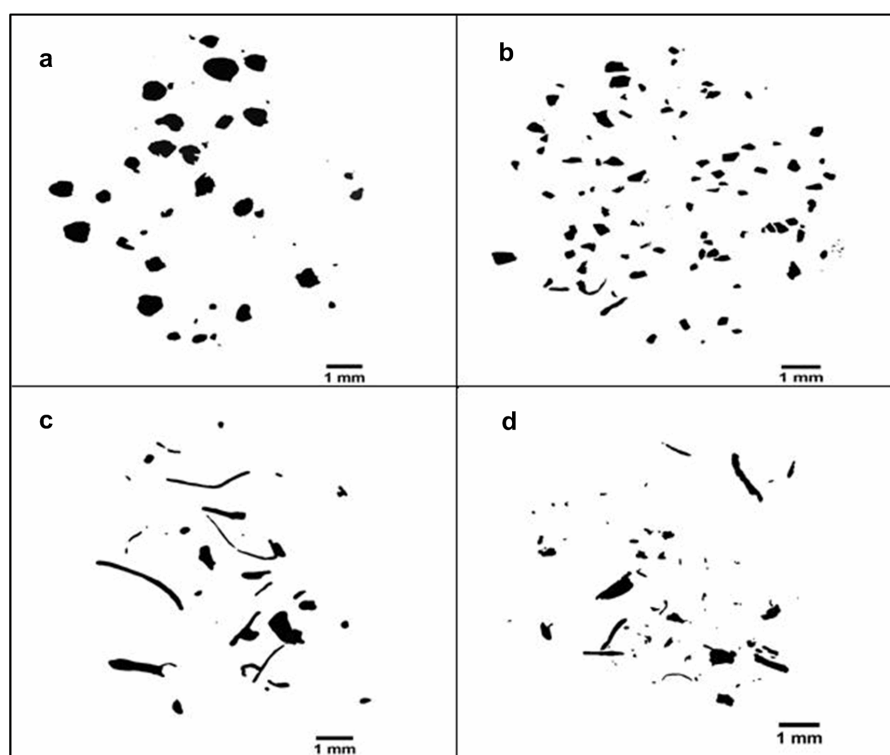
^a calculada apartir da equação de Lanfrey et al. (2010)^b calculada apartir da equação de Boudreau et al. (1996)

Figura 4.4 - Fotografias 8 bit das matrizes vegetais após o processamento digital. C. longa (a) A. annua (b), B. pilosa L. (c, d).

Determinação de microestrutura

Na Figura 4.5 são apresentadas as micrografias das diferentes matrizes vegetais obtidas com ajuda da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Antes da extração supercrítica a microestrutura das matrizes apresenta regiões com superfície mais compacta, íntegra e homogênea (Figura 4.5a, 4.5c e 4.5e). Após extração supercrítica são evidenciadas partículas dispersas (Figura 4.5b) e aumento de porosidade na microestrutura (Figura 4.5d) e regiões com microestrutura mais aberta e porosa (Figura 4.5b, 4.5d e 4.5f).

No caso da *B. pilosa* é apresentada também a microestrutura desta matriz após extração etanólica (E) (Figura 4.5g) e a matriz residual final após processo em duas etapas (SCE) (Figura 4.5h). A extração etanólica preservou mais a integridade da microestrutura quando comparada com as outras extrações. Isto é devido a que às raízes possuir estrutura composta principalmente por polímeros como celulose e lignocelulose.

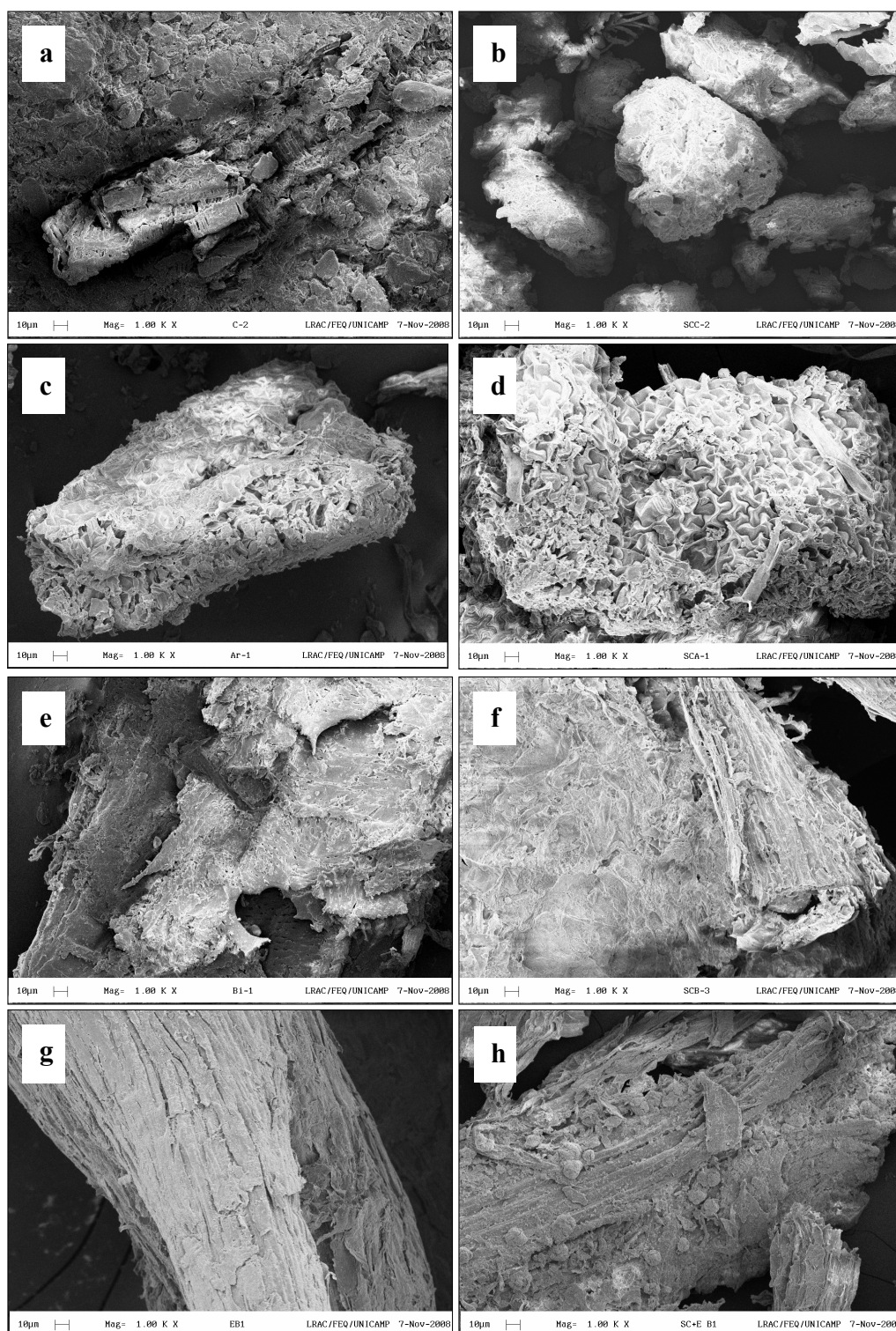


Figura 4.5 - Microestrutura das matrizes vegetais (x 1000): *C. longa* L.: (a) antes, (b) após da extração supercrítica, *A. annua*: (c) antes, (d) após da extração supercrítica, *B. pilosa*. (e) antes, (f) após da extração supercrítica, (g) após da extração etanólica, (h) após da extração etanólica com prévia extração supercrítica

4.5.2 Rendimento e cinética de extração

Na Tabela 4.3 e nas Figuras 4.6 e 4.7 são apresentados os resultados obtidos nos testes de extração de curcuma, artemisia e bidens em etapa única: com scCO₂ (SC), extração com água (A) e com álcool (E), e em duas etapas: extração aquosa antecedida pela supercrítica (SCA), extração etanólica antecedida pela supercrítica (SCE). Para efeito de comparação também foram apresentados os rendimentos acumulados: extração supercrítica + água (SC+SCA), extração supercrítica + etanol (SC+SCE); todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Tabela 4.3 - Concentração de fenólicos e respectivos rendimentos de extração em extratos de *C. longa*, *A. annua* e *B. pilosa*.

<i>Curcuma longa</i>								
	Extrato	Rendimento (%) [*]	Fenóis Totais		Flav. Totais		Curcumina	
			Conc	Rend	Conc	Rend	Conc	Rend
etapa única	SC	5,8 ± 0,2 0,8 ± 0,3 ^a	5,8 ± 0,6	0,33 ± 0,04	6,70 ± 0,05	0,39 ± 0,01	52,3	3,02
	A	18,5 ± 0,9	44 ± 2	8,1 ± 0,8	35,6 ± 0,7	6,6 ± 0,4	2,2	0,41
	E	9,5 ± 0,9	430 ± 12	41 ± 5	430 ± 5	41 ± 4	354,1	33,72
duas etapas	SCA	16,8 ± 0,7	16,1 ± 0,7	2,7 ± 0,2	19,1 ± 0,2	3,21 ± 0,09	3,7	0,62
	SCE	6,9 ± 0,5	453 ± 31	32 ± 4	278 ± 8	19 ± 2	564,7	39,44
	SC+SCA ^{**}	23,4 ± 0,6		2,8 ± 0,2		2,23 ± 0,1		3,64
	SC+SCE ^{**}	13,6 ± 0,6		29 ± 4		16 ± 2		42,46
<i>Artemisia annua</i>								
	Extrato	Rendimento (%) [*]	Fenóis Totais		Flav. Totais		Artemisinina	
			Conc	Rend	Conc	Rend	Conc	Rend.
etapa única	SC	5,7 ± 0,1 0,08 ± 0,06 ^a	40,1 ± 0,4	2,3 ± 0,3	29,15 ± 0,01	1,6 ± 0,3	95,1	5,47
	A	22,4 ± 0,7	97 ± 6	22 ± 2	61,1 ± 0,2	13,7 ± 0,5	n.d.	-
	E	5,7 ± 0,4	45 ± 1	2,5 ± 0,2	65 ± 2	3,8 ± 0,4	95,6	5,49
duas etapas	SCA	22 ± 1	91 ± 5	20 ± 2	57,11 ± 0,08	12,8 ± 0,7	n.d.	-
	SCE	2,3 ± 0,1	90 ± 4	2,0 ± 0,2	123 ± 4	2,8 ± 0,2	n.d.	-
	SC+SCA ^{**}	28 ± 1		22 ± 2		14 ± 1		
	SC+SCE ^{**}	8,2 ± 0,2		4,1 ± 0,5		15,6 ± 0,5		
<i>Bidens pilosa</i>								
	Extrato	Rendimento (%) [*]	Fenóis Totais		Flav. Totais			
			Conc	Rend	Conc	Rend		
etapa única	SC	1,12 ± 0,05 0,32 ± 0,01 ^a	20,4 ± 0,6	0,22 ± 0,02	29 ± 1	0,32 ± 0,02		
	A	6 ± 1	11,62 ± 0,05	0,7 ± 0,1	5,39 ± 0,05	0,34 ± 0,07		
	E	1,2 ± 0,4	54 ± 1	0,7 ± 0,2	84 ± 1	1,01 ± 0,3		
duas etapas	SCA	8 ± 1	14,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	7,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1		
	SCE	0,3 ± 0,1	87 ± 23	0,29 ± 0,07	81 ± 3	0,3 ± 0,1		
	SC+SCA ^{**}	10 ± 2		1,3 ± 0,2		0,9 ± 0,1		
	SC+SCE ^{**}	1,8 ± 0,2		0,46 ± 0,09		0,5 ± 0,1		

^{*} Rendimento (% b.s.), ^{**} Rendimento acumulado (% b.s.), ^a : rendimento fração volátil, n.d.: não detectado, Conc: mg/g extrato, Rend: mg/g matriz. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

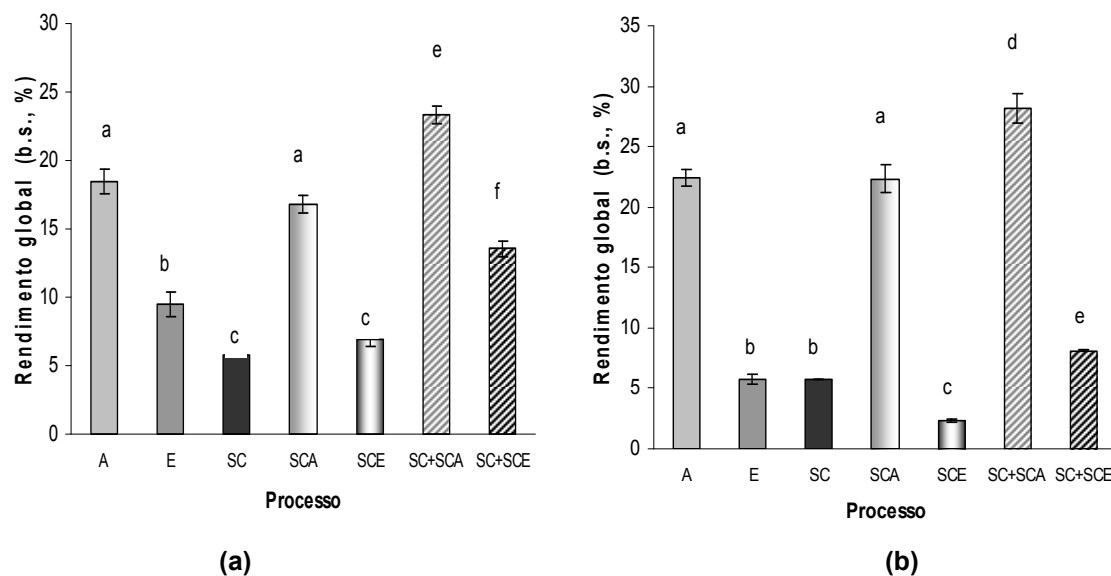


Figura 4.6 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração . (a) *C. longa* L., (b) *A. annua*. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Em geral, o rendimento global no processo em etapa única para as diferentes matrizes foi maior para a extração aquosa (A) isto influenciado pela polaridade da água, pois apresenta tendência decrescente em rendimento com o decréscimo de polaridade do solvente.

Para a *A. annua* e *B. pilosa*, o fato de não apresentar diferenças significativas entre os rendimentos globais de processo etanólico (E) e supercrítico (SC) ($p < 0,05$), poderia ser explicado em termos da baixa polaridade dos compostos extraíveis (ou famílias de compostos) com estes solventes.

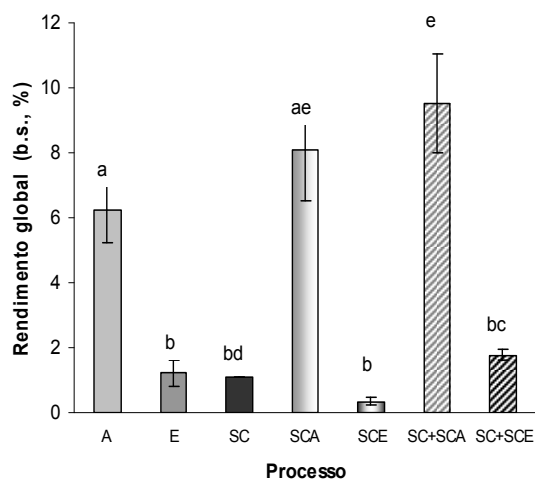


Figura 4.7 - Valores médios dos rendimentos obtidos na extração de *B. pilosa*. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Os diferentes processos estudados para a extração de *B. pilosa* resultaram em baixos rendimentos globais de extração quando comparados com as outras matrizes vegetais, evidenciando a baixa quantidade de solutos extraíveis nesta matriz (Figura 4.7). Observa-se nos resultados obtidos nos diferentes processos que houve diferença significativa entre a extração aquosa (A) e as extrações etanólica (E) ou a supercrítica (SC), notando-se que não houve diferença apreciável entre os rendimentos dos processos E e SC, fato explicado pela seletividade e polaridade dos solventes como pela natureza dos compostos presentes nesta matriz vegetal.

Nos processos de extração em duas etapas, a extração prévia com scCO_2 permitiu melhoria significativa no rendimento acumulado (SC+SCA, SC+SCE), fato explicado pela natureza da matriz sólida e suas interações com os solutos, pois grande parte dos compostos solúveis são extraídos nos primeiros instantes na extração supercrítica, mostrando que compostos de baixa polaridade são extraídos na etapa SC, e possivelmente favorecendo interações matriz-solutos

(BENNER, 1998) retendo solutos à matriz residual, ficando menos disponíveis para a extração posterior.

Em termos gerais, as extrações aquosas (A e SCA), apresentaram os maiores rendimentos. Também pode ser comentado que a contribuição da extração prévia com scCO₂ sobre os processos SC+SCA e SC+SCE afetam positivamente o rendimento acumulado.

Cinéticas de extração com CO₂ supercrítico

As Figuras 4.8 e 4.9 representam as curvas de extração em termos dos rendimentos dos extratos obtidos em função da massa de CO₂ durante a extração da *C. longa L*, *A. annua* e *B. pilosa* com scCO₂ a 400 bar, 60 °C e 4,0.10⁻⁵ kg/s de vazão de CO₂. Foram feitas três extrações, duas fracionadas e uma total (teste 3) para rendimento global.

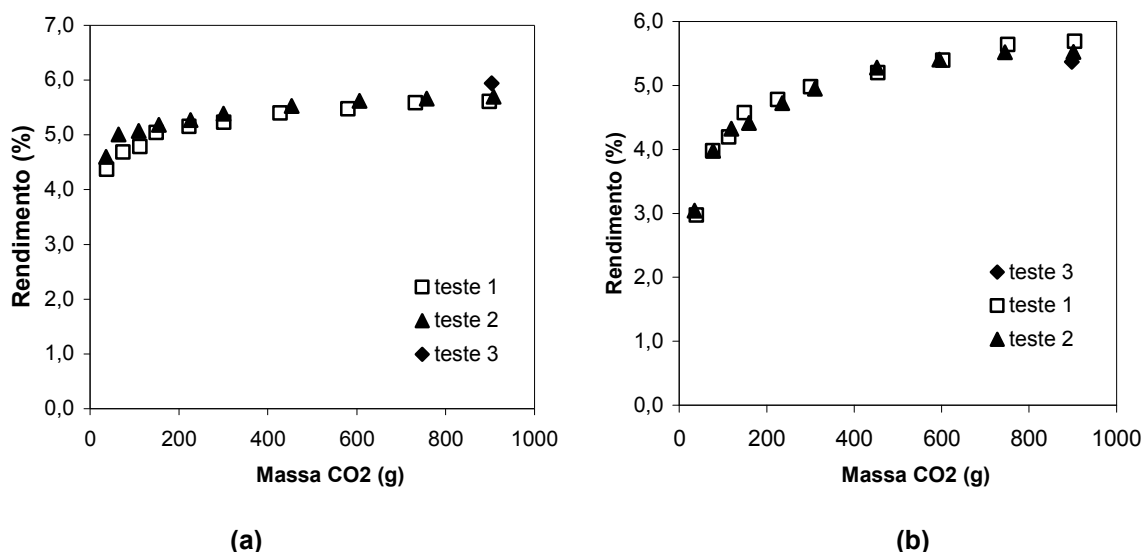


Figura 4.8 - Rendimentos na extração com CO₂ supercrítico. (a) *C. longa L*. (b) *A. annua*.

Os experimentos de fracionamento foram bem conduzidos não apresentando diferenças apreciáveis entre os experimentos. Durante o fracionamento da *C. longa L* observa-se que grande parte do extrato é obtida nos

primeiros instantes do processo (primeiro ponto de cada curva, equivalente a 15 minutos de extração); o rendimento atinge um valor médio de 3,89% ($\pm 0,54$) correspondendo a 74% do rendimento total. Portanto, apresenta alta taxa de transferência de massa desde a matriz para o solvente scCO_2 , possivelmente devido à alta solubilidade das substâncias nestas condições. Depois desta fase, a curva atinge um valor constante no rendimento equivalente a 5,8 %, indicando que a matriz vegetal foi praticamente esgotada durante o processo de extração (Figura 4.8a).

Na Figura 4.8b é apresentada a cinética do processo de fracionamento de *A. annua*, expressa como rendimentos dos extratos obtidos em função da massa de CO_2 a 400 bar e 60 °C. Na Figura (4.8b) apresenta duas repetições feitas durante o fracionamento e um ponto (uma extração) no terceiro teste para obter rendimento global. No fracionamento da *A. annua* observam-se diferentes regiões: a primeira dependente da solubilidade dos solutos extraídos, uma intermediária, e a terceira controlada pela difusividade. Nas primeiras duas frações (15 min de extração) foi obtido 3,9 % de rendimento acumulado, o que corresponde a 76 % do total do processo, apresentando a alta taxa de transferência de massa; depois da 6ª fração, a curva atinge um valor praticamente constante no rendimento próximo a 5,7 %.

Na Figura 4.9 é apresentada a curva de extração supercrítica da *Bidens pilosa* a 400 bar e 60 °C. Na extração da *B. pilosa* observa-se que grande parte dos pontos experimentais no início do processo encontram-se na região fortemente dependente da solubilidade dos solutos extraídos, na qual a taxa de transferência de massa é aproximadamente constante (aumento linear do rendimento com a massa de CO_2), após esse período há diminuição da taxa até atingir um novo valor praticamente constante na parte final da curva de extração.

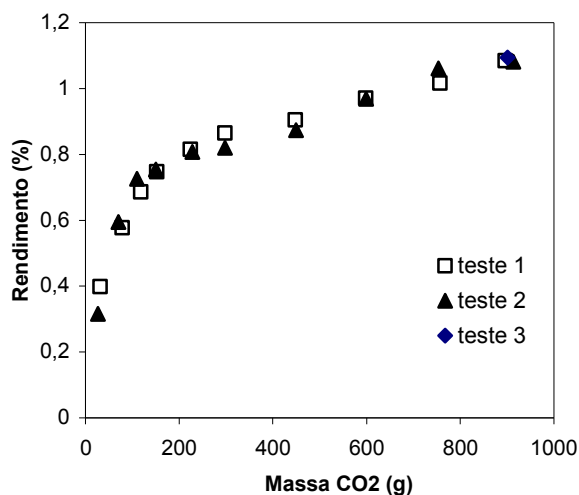


Figura 4.9 - Rendimentos na extração da *B. pilosa*.

4.5.3 Fenóis totais

Representa-se na Figura 4.10 os dados da Tabela 4.3 para a concentração de compostos fenólicos nos extratos das três plantas. Pode se observar que o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos da *C. longa* e *B. pilosa* tanto nos processos em etapa única quanto em duas etapas que envolvem etanol (E, SCE) foram bem superiores aos conteúdos com os outros solventes. No caso da cúrcuma, o extrato etanólico apresenta elevada concentração de compostos fenólicos. No caso da *A. annua*, os extratos com maior conteúdo de substâncias polifenólicas foram obtidos nos processos que envolvem água, tanto em etapa única quanto em duas etapas (A, SCA). Esta diferença no comportamento destas matrizes vegetais é devida à polaridade das substâncias polifenólicas presentes em cada matriz e extraídas com os diferentes solventes; nesse sentido também explica as diferenças no rendimento de extração (Figura 4.11).

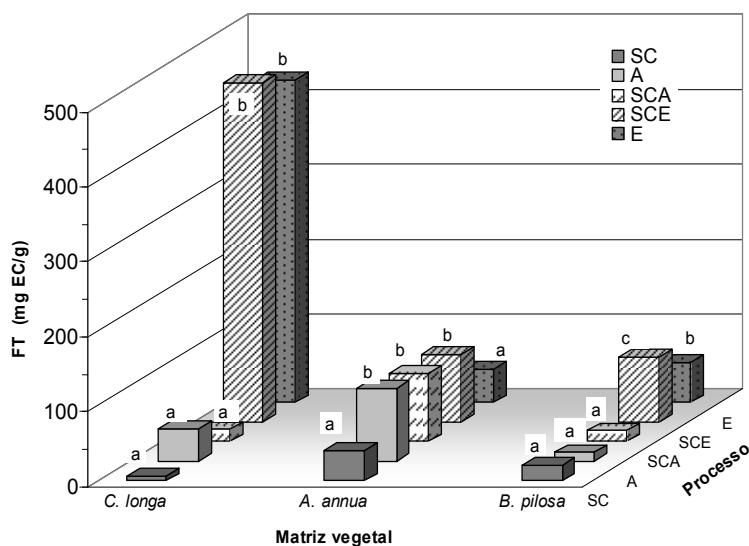


Figura 4.10 - Teor de compostos fenólicos totais (FT). As barras representam valor da média dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

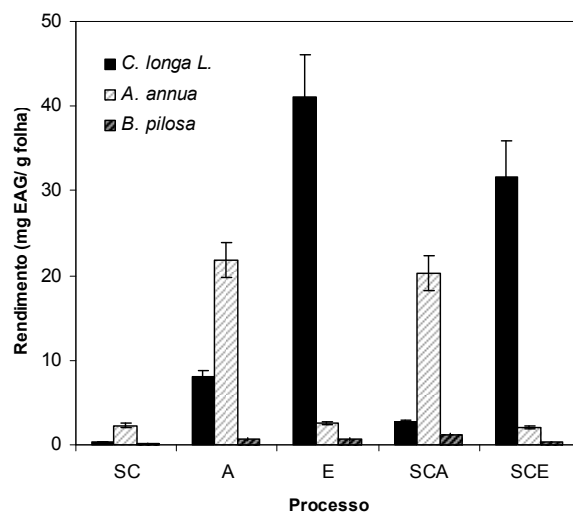


Figura 4.11 - Rendimento de extração de compostos fenólicos totais. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

4.5.4 Flavonóides totais

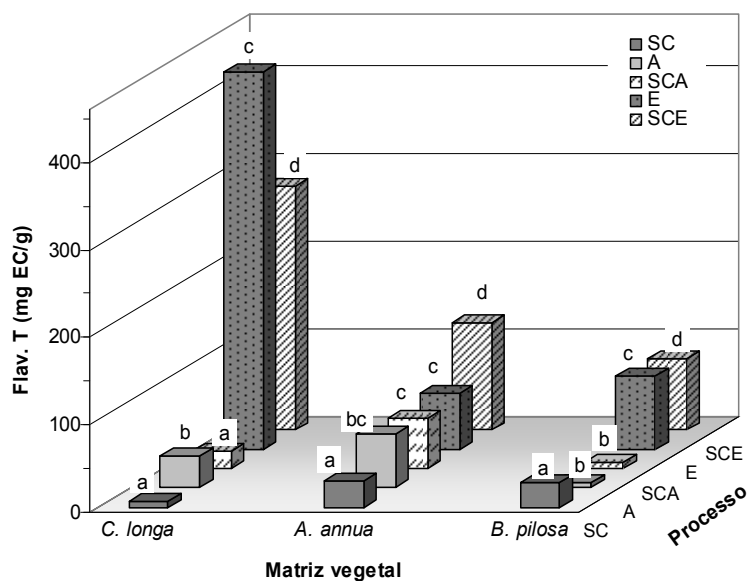


Figura 4.12 - Teor de flavonóides totais. As barras representam valor da média dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

A determinação do conteúdo de compostos da família dos flavonóides a partir da *C. longa* L., *A. annua* e *B. pilosa* apresentaram diferenças significativas em função do tipo de processo de extração aplicada a cada matriz vegetal (Figura 4.12). No caso da *C. longa* e *A. annua*, os processos de extração em uma única etapa apresentaram comportamento dependente do solvente; assim, foi obtido: $E > A > SC$. Já no caso da *B. pilosa*, a extração etanólica (E) permitiu obter extrato com maior conteúdo de flavonóides.

A eficiência dos processos de extração (em termos de rendimento) permite inferir que esta família de compostos é mais facilmente extraída com solventes de polaridade alta; destaca-se o alto rendimento de extração de flavonóides a partir da *C. longa* L. quando empregado etanol (Figura 4.13). Para esta matriz vegetal, a extração prévia com $scCO_2$ produziu efeito negativo no rendimento de extração de flavonóides, pois foram obtidos extratos com menor teor de flavonóides (278 mg EC/g, para SCE) e (430 mg EC/g, para E). A extração previa de compostos

de baixa polaridade com scCO_2 produz uma matriz mais polar e portanto promove interações moleculares entre os flavonóides e a matriz (GRIGONIS et al., 2005).

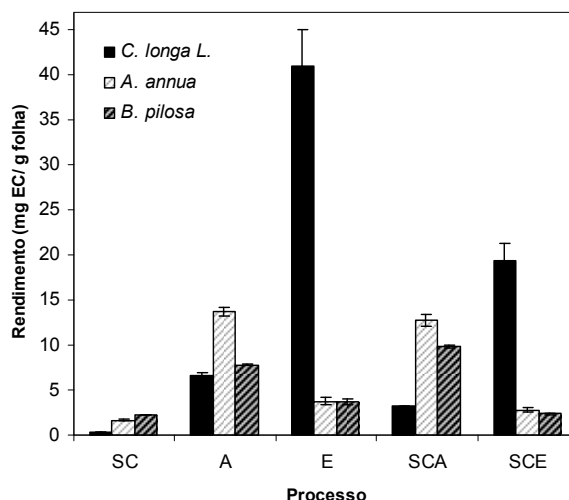


Figura 4.13 - Rendimento de extração de flavonóides totais. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

4.5.5 Teor de curcumina e artemisinina

As análises por meio de HPLC permitiram quantificar curcumina, nos extratos de cúrcuma e artemisinina, nos extratos de Artemísia (Tabela 4.3, Figura 4.14). Quanto à curcumina os rendimentos e concentrações dos extratos em processo em etapa única foram altas quando empregado etanol (354,1 mg/g ou 35,4 %), seguido de CO_2 supercrítico (52,3 mg/g ou 5,23%) e água (2,2 mg/g). Estes resultados são superiores aos reportados em vários estudos: Sanagi et al. (1993) obtiveram extratos com 5,34 % de curcumina com ajuda de metanol como co-solvente (280 bar, 60 °C), Braga e Meireles (2007) obtiveram extratos com 0,72 % de curcuminóides totais (300 bar, 60 °C, com mistura de etanol – isobutanol como co-solvente) e 12 % no caso de extração fracionada com scCO_2 nas mesmas condições. Diferenças na polaridade de solvente e soluto afetam os

rendimentos de extração da curcumina, pois o emprego de etanol resulta em altas concentrações e rendimentos de extração (Tabela 4.3).

Tomando como base a concentração e rendimento de curcumina, o processo em duas etapas, primeiro pela extração supercrítica (SC) e posterior extração alcoólica (SCE) é consideravelmente melhor que o processo de extração etanólica em uma única etapa (E), pois produz três extratos: duas frações supercríticas (fração mais volátil e uma óleoresina com 52,3 mg/g de curcumina) e um extrato etanólico contendo 565 mg/g de curcumina, concentração bem maior que na obtenção de um único extrato etanólico com 354 mg/g de curcumina. Considerando os dois extratos, a soma em termos de rendimento passa de 34 mg/g do extrato etanólico para 42 mg/g (soma dos extratos supercríticos e etanólico). Assim, pode-se afirmar o efeito positivo da extração prévia com CO₂ supercrítico, que permite remover mais compostos ou grupos de compostos, aumentando os rendimentos na etapa seguinte de extração, possivelmente decorrente das mudanças nas interações soluto-soluto (AZEVEDO et al., 2008), solutos-matriz (SOVOVÁ et al., 2004) e mudanças na microestrutura da matriz vegetal (del VALLE et al., 2005) e portanto facilitando a extração da curcumina encontrada no resíduo proveniente da extração supercrítica (SANAGI et al., 1993; CHASSAGNEZ-MENDEZ et al., 2000). Este fato foi confirmado pelo resultado obtido neste trabalho com a extração etanólica do resíduo proveniente da etapa supercrítica (SCE), de onde se obteve altíssima concentração de curcumina (565 mg/g ou 56,5 %) e também aumento de rendimento de 34 para 39 mg/g.

Deste modo, o processo em duas etapas envolvendo o scCO₂ e etanol é eficiente na separação de curcumina, sendo ambos solventes permitidos tanto no uso alimentar quanto farmacêutico com baixas temperaturas evitando a degradação térmica do soluto (MANDAL et al., 2008). Este processo em duas etapas permite a obtenção de extratos com maiores conteúdos de curcumina e com maiores rendimentos de extração (Figura 4.14), quando comparado com processos como extração em soxhlet, extração a baixa pressão com álcoois,

maceração, extração supercrítica e extração assistida com micro-ondas (SANAGI et al., 1993, BRAGA et al., 2003; MANDAL et al., 2008).

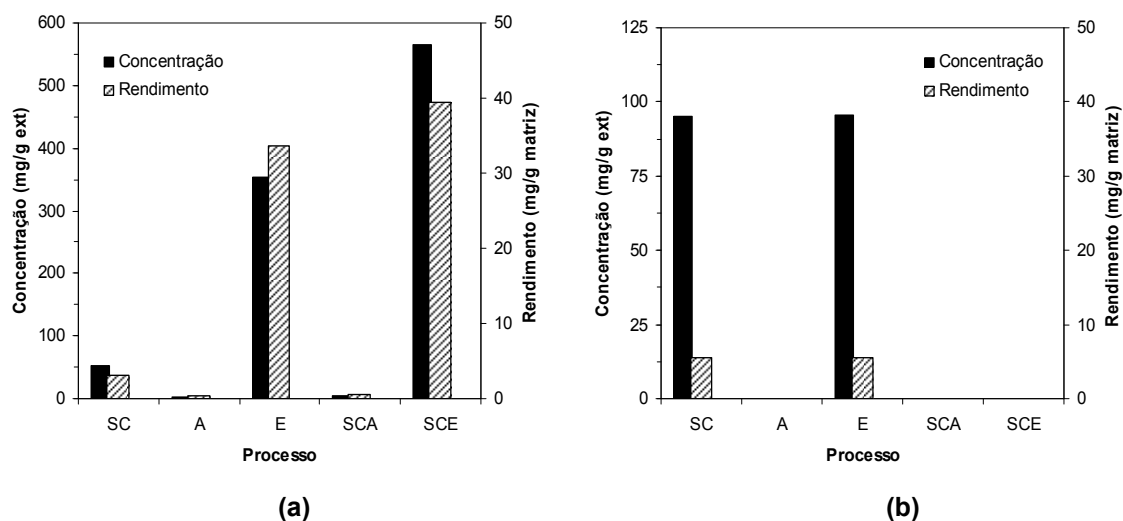


Figura 4.14 - Concentração e rendimento de extração. (a) curcumina, (b) Artemisinina. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

Quanto à artemisinina nos extratos de *A. annua* só foi detectada e quantificada nos extratos SC e E, em concentrações de 95,1 e 95,6 mg/g, respectivamente. Os rendimentos de extração para os dois casos foram equivalentes, com valores de 5,47 e 5,49 mg/g folha (Figura 4.14). Estes valores de rendimentos foram menores quando comparados com o valor de 11,36 mg/g folha reportados em estudos previos por Tzeng et al. (2007) em extração com scCO₂ (313 bar, 40 °C e 16,25 % de etanol como cosolvente); o resultando foi mais proximo do valor de 7 mg/g de folha reportado por Quispe-Condori et al. (2005) obtidos a 300 bar, 50 °C e de Kohler et al. (1997) a 150 bar, 40 °C e 3% metanol como co-solvente. Quanto à extração etanólica (E) valores de rendimentos relatados reportados por Tzeng et al. (2007) foram de 3 a 8 mg/g. Observa-se que em uma segunda etapa, tanto com etanol quanto com água não

se extrai mais nada de artemisinina, mostrando que a extração foi completa, tanto para etanol quanto para extração supercrítica em uma única etapa. A água empregada como solvente não extraiu nada de artemisinina, confirmando-se a baixa solubilidade da artemisinina em água (LAPKIN et al., 2006).

Apesar dos extratos etanólicos em uma etapa e supercríticos serem equivalentes quanto à extração e rendimento de extração de artemisinina, a extração prévia com scCO_2 pode ter vantagem considerando dois aspectos: 1) o extrato supercrítico não necessita de uma segunda etapa de separação, pois quando o CO_2 é despressurizado, separa-se facilmente do extrato e não necessita de uma segunda etapa de separação, que é o caso da extração etanólica que necessita de uma posterior separação do etanol por evaporação; 2) o resíduo proveniente da extração supercrítica pode ser submetido à extração aquosa (com 20% de rendimento global) ou etanólica (com 5% de rendimento global) e produzir novos extratos que mesmo não contendo artemisinina, contém compostos fenólicos da ordem de 50 a 100 mg/g.

4.5.6 Caracterização da fração rica em compostos voláteis (cromatografia gasosa)

Foi recuperada a fração volátil do extrato supercrítico para as amostras da *C. longa*. O rendimento da fração volátil (baseado na quantidade de matriz empregada) foi de $0,8 \pm 0,3$ %.

A Tabela 4.4 apresenta o resultado da análise GC-EM, a qual permitiu identificar compostos majoritários, os sesquiterpenos: turmerona, ar-turmerona e β -turmerona (curlona) com 31,27 %, 27,83 % e 21,47 %, respectivamente. Gopalan et al. (2000) relataram concentrações de 42 % e 16,12 % para ar-turmerona e turmerona em extratos obtidos com scCO_2 a 40 °C e 300 bar. Chassagnez-Mendez et al. (2000) relataram o conteúdo de ar-turmerona de 15,5 % de em extratos obtidos com scCO_2 + etanol a 250 bar e 45 °C. Kao et al. (2007) relatam o conteúdo total de α , β , e ar-turmerona do ordem de 67 % a 40 °C e 260

bar. A Ar-turmerona é considerada como um agente anti-hemorrágico atuando como inibidor enzimático de enzimas presentes no veneno de *Bothrops jararaca* (Ferreira et al., 1992, Melo et al., 2005). Tripathi et al. (2002) relataram uso de β -turmerona como repelente e inseticida. Potenciais aplicações em formulações de agroquímicos e agentes anticépticos resultam possíveis a partir das suas propriedades repelentes e inseticida (HEREBIAN et al., 2009).

Tabela 4. 4 - Caracterização química fração volátil de *C. longa* L.

Pico	Composto	tr (min)	IR ^a	IR ^b	Obs	% Relativa
1	cineol	7,88	1030	1031	EM	1,36
2	*	8,50	1049	-	-	0,95
3	α - curmeno	25,84	1482	1480	EM	1,79
4	α - zingibereno	26,34	1495	1493	EM	1,56
5	β -sesquifelandreno	27,45	1523	1522	EM	1,90
6	-	29,59	1579			0,94
7	-	30,52	1604			1,42
8	-	31,64	1634			1,19
9	Ar-turmerona	32,87	1668	1669	EM	27,83
10	turmerona	33,01	1672		NIST-EM	31,27
11	β -turmerona	34,14	1703		NIST-EM	21,47
12	-	35,64	1746			0,86
13	-	35,97	1755			1,76
14	-	36,25	1763			1,22
15	-	36,39	1767			1,57
16	-	36,63	1774			1,22
17	-	37,88	1810			1,64

^a calculado, ^b reportado por Adams (1995), **tr**: tempo de retenção, **IR**: índice de retenção, **Obs**: tipo de identificação por comparação com espectro de massa obtidos por Adams (**EM**), ou base de dados de NIST (**NIST-EM**), - não identificado * contaminante.

Foi recuperada a fração volátil ao longo da extração supercrítica do extrato supercrítico para *A. annua*. O rendimento da fração volátil (base seca) foi $0,08 \pm 0,06$ % (b.s.). Gupta et al. (2002) reportaram rendimentos de 0,2% da fração volátil a partir das folhas da *A. annua*, entretanto Goel et al. (2008) obtiveram valores de 0,4% e 0,7% para duas amostras de *A. annua*. Os dois estudos empregaram o método de hidrodestilação. A análise de GC-EM permitiu identificar a amostra, que excetuando impurezas retidas no Porapak-Q, apresenta como

composto majoritário o cânfora (35,42 %), este resultado concorda com o encontrado por Goel et al. (2006) para óleo essencial obtido de folhas de *A. annua* (Tabela 4.5).

Tabela 4. 5 - caracterização química fração volátil de *A. annua*.

Pico	Composto	tr (min)	IR ^a	IR ^b	Obs	% Relativa
1	-	7,67	1024			0,93
2	eucaliptol	7,88	1030	1031	EM	3,02
3	*	8,49	1048			31,64
4	*	8,70	1054			16,50
5	*	8,90	1060			3,16
6	cânfora	11,99	1144	1146	EM	35,42
7	cariofileno	23,23	1417	1416	EM	4,91
8	gemacreno D	25,72	1479	1485	EM	4,42

^a calculado, ^b reportado por Adams (1995), **tr**: tempo de retenção, **IR**: índice de retenção, **Obs**: tipo de identificação por comparação com espectro de massa obtidos por Adams (**EM**), ou base de dados de NIST (**NIST-EM**), - não identificado * contaminante.

4.5.7 Atividade antioxidante

Método do DPPH

A capacidade de sequestro do radical DPPH expresso como atividade antioxidante (AA %) dos extratos da *C. longa*, foi analisada na faixa de concentrações entre 0–250 µg/mL (Figura 4.15). Nos extratos SCE e E, a AA aumenta com o acréscimo da concentração entre 0 e 125 µg/mL com clara tendência não linear; no caso do extrato SC a AA aumenta continuamente para toda a faixa estudada, no entanto a AA nos extratos A e SCA apresentou pouca variabilidade dentro da faixa de concentrações estudada, sem diferenças significativas ($p < 0,05$).

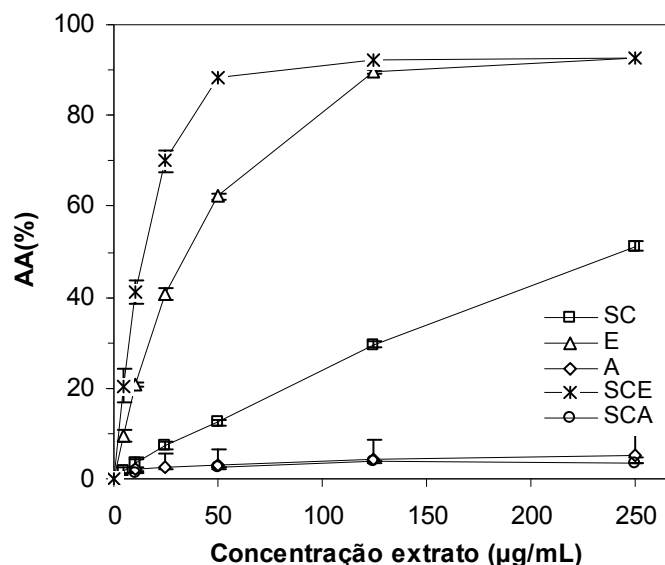


Figura 4.15 - Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos de *C. longa* L. Valores expresos como média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

A partir dos resultados de atividade antioxidante foram calculados os valores de CE_{50} por meio de diferentes tipos de regressão (Seção 3.4.4.5). Na Tabela 4.6, estão apresentados os resultados, onde pode ser observado que o valor de CE_{50} obtidos em cada caso está fortemente ligado ao tipo de modelo empregado (linear, exponencial, logístico) e à natureza do extrato (aquoso, etanólico, supercrítico).

Os extratos SC, A e SCA apresentam resposta linear de AA coma concetração. Comportamento diferente apresentam os extratos etanólicos (E, SCE), nos quais, os dados experimentais apresentam claramente uma tendência não linear (Figura 4.15), em decorrência disto foi comprovado que o modelo linear FC não descreveu o comportamento experimental de forma adequada sendo ajustado adequadamente com os modelos não lineares (Exp, Exp FA, L3P e L4P).

Tabela 4. 6 - Valores do CE_{50} para os extratos de *C. longa* L. para os diferentes modelos de regressão.

MÉTODO	SC		A		E		SCE		SCA	
	CE_{50} (µg/mL)	ajuste [*]	CE_{50} (µg/mL)	ajuste [*]	CE_{50} (µg/mL)	ajuste [*]	CE_{50} (µg/mL)	ajuste [*]	CE_{50} (µg/mL)	ajuste [*]
Linear FL	239 ± 8 ^a	0.9945 (1.294)	2993 ± 244 ^a	0.7339 (0.855)	37,2 ± 0,3 ^a	0.9674 (4.038)	16,3 ± 0,9 ^a	0.957 (5.110)	3725 ± 1370 ^a	0.807 (0.649)
Linear FC	239 ± 8 ^a	0.9945 (1.294)	2993 ± 244 ^a	0.7339 (0.855)	80,4 ± 0,8 ^b	0.741 (17.662)	35 ± 4 ^b	0.5294 (23.886)	3725 ± 1370 ^a	0.807 (0.649)
Exp	243 ± 9 ^a	0.9992 (0.478)	-	0.9951 (0.569)	33,5 ± 0,4 ^c	0.9995 (1.045)	14 ± 1 ^a	0.9995 (1.013)	-	0.9444 (0.485)
Exp FA	243 ± 10 ^a	0.9996 (0.367)	-	0.9010 (0.476)	33,6 ± 0,4 ^{cd}	0.9991 (1.034)	14 ± 1 ^a	0.9992 (0.961)	-	0.9207 (0.416)
L3P	248 ± 42 ^a	0.9957 (0.508)	-	na	36,7 ± 0,3 ^a	0.9995 (2.051)	15 ± 1 ^a	0.9990 (1.542)	-	na
L4P	502 ± 33 ^b	0.9956 (0.36)	-	0.9547 (0.327)	32,3 ± 0,4 ^e	0.9968 (1.962)	13 ± 1 ^a	0.9886 (1.315)	-	0,9743 (1,590)

Valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, na mesma coluna letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

^{*} Coeficiente de determinação, r^2 ; raiz quadrada do erro médio RSME (entre parêntese), na: não ajusta

Os valores finais de CE_{50} são apresentados na Figura 4.16. Assim os resultados foram de $>200 \mu\text{g/mL}$, $>200 \mu\text{g/mL}$, $33,6 \pm 0,4$, 14 ± 1 e $>200 \mu\text{g/mL}$, para os extratos SC, A, E, SCE, SCA, respectivamente. Indicando que os extratos que envolvem etanol como solvente (E, SCE) possuem alta atividade antioxidante ($CE_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$). Destacando-se o extrato posterior à extração supercrítica (SCE), que além de ser mais concentrado em curcumina possui alta atividade antioxidante com CE_{50} de $14 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, equiparável ao do ácido ascórbico (CE_{50} $10,9 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, como apresentado na Tabela 3.9) e maior atividade que o extrato etanólico proveniente de uma extração convencional, que apresenta CE_{50} de $33,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$.

Os extratos supercríticos e aquosos (SC, A, SCA) não apresentaram atividade sequestrante do radical DPPH, apresentando se como inativos ($CE_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$).

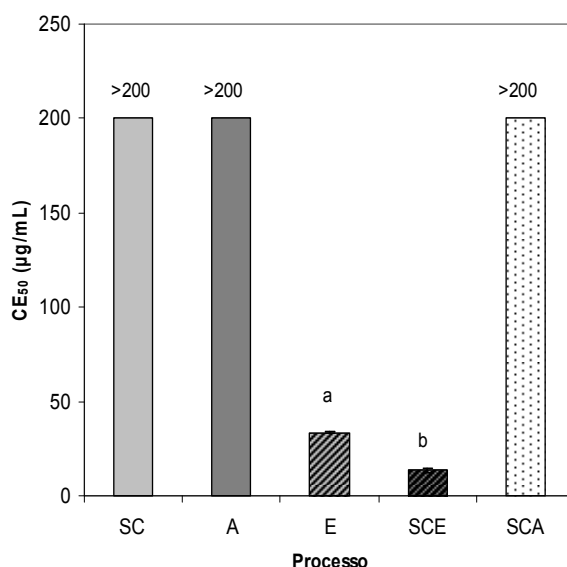


Figura 4.16 - Atividade antioxidante de extratos de *C. longa* L. (valores de CE_{50}). As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

O efeito da extração prévia com scCO₂ foi positivo, pois aumentou a atividade antioxidante, o valor de CE₅₀ mudou de 34 para 14 µg/mL nos extratos E e SCE respectivamente, o qual indicaria que a extração supercrítica estaria atuando na remoção de substâncias apolares de baixa atividade antioxidante (CE₅₀ > 200 µg/mL para o extrato SC), extraíndo-as da matriz vegetal, e portanto, concentrando o resíduo da extração supercrítica em substâncias de caráter polar com alta atividade antioxidante. Pothitirat (2006) relatou valores de CE₅₀ 18,2 ± 0,9 – 26,4 ± 0,4 µg/mL em extratos etanólicos da *C. longa* L (concentração de DPPH 152 µM). Ramos et al. (2003) relataram valores de CE₅₀ de 47 µg/mL em extratos hidroalcoólicos.

Foi encontrada correlação fraca entre o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante (CE₅₀) nos extratos de *C. longa* ($r^2 = 0,45$), o qual pode ser devido à complexidade dos extratos obtidos, em termos de estruturas químicas dos compostos presentes e com eles possíveis efeitos sinérgicos (KELEN e TEPE, 2007; WU et al., 2009). Diversos estudos têm apontado que a atividade antioxidante depende da localização e número de grupos hidroxila na estrutura dos compostos fenólicos nos extratos (KOLEVA et al., 2000; BURDA e OLESZEK et al., 2001; SILVA et al., 2002; KHANDUJA e BHARDWAJ, 2003; EKLUND et al., 2005; VILLANO et al., 2007; POUVREAU et al., 2008).

Método de descoloração do β-caroteno (Método DBC)

Nas Figuras 4.17 e 4.18 estão apresentados os resultados do teste DBC, para cada extrato durante 180 min, como diferença de absorbância (delta abs) calculada a partir da subtração da absorbância entre o controle e a mostra correspondente. Os extratos E e SCE apresentaram alta capacidade de inibição da oxidação quando comparados com os padrões comerciais (quercitina, BHT), mas os extratos aquosos (A, SCA) e supercrítico (SC) apresentaram baixos valores, e portanto, baixa atividade antioxidante.

Quando as respostas de atividade antioxidante pelos dois testes (DPPH e DBC) são comparadas, observa-se algumas respostas coincidentes. Os extratos

etanólicos (E, SCE) apresentam alta capacidade de sequestro do radical DPPH e alta capacidade de inibição do radical peroxila (teste do DBC) por meio da propriedade doadora de átomo de hidrogênio. Entretanto, observou-se o oposto com os extratos A, SCA e SC, os quais apresentam baixa atividade com o teste do DPPH. Isso é possivelmente pelas características estruturais dos compostos presentes em suas composições, ou à ausência de compostos com grupos doadores de elétrons ou finalmente a fatores cinéticos que produziram uma fraca resposta no teste DPPH (KOLEVA et al., 2003).

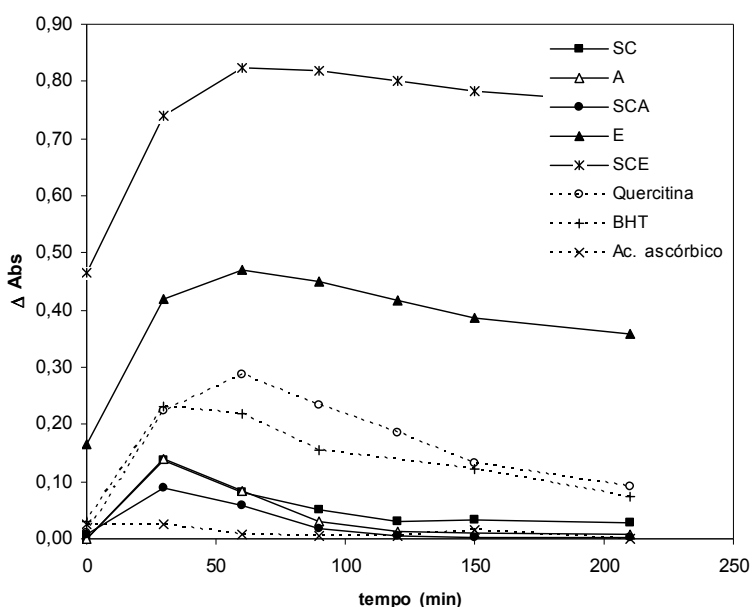


Figura 4.17 - Atividade antioxidante de extratos de *C. longa* L. pelo método DBC. Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

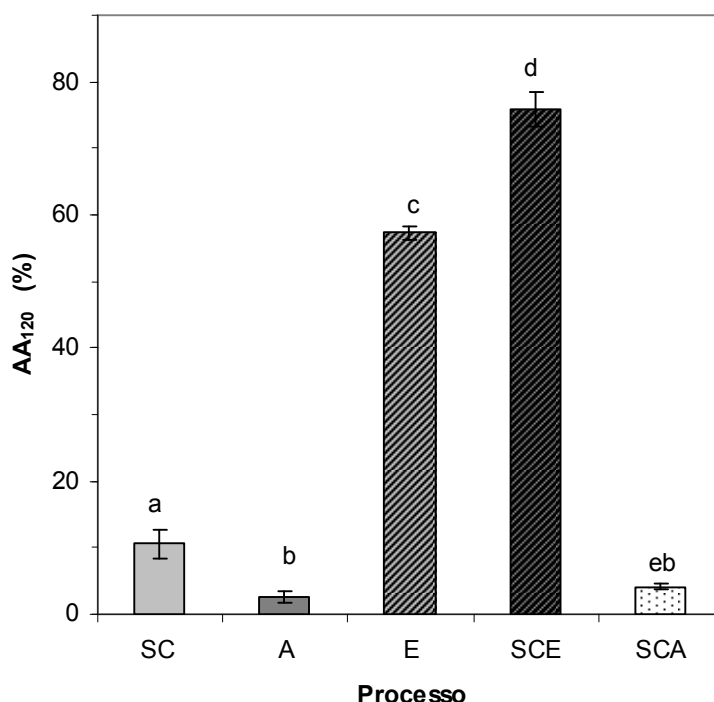


Figura 4.18 - Atividade antioxidante método DBC (AA₁₂₀) em extratos de *C. longa*. As barras representam valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Supercrítico (SC), etanólico (E), aquoso (A), etanólico prévia extração supercrítica (SCE), aquoso prévia extração supercrítica (SCA).

4.5.8 Atividade Antimalárica

O teste de citotoxicidade na faixa de concentrações usados no teste *in vitro* (1600, 400, 100 e 25 $\mu\text{g/mL}$) mostrou que não houve a ocorrência de hemólise. Os resultados para o teste antimalárico *in vitro* de extratos de *B. pilosa* contra *P. falciparum* apresentaram diferentes respostas, dependendo do processo e do solvente empregado. A porcentagem de redução de parasitemia é apresentada na Figura 4.19 para diferentes concentrações dos extratos. Estes resultados evidenciam que todos os extratos apresentam atividade antimalárica com %Inibição $\geq 50\%$ para concentrações entre 400 e 1600 $\mu\text{g/mL}$. O extrato SCE maior atividade inibitória, sendo que concentrações pouco maiores a 125 $\mu\text{g/mL}$ são necessárias para atingir %Inibição $\geq 50\%$.

Tabela 4. 7 - Comparação da atividade antimalárica em extratos de *B. pilosa*.

	Extrato				
	SC	A	E	SCE	SCA
IC ₅₀ ^a (µg/mL)	416,01	366,15	348,52	126,3	393,46

^a IC₅₀, concentração do extrato que inibe o 50% do crescimento do parasita

O parâmetro do IC₅₀ representa a concentração do extrato que inibe 50% do crescimento do parasita (quando comparado com controle). Este parâmetro é um indicativo da atividade antiplasmódica: quanto menor, melhor é a atividade antimalárica do correspondente extrato. Assim, dentre os processos em etapa única, os valores da IC₅₀ estiveram entre 348,52 e 416,01 µg/mL (Tabela 4.7). No entanto, processos em duas etapas, os valores foram 126,3 e 393,46 µg/mL para SCE e SCA, respectivamente. Estes resultados sugerem que a extração prévia com scCO₂ melhora a atividade antiplasmódica quando empregado etanol como solvente na segunda etapa de extração (extrato SCE), pois o valor de IC₅₀ para o extrato SCE é 2,75 vezes menor do que para o extrato E. Pode se observar que os extratos etanólicos (E, SCE) foram mais ativos do que os extratos aquosos (A, SCA). Alta atividade antiplasmódica em extratos hidroalcoólicos de *B. pilosa* foi relatada por Brandão e al. (1997); nestes estudos, a atividade foi relacionada a presença de fenilacetileno (1-fenil-1,3-diin-5-en-7ol-acetato) em suas composições. Oliveira et al. (2004) relacionam a ação protetora à oxidação de compostos de acetileno por parte dos flavonóides presentes nos extratos. Andrade-Neto et al. (2004) relataram valor para IC₅₀ entre 10 e 50 µg/mL, com variações dependendo da condições agrotecnológicas do cultivo.

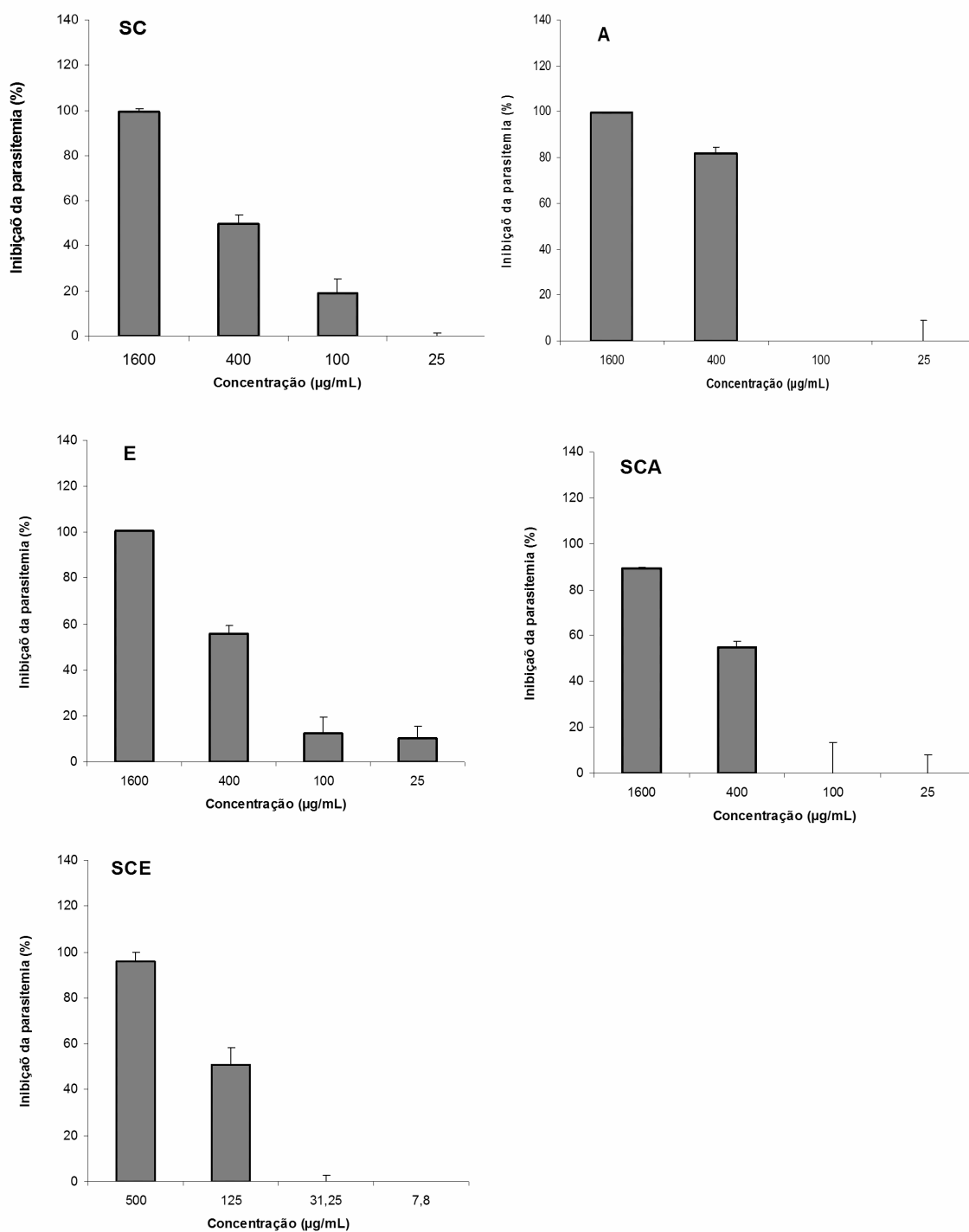


Figura 4.19 - Atividade antiplasmódica *in vitro* de extratos de *B. pilosa*. Resultados expressos como média dos ensaios em quadruplicata $\pm$ DP.

4.6. CONCLUSÕES

Este estudo mostra que a influência da extração supercrítica como primeira etapa é diferente dependendo da matriz vegetal estudada e o solvente empregado na segunda etapa, pois extratos com diferentes características são obtidos.

A utilização de etanol tanto em processos de etapa única quanto em duas etapas, favoreceu a extração de flavonóides e fenóis totais em *C. longa* e *B. pilosa*. No caso da *A. annua*, extrações aquosas favoreceram a obtenção de extratos ricos em fenóis totais, enquanto que as etanólicas favoreceram a extração de flavonóides.

A extração de substâncias específicas como curcumina foi estudada, encontrandó-se influência positiva da extração prévia com CO₂ supercrítico, pois o processo em duas etapas envolvendo CO₂ supercrítico-etanol apresentou o maior rendimento dos processo estudados (56,4%). Quanto à artemisinina, fatores como polaridade e solubilidade influenciaram na sua extratabilidade, pois ela foi extraída preferencialmente por scCO₂ e por tanto não necessitando de uma segunda etapa de separação.

Quanto à atividade antioxidante em extratos de *C. longa* L., os extratos obtidos com etanol, tanto em uma quanto em duas etapas se apresentaram com atividade maior em relação às extrações aquosas.

4.7. REFERÊNCIAS

- ABAJO, CA, BOFFILL, M.A., DEL CAMPO, J., MÉNDEZ, M.A., GONZÁLEZ, Y., MITJANS, M., VINARDELL, M.P. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v 93, n. 2-3, p.319-323, 2004.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. *Allued Publ. Corp.*, Carol Stream, IL, 469 pp, 1995.
- AGBEDAHUNSI, J. M., ELUJOBA, A. A., MAKINDE, J. M. AND ODUDA, A. M. J. Antimalária I activity of *Khaya grandifoliola* stem bark. **Pharmaceutical Biology**, v.36, p.8–12, 1998.

- ANDRADE-NETO VF, BRANDÃO MG, OLIVEIRA FQ, CASALI VW, NJAINE B, ZALIS MG, OLIVEIRA LA, KRETTLI AU. Antimalária I activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytother Research**, v. 18, p. 634-639, 2004.
- ARAÚJO, C.; LEON, LL.; Biological Activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n.5, p.723-728, 2001.
- ASAE Standards. Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. **ASAE**, S319.3, 547, 1997.
- AZEVEDO DE A. B. A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R. S., VIEIRA DE MELO, S. A. B., KIECKBUSCH T. G. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 25, n.3, p.543-522, 2008
- BALBI-PEÑA, M., I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.,R.; FRANZENER, G.; LOPES, M., C.; SCHWAN-ESTRADA, K., R.,F. Controle de alternaria solani em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina - I. Avaliação in vitro. **Fitopatol. Bras.** v.31, n.3, 2006
- BARLINT, G. Artemisinin and its derivatives, an important new class of antimalária I agents. **Pharmacology and therapeutics**, 90, 261-265, 2001
- BEGAN , B., GOTO, M., KODAMA, A., HIROSE, T. Response surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. **Food Research International**. v.33, p. 341-345, 2000.
- BENNER, B.A. Summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples, **Analytical Chemistry**. v.70, n.21, p. 4594–4601, 1998.
- BENOIT-VICAL, F., VALENTIN, A., CAURNAE, V., PELISSIER, Y., MALLIE, M. AND BASTIDE, J. M., *In vitro* antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (*Rubiaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, 61, p.173–178, 1998.
- BOUDREAU, B.P. The diffusive tortuosity of fine-grained unlithified sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.60, p.3139–3142, 1996.
- BRAGA, M.E. M., LEAL, P. F., CARVALHO, J., MEIRELES M. A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.51, p. 6604-6611, 2003.
- BRAGA, M.E. M., MEIRELES M. A. Accelerated solvent extraction and fractionated extraction to obtain the *Curcuma longa* volatile oil and oleoresin. **Journal of Food Process Engineering**. v.30, p. 501-521, 2007.
- BRANDÃO, M. G. L., KRETTLI, A.U., SOARES, L. S. R., NERY, C. G. C., MARINUZZI, H. C. **Journal of Ethnopharmacology**. v.57, p.131-138, 1997.
- BRANDÃO, M.G.L., NERY, C.G.C., MAMÃO, M.A.S., KRETTLI, A.U. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v. 48, p.397–399, 1998.

- BRUTTEL, P., SCHILINK, R. **Water determination by Karl Fischer titration**. Metrohm Monograph 8.026.50003, Suíça, 2003.
- BURDA, S., OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.2774-2779, 2001
- CAMPBELL, W. E., GAMMON, D. W., SMITH, P., ABRAHAMS, M. AND PURVES T. D., Composition and antimalária I activity *in vitro* of the essential oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Medica**, v.63, p.270-272, 1997.
- CHANG, L. H., JONG, T. T., HUANG, H. S., NIEN, Y. F., . CHANG, C. M. J. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn and purification of turmerones. **Separation and Purification Technology**, v. 47, p. 119-125, 2006.
- CHANG , S.L, CHIANG, Y.M., CHANG, C.L.T, YEH, H.H., SHYUR, L.F., KUO, Y.H., WU, T.K., YANG ,W.C. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN- γ expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, 13 , p.232-236 , 2007.
- CHASSAGNEZ-MENDEZ, A. L., MACHADO, N.T., ARAUJO, M.E., MAIA J. G., MEIRELES, M. A. Supercritical CO₂ extraction of curcumins and essential oil from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.39, p.4729-4733, 2000.
- CHIANG, Y.M., CHUANG, D.Y.,, WANG, S.Y., KUO, Y.H., TSAI, P.W., SHYUR, L.F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa* . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 409-419, 2004.
- DEBA, F., XUAN, T.D., YASUDA, M., TAWATA, S.. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata* **Food Control**, v. 19, n. 4, p.346-352, 2008.
- DELLA PORTA G., REVERCHON, E., BENAKIS. A. Extraction and fractionation of antimalaric drugs by supercritical fluids. Em: Proceedings of 7th Italian Conference on Supercritical Fluids and Their Applications 9th Meeting on Supercritical Fluids. Trieste, Italia, 13-16 Junio, 2004.
- DEL VALLE, J. M., J. C. DE LA FUENTE. Y A. C. DAMIAN, Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America, **Journal of Food Engineering**, v.67, p.35-57, 2005.
- DIMO, T., AZAY, J., TAN, P.V., PELLECUER, J., CROS, G., BOPELET, M., SERRANO, J.J. Effects of the aqueous and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* leaf on fructose-hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology** , v.76, p.215-221, 2001.
- EKLUND, P.C., LÅNGVIK, O.K., WÄRNÄ, J.P., SALMI, T.O., WILLFÖR, S. M., SJÖHOLM, R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Org. Biomol. Chem.**, n.3, p.3336 - 3347, 2005.
- FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; DE MORAES, V. L. G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma Longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**, v.30, p.1211-1218, 1992.

- GARAVITO, G.; RINCON, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZON, R.; DEHARO, E. Antimalária I activity of some Colombian medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.460-462, 2006.
- GLISIC, S. SMELCEROVIC, A., ZUEHLKE, S., SPITELLER, M., SKALA, D. Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.45, n.3, p.332-337, 2008.
- GOEL D, SINGH V, ALI M, MALLAVARAPU GR, KUMAR S. Essential oils of petal, leaf and stem of the antimalarial plant *Artemisia Annua*. **Journal Of Natural Medicines**, v. 61, p.187–191, 2006.
- GOEL, D., MALLAVARUPU, G. R., KUMAR, S. Volatile Metabolite Compositions of the Essential Oil from Aerial Parts of Ornamental and Artemisinin Rich Cultivars of *Artemisia annua*. **Journal of Essential Oil Research**, v.. 20, p.147-152, 2008
- GOPALAN, G., GOTO, M., KODAMA, A., HIROSE, T. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric (*Curcuma longa*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.48, p.2189-2192, 2000.
- GRIGONIS, D., VENSKUTONIS, P.R., SIVIK, B., SANDAHL, M., ESKILSSON, C.S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.33, n.3, p. 223-233, 2005.
- GUPTA, S.K., SINGH, R, BAIPAI, R, RAM, G., SINGH, D., GUPTA, M.M., JAIN, D.C., KHANUJA S., KUMAR S. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, 16, 217-224, 2002.
- HEREBIAN, D., CHOI, J-H., ABD EL-ATY, A.M., SHIM, J. H., SPITELLER, M. Metabolite analysis in curcuma domestica using various gc-ms and lc-ms separation and detection techniques. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n.9, p.951 – 965, 2009.
- ISENGARD, H.-D. Water content, one of the most important properties of food. **Food Control**, v. 12, n.7, p.395-400., 2001.
- JORNAL DA UNICAMP, Planta contra a malária, **Jornal da Unicamp**, 30 junho- 3 agosto, p.3, 2002
- KAO, L., CHEN, C.R., CHANG, C.M. Supercritical CO₂ extraction of turmerones from turmeric and high-pressure phase equilibrium of co₂ + turmerones. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.43, n.2, p.276-282, 2007.
- KELEN, M., TEPE, Z. Screening of antioxidative properties and total phenolic compounds. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.3, p.403-408, 2007.
- KHAN, M.R., KIHARA, M., OMOLOSO, A.D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 662-665, 2001.
- KHANDUJA, K.L., BHARDWAJ, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.40, p.416-422, 2003.
- KHATTAK, S., REHMAN, S., SHAH, H. U., AHMAD, W., AHMAD, M. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galangal*. **Fitoterapia**, v.76, n., p. 254-257, 2005.

- KOHLER, M., HAERDI, W., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J.L., Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v.785, p.353-360, 1997.
- KOLEVA, I.I., NIEDERLÄNDER, H. A.G., VAN BEEK T.A. An on-line hplc method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. **Analytical Chemistry**, v.7, n.10, p.2323-2328, 2000.
- KOLEVA II, , LINSSEN JPH, VAN BEEK TA, EVSTATIEVA LN, KORTENSKA , LN., HANDJIEVA , N. Antioxidant activity screening of extracts from *sideritis species* (Labiatae) grown in Bulgaria . **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n.8, p.809-8, 2003.
- KVIECINSKI, M. R., FELIPE, K. B., SCHOENFELDER, T., DE LEMOS WIESE, L. P., ROSSI, M H., GONÇALEZ, E., FELICIO, J. D., WILHELM, D., PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117,1, 17, p.69-75, 2008.
- LANFREY, P.-Y., KUZELJEVIC, Z.V., DUDUKOVIC, M.P. Tortuosity model for fixed beds randomly packed with identical particles, **Chemical Engineering Science**, v.65, n.5, p.1891-1896, 2010.
- LAPKIN, A.A., PLUCINSKI, P.K., CUTLER, M . comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1653-1664, 2006.
- LERMEN, J.H., GAMARO, G.D., BORSOI, M., FRÖHLICH, S.C., ARDENGHI, P., SUYENAGA, E.S. Análise fitoquímica preliminar e investigação da atividade antiinflamatória de *bidens pilosa* L. in: Reunião anual de sociedades de biologia experimental, 2006. Disponível em: <<http://www.fesbe.org.br/fesbenovo/ver-resumo/>>. Acesso em: 18 ago. 2007.
- LOPES S. C. P. ; BLANCO y. C. ; JUSTO G. Z. ; NOGUEIRA P. A. ; RODRIGUES F. L. S. ; GOELNITZ U. ; WUNDERLICH G. ; FACCHINI G. ; BROCCHI M. ; DURAN N. ; COSTA F. T. M. Violacein extracted from chromobacterium violaceum inhibits plasmodium growth *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n.5, p. 2149-2152, 2009.
- MANDAL, V., MOHAN, Y., HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, n. 2, p. 322-327, 2008.
- MANZAN, A. C.,TONIOLO F. S., BREDOW, E., POVH N. P. Extraction of essential oil and pigments from *Curcuma longa* [L.] by steam distillation and extraction with volatile solvents. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, n.23, p.6802-6807, 2003.
- MELO, M.M., HABERMEHL, G.G., OLIVEIRA N.J.F., NASCIMENTO, E.F., SANTOS, M.M.B., LÚCIA, M.. Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinalis* extracts and ar-turmerone. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p.7-17, 2005.
- MILHAU, G., VALENTIN, A., BENOIT, F., MALLIE, M., BASTIDE, J. M., PELISSIER, Y. BESSIERE, J. M. *In vitro* antimalária activity of eight essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, 9, p.329–333, 1997.
- MIRA, B., BLASCO, M., SUBIRATS, S., BERNA, A. Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.9, n.4, p.238-243, 1996.

- NANDAKUMAR, D. N., NAGARAJ, V. A., VATHSALA, P. G., RANGARAJAN, P., PADMANABAN, G.. Curcumin-artemisinin combination therapy for malária. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, p. 1859-1860, 2006.
- NEGI, P. S. JAYAPRAKASHA G. K., L. Jagan Mohan Rao, Sakariah, K. K., Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 4297-4300, 1999.
- NORAJIT, K., LAOHAKUNJIT, N, KERDCHOECHUEN, O. Antibacterial effect of five zingiberaceae essential oils. **Molecules**, v.12, n.8, p. 2047-2060, 2007
- OLIVEIRA, F.Q., ANDRADE-NETO, V., KRETTLI, A.U., BRANDÃO, M.G.L. New evidences of antimalária I activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 39-42, 2004.
- PARK, H.; KIM, M.S.; JEON, B.H.; KIM, T.K.; KIM, Y.M.; AHNN, J.; KWON, D.; TAKAYA, Y.; WATAYA, Y.; KIM, H. Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea, **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p.1623-1624, 2003.
- PEREIRA, R.L.C., IBRAHIM, T., LUCCHETTI, L., DA SILVA, A.J.R., DE MORAES, V.L.G. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v.43, p.31-37, 1999.
- POTHITIRAT, W. **Standardization and antioxidant activity of curcuma longa rhizome extract**. 2006, 259p. Dissertação MSc Pharmaceutical chemistry and phytochemistry. Faculty of Graduated Studies, Mahidol.
- POUVREAU, J-B., MORANÇAS, M., TARAN, F, ROSA, P., DUFOSSÉ, L., GUÉRARD, F., S. PIN, FLEURENCE, J., PONDIVEN, P. Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *haslea ostrearia* (gaillon/bory) simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, p.6278-6286, 2008.
- QUISPE-CONDORI, S., SANCHEZ, D., FOGGIO, M. A., ROSA, P.T.V., ZETZL, C., BRUNNER, MEIRELES. M.A.M. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 36 p. 40-48, 2005.
- RABE, T., VAN STADEN. J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal Purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 81-87, 1997.
- RAMOS, A., VISOZO, A.; PILOTO, J., GARCIA, A., RODRIGUEZ, C. A., RIVERO, R., Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2-3, p.241-246, 2003.
- RAHMAN, N. N. N. A., FURUTA, T., KOJIMA, S., TABANE, K. ALI-MOHD, M. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. **Jounal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.249-254, 1999.
- REDDY, R.C, VATSALA, P. G, KESHAMOUNI, V. G, PADMANABAN G., RANGARAJAN P. N. Curcumin for malaria therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.326, n.2, p.472-4744. 2005.

- RODRIGUES, R. A.F., FOGLIO, M.A., BOAVENTURA, S., SANTOS, A., REHDER, V.L. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v.29, n.2, p.368-372, 2006.
- ROJAS, J. J. OCHOA, V. J. OCAMPO, S.A. MUÑOZ, J.F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2006, v.6, n.2. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/2>>. Acesso em 14 ago. 2007 .
- ROTH, N., CHANDRA, A., NAIR, M. G. Novel bioactivities of *curcuma longa* constituents. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.4, p. 542-545, 1998.
- SANAGI, M.M., AHMED, U.K., AND SMITH, R. M. Application of supercritical fluid extraction and chromatography to the analysis of turmeric. **Journal of Chromatographic Science**, v.31, n.1, p.20-25, 1993.
- SCHWIKKARD, S.; VAN HEERDEN, F. Antimalarial activity of plant metabolites. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 675–692, 2002.
- SHEN, L., CHEN, Z. Critical review of the impact of tortuosity on diffusion, **Chemical Engineering Science**, v.62, n.14, p.3748-3755, 2007.
- SILVA, M.M, SANTOS M. R, CAROÇO, G, ROCHA, R, JUSTINO G, MIRA L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free radical research**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.
- SOVOVÁ, H., SAJFRTOVA, M., BARTLOVA, M., OPLETAL, L. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.30, n.2, p.213-224, 2004.
- SU, S.L., WU, Q.N., OUYANG, Z., WU, D.K., AND CHEN, J. Study on the SFE condition for curcumin in *Curcuma longa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. **Abstract em Pubmed**. v.,29, n.9, p.857-60, 2004.
- SUPARTONO, W., RUCKOLD, S. ISENGARD, H.-D. Karl Fischer titration as an alternative method for determining the water content of cloves. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, n.4, p.402-405, 1998.
- TARANTO, A.G.,; DE MESQUITA CARNEIRO, J.; W.; DE ARAUJO, M., T.; Silva, B., M. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos Parte I. **Sitientibus**, Feira de Santana, n.34, p.47-58, jan./jun. 2006
- TAN, P.V., DIMO, T., DONGO, E. Effects of methanol, cyclohexane and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.3 p.415–421, 2000.
- TRIPATHI AK, PRAJAPATI V, VERMA N, BAHL JR, BANSAL RP, KHANUJA SP, KUMAR S . Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma Longa* (Var. Ch-66) on three species of stored-product beetles (coleoptera). **Journal of Economic Entomology**, v.95, p.183–189, 2002.
- TZENG, T.C., LIN, Y.L., JONG, T.T., CHANG, C.M. Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L. **Separation and Purification Technology**, v 56, p.18–24, 2007.

- UBILLAS, R. P. , MENDEZ, C. D., JOLAD, S. D., LUO, J., KING, S. R., CARLSON, T. J., FORT, D. M. Antihyperglycemic acetylinic glucosides from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 66, n.1,p.82-83. 2000
- VAN AGTMAEL, M.A, EGGELE, T.A., VAN BOXTEL, C.J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication, **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p. 199–205, 1999.
- VILLAÑO, D., FERNANDEZ-PACHÓN, M. S., TRONCOSO, A. M., GARCÍA-PARRILLA, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. **Analytica Chimica Acta**, v.538, n.1-2, p.391-398, 2005.
- VILLAÑO D., FERNANDEZ-PACHON M.S., MOYA M.L., TRONCOSO A.M., GARCIA-PARRILLA M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, **Talanta**, v.71, n.1, p. 230-235, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L.** 2006.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. Inglaterra, 1998, 123p.
- WOERDENBAG, H,J., PRAS,N. Analysis and quality control of commercial *Artemisia* species, 2002, in: *Artemisia*, Medicinal and aromatics plants- industrial profiles, v 18, p.60, London, 2002.
- WU, N., FU, K., FU, Y.J., ZU, Y.G., CHANG, F.R. CHEN Y.H. CHEN, Y. H., LIU, X. L., KONG, Y., LIU, W., GU, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Molecules**, v. 14, n.3, p.1032–1043., 2009.
- XIA,X., CHENG, G., PAN, Y., XIA, Z.H., L.D. KONG. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, n. 2, p.356-363, 2007
- YU, Y. **Comparison of bioactivities and composition of curcumin free Turmeric (*curcuma longa* L.) Oils from different sources**. Thesis (Master of Science), Clemson University, 2006.

**5 SOLUBILIDADE DE SISTEMAS ORIUNDOS DE EXTRATOS
NATURAIS EM $scCO_2$: MEDIDAS EXPERIMENTAIS E
MODELAGEM**

5.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da solubilidade em scCO_2 das substâncias de interesse que estão presentes na matriz a ser processada é de grande importância para o sucesso de processos que empregam a tecnologia supercrítica, pois influencia diretamente na escolha das condições operacionais do processo (COIMBRA et al., 2006). A solubilidade depende da natureza do soluto, do solvente e de suas interações, que podem ser transcritas nas suas polaridades, na densidade do solvente supercrítico e na pressão de vapor do soluto. Tendo em vista que nos sistemas de interesse deste trabalho que são basicamente constituídos de misturas de substâncias fenólicas, dados de equilíbrio de fases com scCO_2 são raros. Optou-se inicialmente em se adotar uma modelagem termodinâmica que fosse preditiva do equilíbrio, tal como o modelo GC-EOS. No entanto, a ferramenta usada para calcular equilíbrio de fases com este modelo era restrita ao equilíbrio líquido-vapor. Como a grande maioria dos compostos fenólicos de interesse são sólidos, optou-se em se adotar um sistema constituído de um soluto diferente daqueles presentes na composição dos extratos, para se poder verificar a capacidade deste modelo GC-EOS na predição de equilíbrio. Neste capítulo, aplicou-se a modelagem para dados experimentais de solubilidade de duas biomoléculas (artemisinina e esqualeno) em scCO_2 . Para a artemisinina, os valores experimentais de solubilidade analisados foram coletados da literatura. Para o esqualeno os valores de solubilidade foram medidos experimentalmente e analisados em conjunto com valores reportados na literatura. Na modelagem aplicou-se equações de estado cúbicas, equações por contribuição de grupos (GC-EOS) e os dados também foram correlacionados através de modelos empíricos.

5.2 SOLUBILIDADE EM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

O comportamento típico da solubilidade de um soluto puro em um solvente supercrítico (FS) está representado na Figura 5.1, na qual a solubilidade aumenta com o aumento da pressão a temperatura constante, produto das mudanças na densidade do solvente.

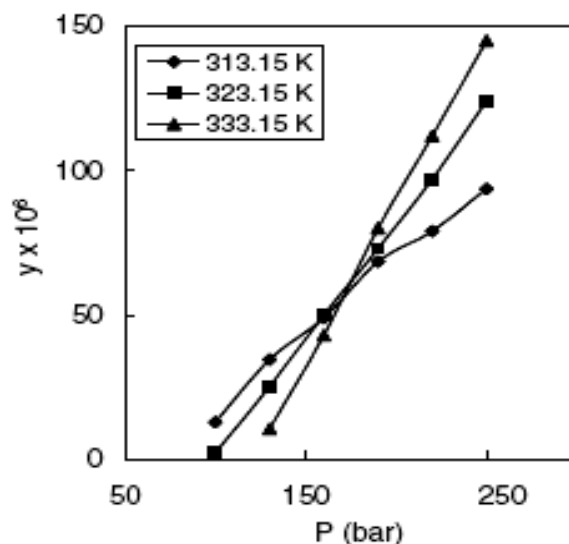


Figura 5. 1 - Solubilidade do colesterol em scCO₂ (YUN, et al. 1991).

A pressão na qual as isotermas de solubilidade se cruzam (*crossover point*), matematicamente representa um ponto de inflexão onde o valor da solubilidade é independente da temperatura. O conhecimento deste ponto é de grande utilidade na separação de compostos onde existem pequenas diferenças de seletividade, como os isômeros (SHI, 2007).

Modelagem termodinâmica

O conhecimento do equilíbrio de fases em condições supercríticas envolvendo compostos bioativos pode ser baseado em determinações experimentais e em modelos robustos que possam correlacionar as informações experimentais disponíveis e com isso prever (extrapolar) valores em condições diferentes daquelas disponíveis. A disponibilidade de dados de equilíbrio de fases juntamente com uma modelagem termodinâmica são importantes subsídios que auxiliam na otimização de processos de extração de compostos oriundos de fontes naturais. Neste sentido, Hartono et al. (2001) afirmaram que a maior dificuldade no emprego da tecnologia supercrítica para extração de compostos bioativos é na medição do equilíbrio de fases em diversas condições de pressão e temperatura, visando a otimização do processo; neste caso é muito útil o emprego de modelos preditivos do equilíbrio.

Independente do modelo termodinâmico empregado, a previsão da solubilidade é baseada no equilíbrio termodinâmico das fases envolvidas, no qual existe como condição necessária a igualdade de temperatura (T), de pressão (P) e de fugacidade das i espécies (critério de isofugacidade) em todas as fases (Equação 5.1), assim:

$$f_i^I = f_i^{II} \quad (5.1)$$

5.3 EQUAÇÕES CÚBICAS DE ESTADO

No equilíbrio termodinâmico, uma equação de estado (EOS) representa uma expressão matemática que inter-relaciona a pressão, a temperatura e o volume molar para uma substância. EOS podem ser empregadas para a representação das propriedades PVT do equilíbrio entre as fases vapor, líquida e supercrítica. As EOS necessitam do conhecimento de três parâmetros da substância pura: temperatura crítica (T_c), pressão crítica (P_c), e fator acêntrico (ω).

As principais EOS cúbicas são derivadas da equação de estado de van der Waals (EOS do tipo van der Waals), a qual foi a primeira equação de estado capaz de representar a coexistência das fases líquida e vapor. Estas levam em conta as forças de interação entre as moléculas, as quais geralmente são compostas por dois termos: um termo repulsivo (esfera rígida) e um termo atrativo, como segue (Equação 5.2):

$$P = P_{repulsivo} + P_{atrativo} \quad (5.2)$$

Assim, a EOS de van der Waals é representada como decrito na equação (5.3):

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a}{V^2} \quad (5.3)$$

Nesta equação, V representa o volume molar, P a pressão, T a temperatura, R a constante universal dos gases, a e b são constantes positivas e representam as forças de interação atrativas e a diferença do tamanho entre as espécies, respectivamente. A maioria das EOS do tipo van der Waals possuem o mesmo termo repulsivo original apresentado por van der Waals, e mudam o termo atrativo, como também as expressões matemáticas para o cálculo dos parâmetros a e b .

A equação de Peng Robinson (PR) (1976) é uma equação de estado cúbica do tipo van der Waals; a expressão da equação PR é apresentada pelas Equações (5.4 a 5.7):

$$P = \frac{RT}{V-b} - \frac{a \alpha(T)}{V^2(V+b)+b(V-b)} \quad (5.4)$$

onde:

$$a(T) = 0,45724 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \alpha(T_R) \quad (5.5)$$

$$b = 0,07780 \frac{RT_c}{P_c} \quad (5.6)$$

$$\alpha(T_R) = \left[1 + (0,37464 + 1,5422\omega - 0,2699\omega^2)(1 - T_R^{0.5}) \right]^2 \quad (5.7)$$

onde T_C é a temperatura crítica, T_R é a temperatura reduzida ($T_R = T/T_C$) e ω é o fator acêntrico.

Para que esta EOS possam ser extendidas às misturas, uma regra de mistura deve ser aplicada aos parâmetros dos componentes puros para se obter os parâmetros a_m e b_m da mistura. Assim, a Equação (5.4) aplicada a misturas transforma-se em (Equação 5.8):

$$P = \frac{RT}{V - b_m} - \frac{a_m \alpha(T)}{V^2 (V + b_m) + b_m (V - b_m)} \quad (5.8)$$

Os parâmetros a_m e b_m são calculados através de uma regra de mistura, usando os parâmetros a e b e a composição dos componentes. Estas regras incluem parâmetros do componente puro e parâmetros de interação binária (parâmetros ajustáveis), os quais são uma medida dos desvios do comportamento. As Equações (5.9 a 5.11), apresentam a regra de mistura clássica:

$$a_m = \sum \sum x_i x_j a_{ij} \quad (5.9)$$

$$b_m = \sum x_i b_i \quad (5.10)$$

$$a_{ij} = \sqrt{a_i a_j} (1 - k_{ij}) \quad (5.11)$$

No caso de emprego de EOS cúbicas, o critério de isofugacidade a partir da Equação (5.1), pode ser resolvido em função dos coeficientes de fugacidade ($\hat{\phi}_i$) para cada substância (Equação 5.12):

$$y_i P \phi_i^V(T, P, y) = x_i P \phi_i^L(T, P, x) \quad (5.12)$$

Onde P é a pressão do sistema, T a temperatura, x e y , as frações molares em cada fase, e as letras em sobre-escrito V e L representam propriedades para fase líquida e vapor (supercrítica) respectivamente. Para as EOS cúbicas, os coeficientes de fugacidade na fase vapor e líquida podem ser calculados a partir das expressões termodinâmicas mostradas nas equações 5.13 e 5.14:

$$\ln \hat{\phi}_i^V(T, P, y) = \ln \frac{f_i^V(T, P, y)}{y_i P} = \frac{1}{RT} \int_{V=\infty}^{V=Z^V RT/P} \left[\frac{RT}{V} - N \left(\frac{\partial p}{\partial N_i} \right)_{T, V, N_{j \neq i}} \right] dV - \ln Z^V \quad (5.13)$$

$$\ln \hat{\phi}_i^L(T, P, x) = \ln \frac{f_i^L(T, P, x)}{x_i P} = \frac{1}{RT} \int_{V=\infty}^{V=Z^L RT/P} \left[\frac{RT}{V} - N \left(\frac{\partial p}{\partial N_i} \right)_{T, V, N_{j \neq i}} \right] dV - \ln Z^L \quad (5.14)$$

onde R é a constante universal dos gases, Z fator de compressibilidade.

Quando o sistema envolve uma fase contendo um sólido puro (2), pouco volátil, que possui uma pressão de vapor muito baixa (P_2^{sat}), o seu vapor pode ser considerado como um gás ideal e, assim o coeficiente de fugacidade para o vapor do sólido puro nesta pressão pode se aproximar a 1. Também a fase fluida (em sua maioria composta por fluido supercrítico) geralmente é muito pouco solúvel na fase sólida de tal forma que a fase sólida pode ser considerada como uma fase pura, e o volume do sólido puro (V_2^{sat}) é constante com a pressão (sólido incompressível). Assim, considerando a fase II como sólido puro e a fase I como a

fase correspondente ao fluido supercrítico, o valor da solubilidade do sólido puro (y_2) no fluido pode ser calculada iterativamente por meio da Equação (5.11), a seguir:

$$y_2 = \frac{P_2^{sat}(T) \exp\left[\frac{V_2^{sat}(P - P_2^{sat}(T))}{RT}\right]}{P\hat{\phi}_1^{FS}(T, P, y)} \quad (5.11)$$

O valor do coeficiente de fugacidade ($\hat{\phi}_1^{FS}$) pode ser calculado a partir de modelos termodinâmicos (por exemplo, empregando EOS que descrevam o comportamento do fluido supercrítico) ou aplicando princípio dos estados correspondentes.

5.4 MODELOS DE CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS (CG)

Estes tipos de modelos consideram as moléculas de uma substância como um conjunto de grupos funcionais e a mistura de substâncias diferentes, como um agrupamento dos seus grupos constitutivos. A grande vantagem deste enfoque é devido ao número reduzido de grupos, que possibilita descrever um grande número de compostos de interesse, e, portanto, muito útil na tarefa de prever o equilíbrio de fases a partir do conhecimento da estrutura molecular das substâncias presentes na mistura a estudar.

O enfoque de contribuição de grupos é aplicável tanto para equações de estado quanto para modelos de coeficientes de atividade, nesta última categoria destaca-se o modelo UNIFAC (FREDENSLUND et al., 1975) para predição do coeficiente de atividade na fase líquida por meio de contribuição de cada um dos grupos funcionais presentes na mistura, e sob o enfoque $\gamma - \phi$ permite o cálculo do equilíbrio de fases.

No modelo UNIFAC original, o equilíbrio de fases está limitado a pressões máximas entre 10 a 15 bar. Esta deficiência foi sanada com a combinação UNIFAC-EOS cúbicas ($EOS-G^E$) por meio de regras de mistura nas EOS de

Soave-Redlich-Kwong e Peng-Robinson, baseadas nos modelos de G^E . As regras de mistura mais conhecidas são: regras modificadas de Huron e Vidal, *MHV1* e *MHV2*, (DAHL et al., 1990), combinação linear das regras de mistura Vidal-Michelsen, *LCVM*, (BOUKOUVALAS et al., 1994), regra *WS* (WONG e SANDLER, 1992), regra preditiva Soave-Redlich-Kwong, *PSRK*, (HOLDERBAUM e GMEHLING, 1991).

A vantagem principal deste ponto de vista é obtida quando os parâmetros de interação do modelo de G^E estão disponíveis, e por meio do enfoque EOS- G^E é possível a predição do equilíbrio de fases a altas pressões a partir de dados de equilíbrio a baixas pressões.

Modelo GC EOS

A equação GC-EOS (*Group Contribution Equation of State*) proposta por Skjold-Jørgensen (1984, 1988) é derivada da combinação de 4 princípios: 1) equação de estado de van der Waals, 2) a expressão de Carnahan-Starling para a esfera rígida, 3) equação NRTL e 4) princípio de contribuição de grupos. Esta EOS não necessita de informações de dados de equilíbrio binário, só da composição dos grupos das moléculas envolvidas no equilíbrio, das propriedades críticas e fator acêntrico. CHAFER et al. (2004) assinalam que a grande vantagem do método de contribuição de grupos GC-EOS é sua capacidade preditiva e extrapolativa. O modelo é baseado na equação geral de partição de van der Waals e no conceito de contribuição de grupos, para prever o comportamento de misturas em equilíbrio para sistemas em uma ampla faixa de temperaturas e pressões. É muito útil quando não existem dados experimentais, sendo possível estimar tanto propriedades de substâncias puras quanto dados de equilíbrio para misturas (ESPINOSA et al., 2002a; SKJOLD-JØRGENSEN 1984, 1988).

No modelo, a energia livre de Helmholtz é o resultado do somatório do comportamento do gás ideal e do termo residual. Este último quantifica as forças intermoleculares pelo somatório dos dois termos: contribuição do volume livre

(termo repulsivo) e a contribuição devida às forças atrativas intermoleculares, nas equações (5.12) e (5.13) a seguir:

$$A = A_{gas\ ideal} + A_{residual} \quad (5.12)$$

$$A^R = A_{fv}^R + A_{att}^R \quad (5.13)$$

No modelo GC-EOS, o termo repulsivo depende dos parâmetros característicos das moléculas da mistura, enquanto que o termo atrativo emprega o número e as propriedades dos grupos funcionais das substâncias da mistura.

O termo de volume livre (A_{fv}^R , termo repulsivo) supõe um comportamento de esfera rígida para as moléculas, empregando uma expressão do tipo Carnahan-Starling de esfera rígida para misturas, mediante a expressão para contribuição do volume livre para a energia residual de Helmholtz, como seguem nas Equações (5.14) e (5.15):

$$(A / RT)^R_{fv} = 3(\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3)(Y - 1) + (\lambda_2^3 \lambda_3^2)(-Y + Y^2 - \ln Y) + n \ln Y \quad (5.14)$$

onde:

$$Y = \left(1 - \frac{\pi \lambda_3}{6V}\right)^{-1} \quad \text{e} \quad \lambda_k = \sum_j^{NC} n_j d_j^K \quad (5.15)$$

O diâmetro da esfera rígida é calculado a partir do diâmetro nas condições críticas e em função da temperatura pelas equações (5.16) e (5.17):

$$d_i = 1.065655 d_{ci} \{1 - 0.12 \exp[-2T_{ci}/(3T)]\} \quad (5.16)$$

$$d_{ci} = \left(\frac{0.08943 RT_{ci}}{P_{ci}} \right)^{1/3} \quad (5.17)$$

Onde d_{ci} é o valor do diâmetro de esfera rígida à temperatura crítica T_{ci} , para o componente i .

O conjunto de equações (5.14) a (5.17) permite o cálculo da contribuição de volume livre à energia residual de Helmholtz, as quais não têm nenhuma constante binária, permitindo a aplicação direta em modelos de contribuição de grupos.

O termo de contribuição atrativa da energia residual de Helmholtz (A_{att}^R) é avaliado empregando uma expressão do tipo NRTL com regras de mistura dependentes da densidade, mostrada nas Equações (5.18) a (5.25):

$$(A/RT)^{at} = -\frac{z}{2} \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j \sum_k^{NG} \theta_k (g_{kj} q \tau_{kj} / RTV) / \sum_l^{NG} \theta_l \tau_{lj} \quad (5.18)$$

Onde,

$$\theta_j = (q_j / q) \sum_i^{NC} n_i v_j^i \quad (5.19)$$

$$\tilde{q} = \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j \quad (5.20)$$

$$\tau_{ij} = \exp[\alpha_{ij} \Delta g_{ij} \tilde{q} / (RTV)] \quad (5.21)$$

$$\Delta g_{ij} = g_{ij} - g_{jj} \quad (5.22)$$

As interações entre grupos diferentes são calculadas por:

$$g_{ij} = k_{ij} (g_{ii} g_{jj})^{1/2} \quad k_{ij} = k_{ji} \quad (5.23)$$

$$k_{ij} = k_{ij}^* [1 + k'_{ij} \ln(2T/(T_i^* + T_j^*))] \quad (5.24)$$

A interação entre grupos iguais leva em conta a dependência com a temperatura sendo calculado como:

$$g_{jj} = g_{jj}^* [1 + g'_{jj} (T/T_j^* - 1) + g''_{jj} \ln(T/T_j^*)] \quad (5.25)$$

Onde g_{ij}^* , g_i' , g_i'' , representam os parâmetros energéticos atrativos do grupo i (na temperatura de referencia T_i^*), k_{ij}' , k_{ij}^* são parâmetros de interação binária e α_{ij} é o parâmetro NRTL de não aleatoriedade. z é o número de compostos da vizinhanza, v_j^i é o número de grupos tipo j na molécula i , q_j é o número de segmentos de superfície do grupo j , θ_k é a fração de superfície do grupo k , $\tilde{q}$ é o número total de segmentos de superfície, g_{ij} é a energia atrativa entre segmentos iguais.

Os valores dos parâmetros g_{ij}^* , g_i' , g_i'' , k_{ij}' , k_{ij}^* , α_{ij} podem se encontrar disponíveis na literatura.

Diversos estudos empregaram a GC-EOS na modelagem termodinâmica de substâncias presentes em extratos naturais e $scCO_2$ (ESPINOSA et al., 2000; ESPINOSA et al., 2003; CHAFER et al., 2004; ESPINOSA et al., 2005a; DIAZ et al., 2005; de La FUENTE et al., 2005; CHAFER et al., 2006; VÁZQUEZ et al., 2007). Também tem sido reportado o uso para a modelagem de sistemas contendo triacilgliceróis (ESPINOSA et al., 2002, FLORUSSE, et al., 2004) ou em óleos de laranja (DIAZ et al., 2005), girassol e palma (HEGEL et al., 2005).

5.5 MODELOS EMPÍRICOS

Chrastil (1982) considera que as moléculas do fluido supercrítico e o correspondente soluto associam-se e formam um complexo solvatado que está em equilíbrio com o fluido. Este modelo empírico é baseado na observação de que, graficando-se dados isotérmicos do logaritmo da solubilidade em função do logaritmo da densidade, resulta uma linha reta. A equação de Chrastil precisa da densidade do $scCO_2$ e da temperatura do sistema; assim, por um ajuste aos dados experimentais, obtêm-se os três parâmetros, a equação de Chrastil é dada pela equação (5.49) a seguir:

$$\ln S = a_0 + a_1 \ln(\rho) + \frac{a_2}{T} \quad (5.26)$$

O modelo tem a capacidade de reproduzir dados experimentais e por isso tem sido amplamente usada na literatura científica para correlacionar e extrapolar dados experimentais de solubilidade de diversos solutos em fluidos supercríticos (SOARES et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2001).

Outros modelos empregados para correlacionar dados experimentais são apresentados nas equações (5.27) a (5.34):

Modelo de del Valle e Aguilera (1988):

$$\ln S = a_0 + a_1 \ln(\rho) + \frac{a_2}{T} + \frac{a_3}{T^2} \quad (5.27)$$

Modelo de Kumar e Johnston (1988):

$$\ln S = a_0 + a_1 \rho + \frac{a_2}{T} \quad (5.28)$$

Modelo de Yu et al. (1994):

$$y_2 = a_0 + a_1 P + a_2 P^2 + a_3 PT(1 - y_2) + a_4 T + a_5 T^2 \quad (5.29)$$

Modelo de Gordillo et al. (1999):

$$\ln y_2 = a_0 + a_1 P + a_2 P^2 + a_3 PT + a_4 T + a_5 T^2 \quad (5.30)$$

Modelo de Bartle et al. (1991):

$$\ln \left(\frac{y_2 P}{P_{ref}} \right) = a_0 + a_1 (\rho - \rho_{ref}) + \frac{a_2}{T} \quad (5.31)$$

Modelo de Jouyban et al. (2002):

$$\ln y_2 = a_0 + a_1 P + a_2 P^2 + a_3 PT + \frac{a_4 T}{P} + a_5 \ln(\rho) \quad (5.32)$$

Modelo de Méndez-Santiago e Teja (2000) :

$$T \ln(y_2 P) = a_0 + a_1 \rho + a_2 T \quad (5.33)$$

Modelo de Jafari Nejad et al. (2010):

$$\ln y_2 = a_0 + a_1 P^2 + a_2 T^2 + a_3 \ln(\rho) \quad (5.34)$$

onde S expressa os dados de solubilidade (g/L), y_2 (fração molar), T (K) a temperatura, P a pressão (bar), ρ representa a densidade do CO_2 (g/L), P_{ref} é pressão de referência (1 bar), ρ_{ref} é densidade de referência (700 g/L) e $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$ são constantes ajustáveis.

Com o intuito de modelar termodinamicamente a solubilidade em scCO_2 de substâncias presentes em extratos naturais, foram escolhidas duas biomoléculas (artemisinina e esqualeno). Para o sistema artemisinina- CO_2 os valores experimentais de solubilidade foram modelados com PR EOS e diversos modelos empíricos, foi usado o programa PE (PFHOL et al, 2000) e o software Statistica (V 7.0) empregando análise de regressão não linear. O sistema esqualeno- CO_2 foi escolhido pela sua característica principal de apresentar equilíbrio entre as fases líquido e vapor, fato que permitiu estudar seu comportamento termodinâmico com o modelo GC EOS por meio do programa GPEC, o software que apresenta restrição às fases líquido e vapor.

5.6 SOLUBILIDADE DA ARTEMISININA EM scCO₂

Os dados experimentais de Gong e Cao (2009) para a solubilidade de artemisinina em CO₂ supercrítico foram usados na modelagem termodinâmica. Empregou-se a equação de Peng-Robinson PR-EOS com a regra de mistura clássica, com ajuda do programa PE, empregando as propriedades críticas e físico-químicas apresentadas na Tabela 5.1. Correlacionou-se também estes valores experimentais usando alguns modelos empíricos, onde os valores das constantes (a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , a_5) foram obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais empregando o método de estimação de Levenberg-Marquardt por meio do software Statistica[®] V 7.0 (StatSoft, EUA) para a minimização da função objetivo (Equação 5.35):

$$FO = \sum (y_2^{obs} - y_2^{pred})^2 \quad (5.35)$$

Com o intuito de comparar os diferentes modelos, o valor dos desvios relativos médios (AARD) entre os valores experimentais (y_{2i}^{Exp}) e valores calculados (y_{2i}^{Calc}) de solubilidade foram obtidos pela equação (5.36), com $N_p = 27$ (número de medidas experimentais).

$$AARD(\%) = (100 / N_p) \left[\sum_i^{N_p} \frac{|y_{2i}^{Exp} - y_{2i}^{Calc}|}{y_{2i}^{Exp}} \right] \quad (5.36)$$

Tabela 5. 1 - Propriedades físicas

	MM (g/mol)	Temperatura Crítica T_c (°C)	Pressão Crítica P_c (bar)	Fator Acêntrico ω	Referência
CO ₂	44,01	303,95	73,75	0,225	Angus <i>et al.</i> (1976)
artemisinina	211,5	767.55	24,45	0,6125	Coimbra et al (2006)

5.6.1 Resultados

Na Figura 5.2, representa-se graficamente o comportamento dos dados experimentais de solubilidade de artemisinina em função da temperatura e pressão, e na Figura 5.3 comparam-se estes valores com os resultados da modelagem termodinâmica com a PR EOS. Assim é possível observar que a predição feita com a PR EOS consegue descrever bem o comportamento experimental nas temperaturas de 313 K, 323 K e 333 K, com valores de AARD de 5,63%, 10,14% e 7,60% respectivamente.

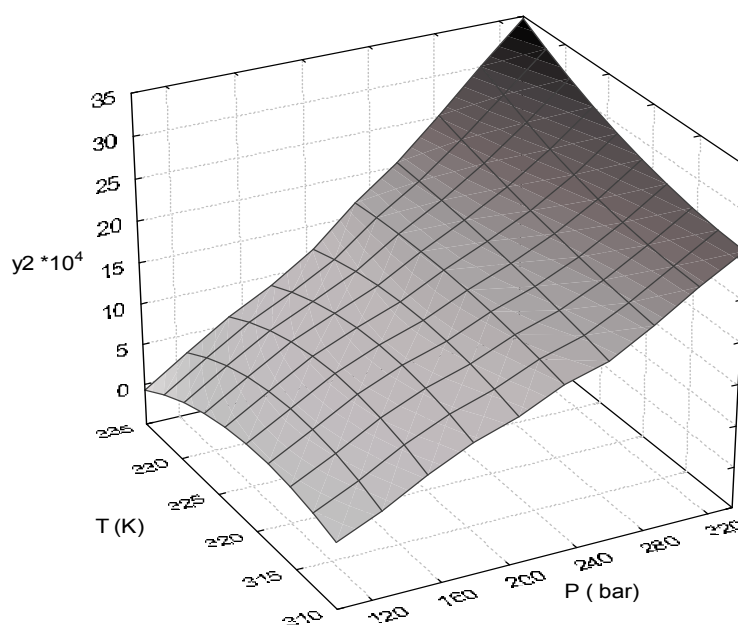


Figura 5. 2 - Superfície representativa da solubilidade experimental da artemisinina em scCO₂.

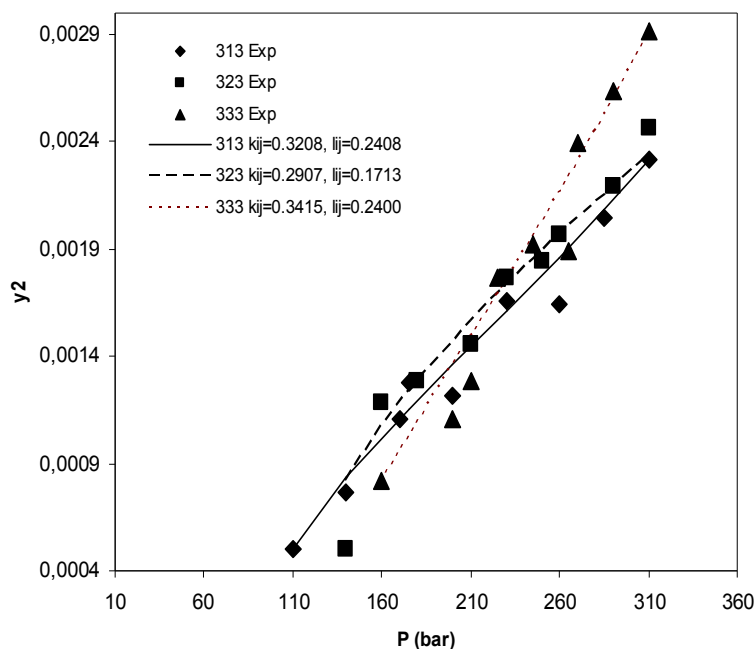


Figura 5. 3 - Solubilidade da Artemisinina em scCO₂: dados experimentais e calculados com o modelo PR-EOS.

Na Tabela 5.2 relacionam-se os parâmetros dos diferentes modelos empíricos, os respectivos desvios (AARD) e os coeficientes de correlação (R).

Tabela 5. 2 - Valores dos parâmetros dos diferentes modelos empíricos.

Modelo	parâmetros						AARD (%)	R
	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5		
BCJS	340,27	0,47	-6117,28	-	-	-	8,728	0,9880
dVA	15,33	6,42	-16763,96	2,09E+06	-	-	8,064	0,9831
Chrastil	-4,63	6,41	-3841,54	-	-	-	8,259	0,9828
KJ	7,99	0,35	-3976,99	-	-	-	7,982	0,9834
GBMM	-27,4312	-3,17E-02	-3,40E-05	1,68E-04	1,47E-01	-2,87E-04	8,505	0,9673
YSRZ	-3,13E-02	-8,20E-05	-1,1E-09	2,90E-07	2,48E-04	-4,77E-07	8,820	0,9769
JCF	-10,7268	-0,0384	1,70E-05	8,86E-05	-0,855	2,347	7,932	0,9735
MST	-8865,23	152,02	17,76	-	-	-	8,725	0,9881
JNAMM	-1,52E+01	-1,69E-05	1,18E-07	2,3961	-	-	7,970	0,9710

BCJS: Bartle-Clifford-Jafar-Shilstone, **dVA:** del Valle-Aguilera, **KJ:** Kumar-Johnston,

GBMM: Gordillo-Blanco-Molero-Martinez, **YSRZ:** Yu-Singh-Rizvi-Zolleg, **JCF:** Jouyban-Chan-Foster,

MST: Méndez Santiago-Teja, **JNAMM:** Jafari Nejad-Abolghasemi-Moosavian-Maragheh.

Nas figuras (5.4) e (5.5) pode se observar os resultados do ajuste das diferentes modelos estudados. Nestas figuras observa se que dentre os modelos de três parâmetros ajustáveis (Chrastil, BCJS, KJ e MST) o modelo KJ apresenta o menor valor de AARD e bom grau de ajuste. A melhora da equação de Chrastil proposta por del Valle e Aguilera (4 parâmetros) por meio da adição de um parâmetro ajustável consegue melhorar o grau de ajuste e diminuir o valor de AARD deste modelo. Dentre os modelos de 4 parâmetros O modelo JNAMM tem menor valor de AARD mais o grau de ajuste resulta mais baixo do que o modelo dVA. Quanto aos modelos de 6 parâmetros (GBMM, YSRZ e JCF), o modelo JCF aparenta melhor desempenho na correlação da solubilidade experimental, este modelo é baseado na densidade do scCO_2 entanto que os outros dois apresentam dependência polinomial de 2° ordem entre pressão e temperatura. Assim os modelos empíricos de KJ e JCF possuem melhor habilidade na correlação dos dados de solubilidade de artemisinina em scCO_2 .

A média dos valores de AARD entre as 3 isotermas para as predições com a equação de estado PR EOS é de 7,79 %, valor que está um pouco por baixo dos menores desvios obtidos com os modelos empíricos KJ e JCF. Estes modelos empíricos correlacionam com igual exatidão que a equação de estado, e em concordância com o sinalado por Tabernero et al. (2010), os modelos empíricos apresentam mais simplicidade no calculo da solubilidade, além de evitar o uso de métodos de predição de propriedades para o solido puro.

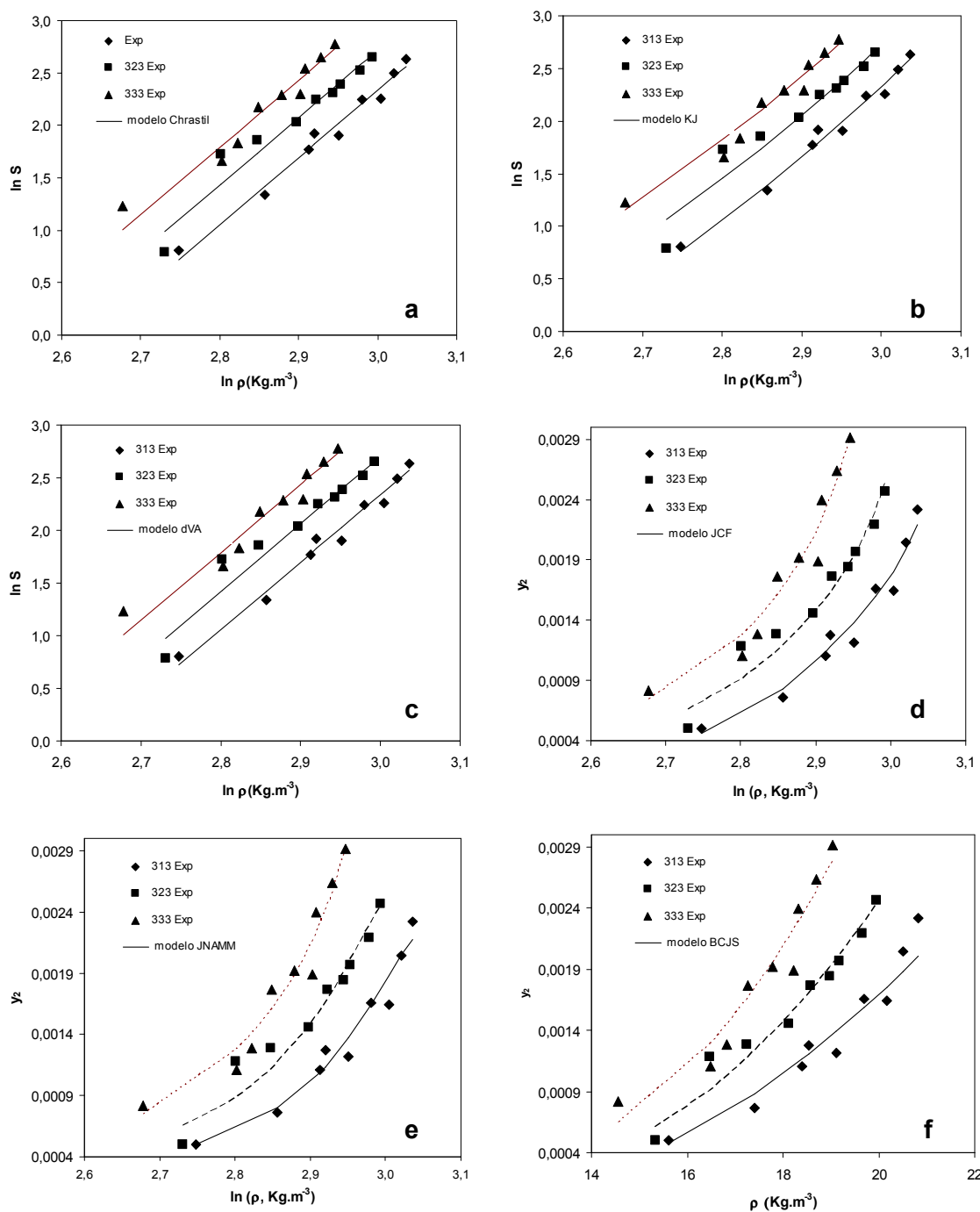


Figura 5. 4 - Correlação da solubilidade da artemisinina em scCO_2 com modelos empíricos. **a.** Chrastil (1982), **b.** Kumar e Jonhston (1988, KJ), **c.** del Valle e Aguilera (1988, dVA), **d.** Jouyban et al. (2002, JCF), **e.** Jafari Nejad et al. (2010, JNMM), **f.** Bartle et al. (1991, BCJS).

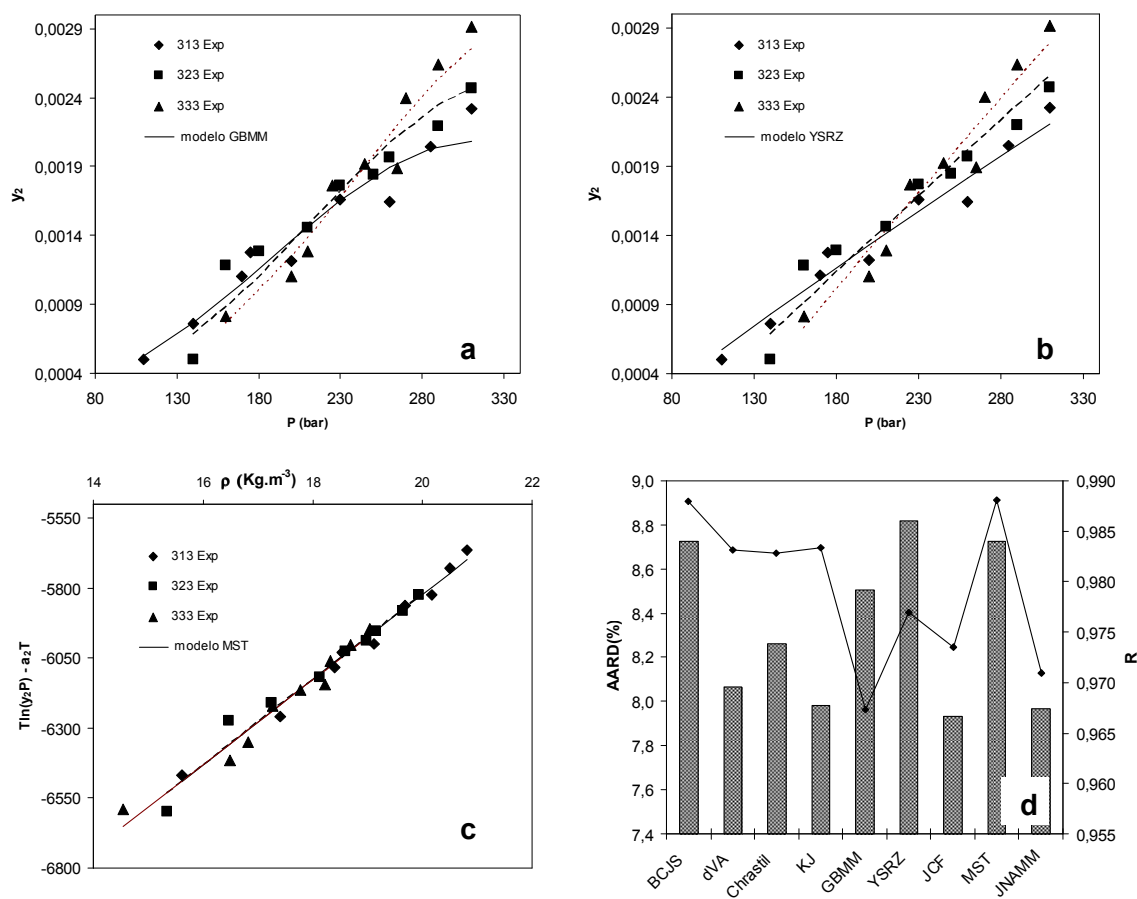


Figura 5. 5 - Correlação da solubilidade da artemisinina em scCO_2 com modelos empíricos. **a.** Gordillo et al (1999, GBMM), **b.** Yu et al. (1994, YSRZ), **c.** Mendez-Santiago-Teja (MST), **d.** Valres de AARD e R , para cada modelo.

5.7 SOLUBILIDADE EXPERIMENTAL DO ESQUALENO EM scCO_2 ⁷

O esqualeno (2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$) cuja estrutura química está apresentada na Figura 5.6, é um hidrocarboneto de cadeia linear da família dos triterpenos, possui cadeia linear altamente insaturada, é termicamente instável e sensível à luminosidade e aparece nas concentrações de 50-70% em massa em óleo de tubarão (*Centrophorus squamosus*) e óleo de baleia (*Physeter macrocephalus*). Em procura de uso de fontes sosteníveis, estudos apontam na extração de esqualeno a partir de fontes vegetais como o óleo de farelo de arroz, de milho, amendoim, de oliva e de amaranto (HE et al., 2002). É reconhecido pelas suas propriedades benéficas à saúde humana, com possibilidade de reduzir os níveis de colesterol e triglicérides e no tratamento de alguns tipos de cancer (NEWMARK, 1997, RAO et al., 1998, SMITH et al., 1998), prevenindo a oxidação lipídica pela sua atividade antioxidante (KOHNO et al., 1995 , GUCLU-USTUNDAG e TEMELLI, 2004) .

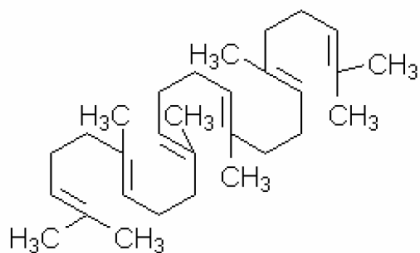


Figura 5. 6 - Estrutura molecular do esqualeno

⁷ Este estudo foi a base do artigo: **Measurements and thermodynamic modeling of the solubility of squalene in supercritical carbon dioxide**. Martinez-Correa, H., Gomes, D.C.A., Lury, S., Cabral, F.A. Journal of Food Engineering, v.96, p43-50, 2010

5.7.1 Determinação da solubilidade experimental

A solubilidade em scCO_2 foi obtida experimentalmente pelo método estático em um sistema de medida (Laboratório ExTrAE, UNICAMP, Brasil) como esquematizado na Figura 5.7 e operado no modo estático. Consistiu basicamente em promover o contato entre o CO_2 em estado supercrítico e o esqualeno puro ($\geq 97\%$, Fluka Chemie, grau cromatográfico) no extrator (14) por um período pré-determinado e suficiente para atingir o equilíbrio termodinâmico de fases. Para manter a mesma condição de pressão no sistema durante a coleta, o seguinte procedimento foi necessário: depois de atingido o tempo de equilíbrio no extrator (14), a bomba (7) foi acionada para pressurizar o tanque pulmão (12), então as válvulas de entrada e de saída do extrator foram abertas simultaneamente, evitando a queda de pressão no sistema (extrator e coletor). Esta prática facilita o deslocamento dos compostos solubilizados em scCO_2 para o frasco coletor (21).

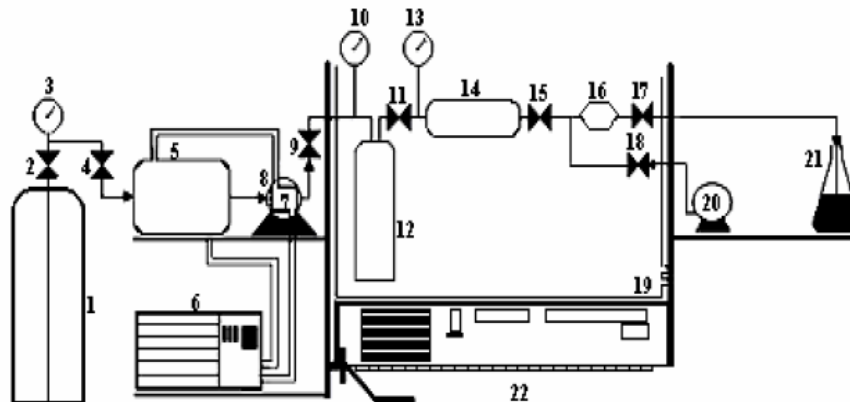


Figura 5. 7 - Sistema experimental para medição de solubilidade do esqualeno. (1) cilindro de CO_2 , (2, 4, 9, 11, 15, 18) válvulas tipo agulha, (3, 10, 13) manômetros tipo Bourdon, (5) trocador de calor, (6) banho refrigerado, (7) camisa, (8) bomba de alta pressão, (12) reservatório de CO_2 , (14) extrator, (16) coletor, (17) válvula tipo agulha, (19) banho termostatizado, (20) bomba peristáltica, (22) trocador de calor.

As amostras foram deixadas por três horas para que se estabelecesse o equilíbrio, retirava-se a primeira amostra após esse período e as seguintes depois de cada uma hora até que se completasse a triplicata. A temperatura escolhida foi de 313, 323 e 333 K nas pressões de 100, 200, 300 e 400 bar.

A solubilidade foi representada na forma de massa de soluto extraído por massa de solvente, calculada a partir da equação (5.37), mostrada a seguir:

$$\bar{Y} = \frac{x}{V_c \cdot \rho_{CO_2}} \quad (5.37)$$

Onde:

$\bar{Y}$ = Solubilidade (g soluto/g CO₂)

x = Massa total de soluto extraído no coletor (g soluto)

V = Volume do coletor (mL)

ρ = Densidade do CO₂ nas condições de P e T do sistema (gCO₂/mL)

5.7.2 Modelagem termodinâmica

A modelagem termodinâmica foi empregada para o sistema esqualeno – scCO₂ usando os dados experimentais neste trabalho em conjunto com os obtidos por Catchpole e Von Kamp (1997), usando as equações de estado PR EOS e GC-EOS (empregando o software GPEC⁸).

5.7.3 Resultados e Discussões

A Tabela 5.3 apresenta os valores experimentais obtidos neste trabalho de solubilidade do esqualeno puro em scCO₂ nas faixas de pressão e temperatura entre 100 e 400 bar e 313 - 333 K.

⁸ Global Phase Equilibrium Calculations, 2007. www.gpec.plapiqui.edu.ar

Tabela 5.3 - Solubilidade de esqualeno em scCO₂

T (K)	Pressão (bar)	Densidade (kg.m ⁻³)	Solubilidade (g/kg)	T (K)	Pressão (bar)	Densidade (kg.m ⁻³)	Solubilidade (g/kg)
313	100	629	5,1 ± 0,6	323	100	389	0,5 ± 0,1
	200	841	27,0 ± 0,4		200	785	23,5 ± 0,8
	300	910	48,5 ± 4,0		300	871	54,4 ± 9
	400	956	67,2 ± 4,2		400	923	77,2 ± 2
333				200	725	19,9 ± 0,8	

Na Figura 5.8 é apresentada a comparação dos dados de solubilidade (fração molar) obtidos experimentalmente junto com os reportados por Catchpole e von Kamp (1997) no intervalo de 100 - 250 bar, os quais concordam entre si em ordem de grandeza. Pode se observar que os dados experimentais apresentaram um ponto de cruzamento “*crossover point*” para pressão ao redor de 250 bar, acima do qual um acréscimo na temperatura produz um aumento na solubilidade, o comportamento oposto acontece na região abaixo deste ponto, na qual correspondentes decréscimos na temperatura aumentam a solubilidade do esqualeno em scCO₂.

5.7.3.1 Correlação com a equação de Chrastil

Os dados experimentais obtidos e os reportados por Catchpole e von Kamp (1997) foram correlacionados com a equação de Chrastil para obter a expressão dada pela Equação (5.38) a seguir:

$$\ln(y) = 5.626 \ln(\rho) - \frac{3053.77}{T} - 34.018 \quad (5.38)$$

A qualidade do ajuste entre dados experimentais e previstos pela equação de Chrastil está apresentada na Figura 5.9, na qual é graficada a densidade do scCO₂ versus solubilidade do esqualeno, mostrando a dependência da solubilidade com estas duas variáveis.

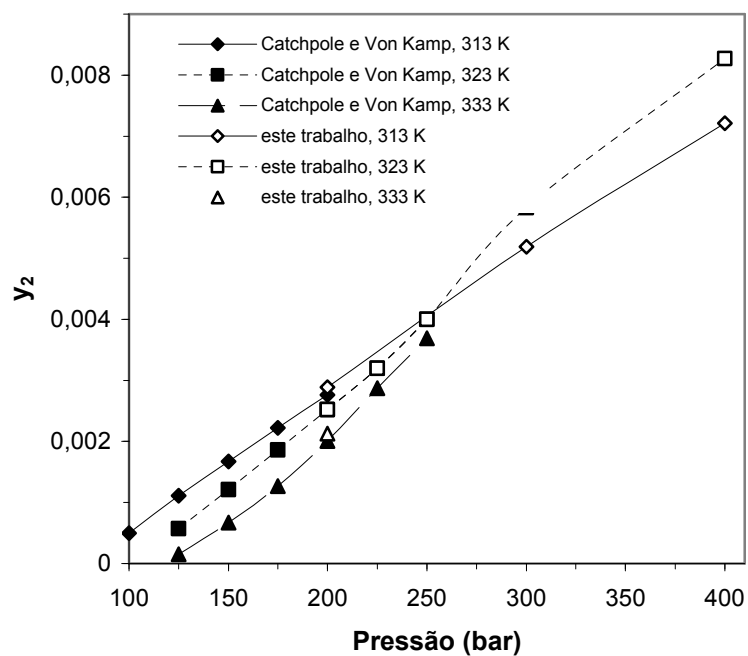


Figura 5. 8 - Solubilidade experimental do esqualeno em scCO_2 .

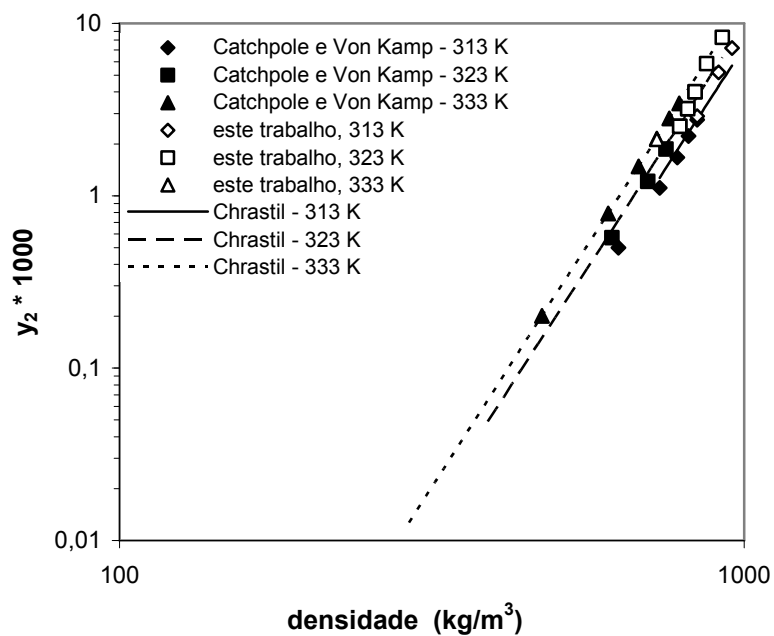


Figura 5. 9 - Ajuste de dados experimentais à equação de Chrastil da solubilidade de esqualeno em scCO_2 .

5.7.3.2 Modelagem Termodinâmica

Para a modelagem termodinâmica da solubilidade de esqualeno no scCO_2 empregaram-se diferentes as equações de estado: Peng-Robinson (PR) e GC OS.

a. EOS Cúbica (PR EOS)

As equações cúbicas necessitam como informação de entrada, das propriedades físico químicas das substâncias puras presentes aborpara assim poder modelar termodinamicamente a mistura.

Propriedades críticas dos Compostos Puros

Diferente do dióxido de carbono, as propriedades críticas e fator acêntrico do esqualeno são desconhecidas, portanto devem ser estimadas por dois caminhos: o primeiro, por meio de métodos por contribuição de grupos, e o segundo, a partir do ajuste dos dados experimentais de pressão de vapor e volume do líquido saturado a alguma equação de estado (TAMOUZA et al., 2005). Para estimar as propriedades do esqualeno estas duas abordagens foram empregadas.

Tabela 5. 4 - Parâmetros para esqualeno na equação PHSC .

Parâmetro	Esqualeno
eps/k (K)	216,928
$V_{\text{oo}} \text{ (L/mol)}$	0,01972927
r	16,068

Na primeira abordagem, empregaram-se os métodos de contribuição de grupos de Joback e Reid (1987), Lydersen (1955) e Somayajulu (1989), os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.6. Na segunda abordagem,

foram gerados dados do comportamento volumétrico do esqualeno (dados PVT) com ajuda da equação PHSC (Song et al., 1994) (Anexo A), empregando o software PE (PFOHL et al., 2000). Foi empregado o método desenvolvido por Elvassore et al. (2002) para estimar os parâmetros do esqualeno para este modelo, os quais estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5. 5 - Propriedades críticas do dióxido de carbono e esqualeno

	Massa Molar MW (g/mol)	Temperatura Crítica Tc (K)	Pressão Crítica Pc (bar)	Fator Acêntrico ω	Referências
CO ₂	44.01	303,95	73.75	0.225	Angus et al. (1976)
Esqualeno	410.73	707,4	7.03	-	Catchpole and von Kamp (1997)
		837,95	6.5	-	Vázquez et al. (2007) ^a
		781,98	11.121	1.9083	Ruivo et al. (2007)
		715,25	7.19	2.32	Martin eCocero (2007)
		837,91	6.53	1.3985	Araujo et al. (2001) ^a
		1114,86	7.088		Este trabalho ^b
		887,54	115.27		Este trabalho ^c
		865,35	9.49		Este trabalho ^d
		904,71	6..62	0.6918	Este trabalho ^e

^a estimados pelo método de Constantinou (CONSTANTINOUE e GANI, 1994). , ^b Calculado pelo método de contribuição de grupos de Joback e Reid (1987), ^c Calculado pelo método de contribuição de grupos de Lydersen (1955), ^d Calculado pelo método de contribuição de grupos de Somayajulu (1989), ^e Calculadas a partir de ajuste de dados PVT obtidos pela equação PHSC (SONG *et al.*, 1994) e usando o método de contribuição de grupos (ELVASSORE *et al.*, 2002) para estimar os parâmetros de esqualeno.

Após obter os parâmetros, dados PVT para o esqualeno foram gerados. Considerando estes valores como experimentais ($P_{exp,i}^{vap}$, $v_{exp,i}^{liq}$) foram encontradas a temperatura crítica, pressão crítica e fator acêntrico do esqualeno, tomando estas propriedades como parâmetros ajustáveis na equação de Peng – Robinson por meio da minimização da função objetivo (Equação 5.39), calculada a partir dos

desvios na pressão de vapor (P^{vap}) e densidade do líquido (v^{liq}); os valores otimizados estão apresentados na Tabela 5.5.

$$FO = \sum_1^{Np} \left[\frac{|P_{exp,i}^{vap} - P_{cal,i}^{vap}|}{P_{exp,i}^{vap}} + \frac{|v_{exp,i}^{liq} - v_{cal,i}^{liq}|}{v_{exp,i}^{liq}} \right] \quad (5.39)$$

A equação de Peng Robinson com regra de mistura clássica foi empregada para modelar o equilíbrio de fases em termos da solubilidade do esqualeno no scCO₂. Os parâmetros de interação, Ka_{ij} e Kb_{ij} , foram obtidos usando um programa computacional, minimizando as diferenças entre valores de fração molar na fase vapor experimentais (y^{exp}) e calculados (y^{calc}), empregando-se a função objetivo a apresentada pela Equação (5.40):

$$S(Ka_{ij}, Kb_{ij}) = \sum_{j=1}^{Np} \sum_{i=1}^2 \left[\left(\frac{y_i^{calc} - y_i^{exp}}{y_i^{exp}} \right)^2 \right]_j \quad (5.40)$$

Onde Np , representa o número de pontos experimentais.

Quando usados os valores das propriedades críticas e fator acêntrico da Tabela 5.6, verificou-se que, na maioria dos casos, a modelagem termodinâmica não conseguiu encontrar parâmetros de interação binária que pudessem correlacionar adequadamente os valores experimentais de solubilidade. Somente quando as propriedades críticas e fator acêntrico relatadas por Ruivo et al. (2004) foram empregadas, a modelagem termodinâmica pode correlacionar os valores experimentais, ajuste apresentado na Figura 5.10. Nesta figura compara-se valores experimentais de solubilidade com valores obtidos pela modelagem termodinâmica que emprega a equação de Peng Robinson; assim, o ajuste permitiu obter os parâmetros de interação binária.

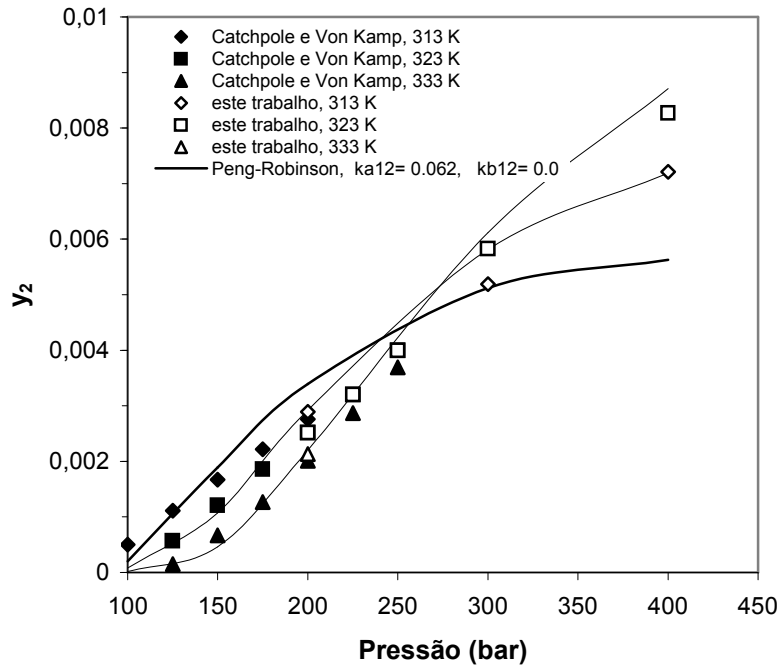


Figura 5. 10 - Solubilidade do esqualeno em scCO₂, dados experimentais e ajustados pelo modelo PR.

b. Equação de estado por contribuição de grupos (GC-EOS)

Influência dos parâmetros

Com o intuito de estudar o desempenho da equação GC-EOS foram empregados diferentes conjuntos de parâmetros: para grupos puros (g_i^* , g_i' , g_i'') e parâmetros de interação binária (α_{ij}) entre os grupos CH=C e CO₂ (Tabela 5.6).

Desvios relativos médios (AARD) entre valores experimentais (y_{2i}^{Exp}) e valores calculados (y_{2i}^{Calc}) de solubilidade foram calculados com a equação a seguir:

$$AARD(\%) = (100 / Np) \left[\sum_i^{Np} \frac{|y_{2i}^{Exp} - y_{2i}^{Calc}|}{y_{2i}^{Exp}} \right]^2 \quad (5.41)$$

Tabela 5. 6 - Parâmetros usados

Set	Parâmetros para o grupo CH=C	Parâmetro de interação entre os grupos CH=C e CO ₂
I	$g_i^* = 546780$ $g_i' = -1.0966$ $g_i'' = 0.0$	$\alpha_{ij} = 0.0$
II	$g_i^* = 421650$ $g_i' = -1.3756$ $g_i'' = 0.0$	$\alpha_{ij} = 0.0$
III	$g_i^* = 421650$ $g_i' = -1.3756$ $g_i'' = 0.0$	$\alpha_{ij} = -14.247$

^a Espinosa et al., 2000, ^b Vásquez et al., 2007

Nas Figuras 5.11 a 5.13 são apresentados os resultados obtidos, os cálculos empregaram para o esqualeno: $T_c = 837,95$ K, $P_c = 6,5$ bar e $d_c = 9,336$. O modelo GC EOS prediz a tendência dos dados experimentais até 200 bar, acima deste valor prediz decréscimo na solubilidade. Inomata et al. (2005) explicam este comportamento a partir das interações moleculares, as quais parecem produzir maior efeito sobre a fase vapor quando está submetido a altas pressões. No entanto este comportamento não é real, como comprovam os valores experimentais.

O ajuste do modelo GC-EOS aos dados experimentais mostrou melhor desempenho em termos de AARD, quando o conjunto de parâmetros III foi usado, apresentando desvios entre 39% e 60%. Pode-se observar que os diferentes conjuntos de parâmetros estudados corrigem gradativamente o comportamento predito (Figuras 5.11, 5.12 e 5.13) a pressões entre 0 e 200 bar, aumentando os valores da solubilidade predita e diminuindo os valores dos desvios (Figura 5.14).

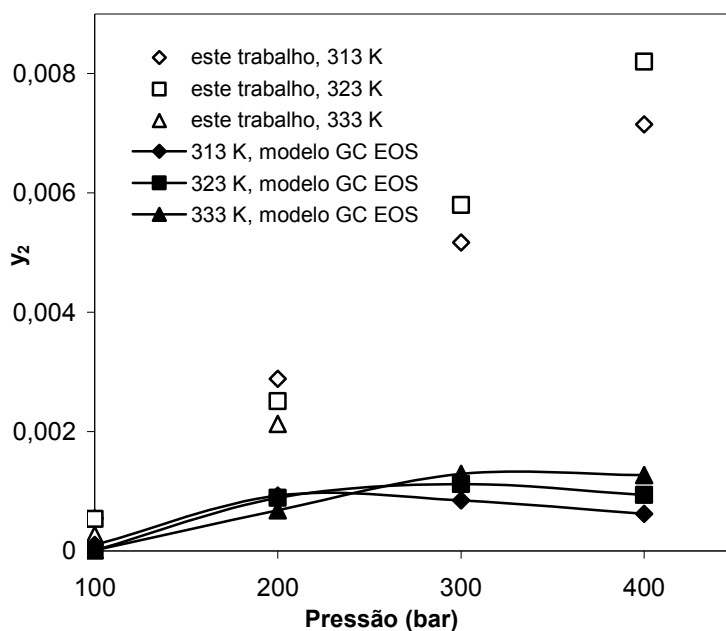


Figura 5.11 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros I.

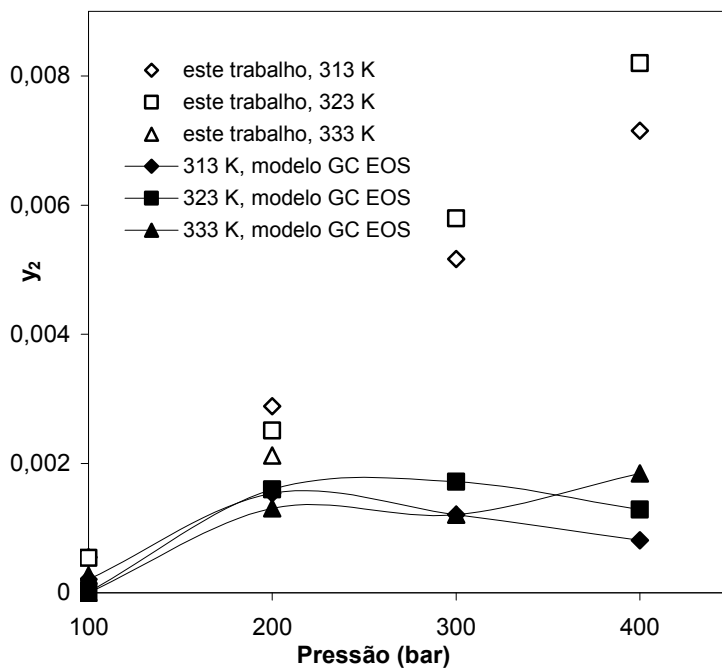


Figura 5.12 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajustes pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros II.

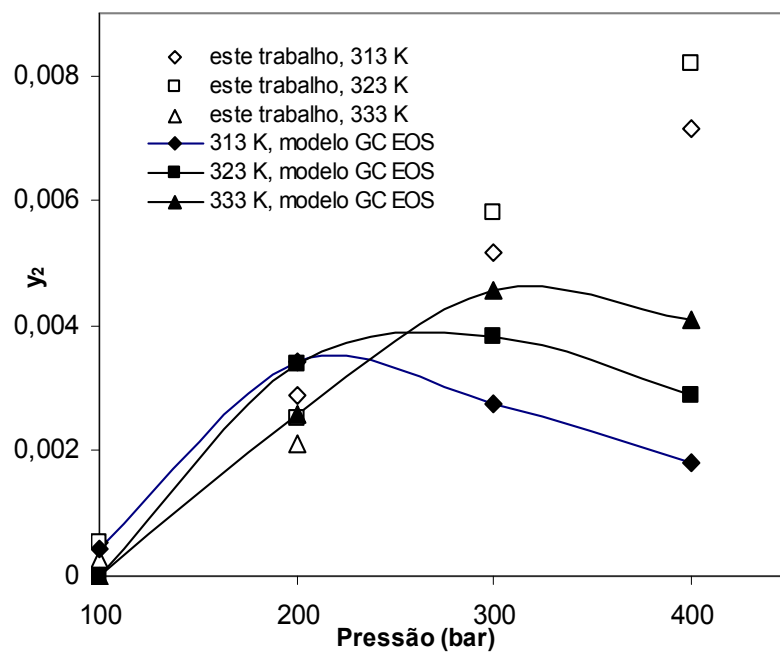


Figura 5.13 - Solubilidade do equaleno no scCO_2 , dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros III.

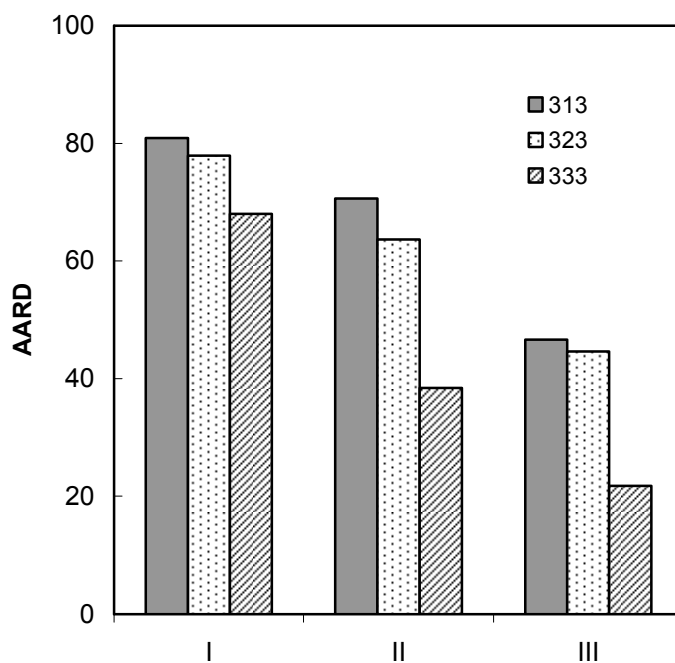


Figura 5.14 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para os diferentes conjuntos de propriedades.

Influência das propriedades termofísicas

Foi estudada a influência dos diferentes valores das propriedades críticas (temperatura crítica e pressão crítica) e diâmetro crítico da esfera rígida do esqualeno na qualidade do ajuste ao modelo GC-EOS. Na Tabela 5.7 são apresentados os diferentes conjuntos de dados empregados. Para comparação posterior os dados do diâmetros críticos de esfera rígida foram calculados pela Equação (5.17), a partir das propriedades críticas.

Tabela 5. 7 - Propriedades do esqualeno

Propriedade	Conjunto de dados				
	IV	V	VI	VII	VIII
Temperatura critica (K)	886,1 ^a	838,1 ^b	862,5 ^c	862,5 ^c	862,5 ^c
Pressão crítica (bar)	9,36 ^a	6,5 ^b	9,49 ^c	9,36 ^a	6,5 ^b
Diâmetro crítico da esfera rígida	9,336 ^b [8,896]	9,244 ^b [9,861]	9,336 ^b [8,775]	9,336 ^b [8,816]	9,336 ^b [9,955]

^a Wakeham et al., 2002, ^b Fornari 2007, ^c Calculado pelo método por contribuição de grupos de Somayajulu (1989), [--] diâmetro calculado com a Equação (5.17).

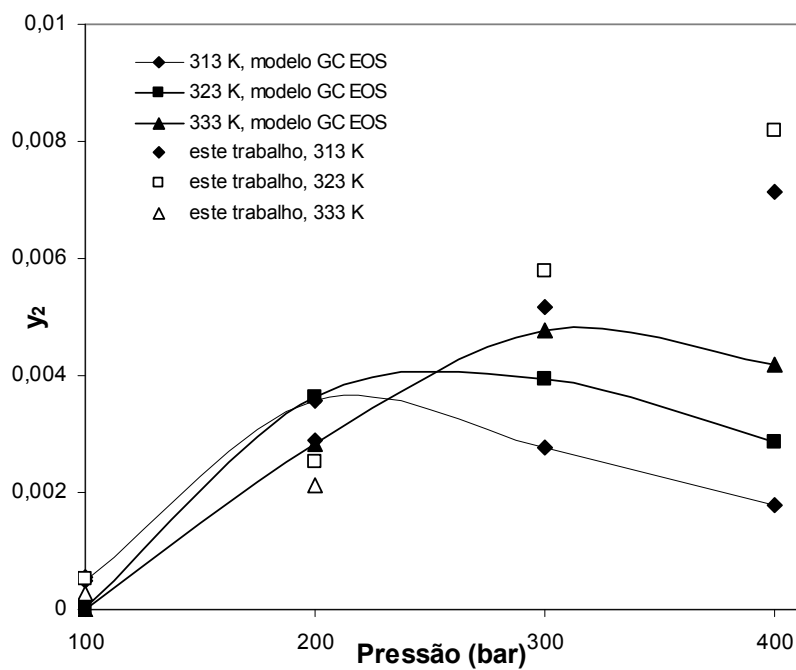


Figura 5. 15 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros IV.

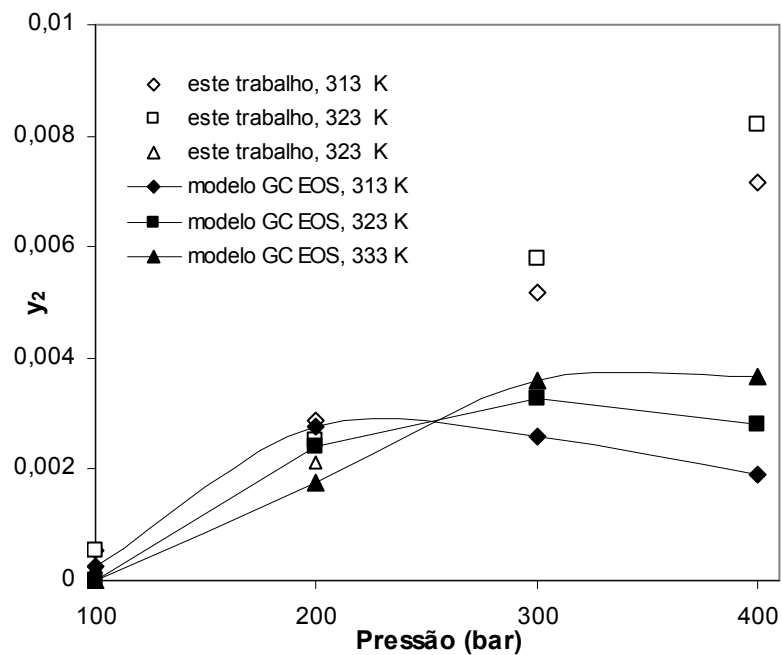


Figura 5. 16 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros V.

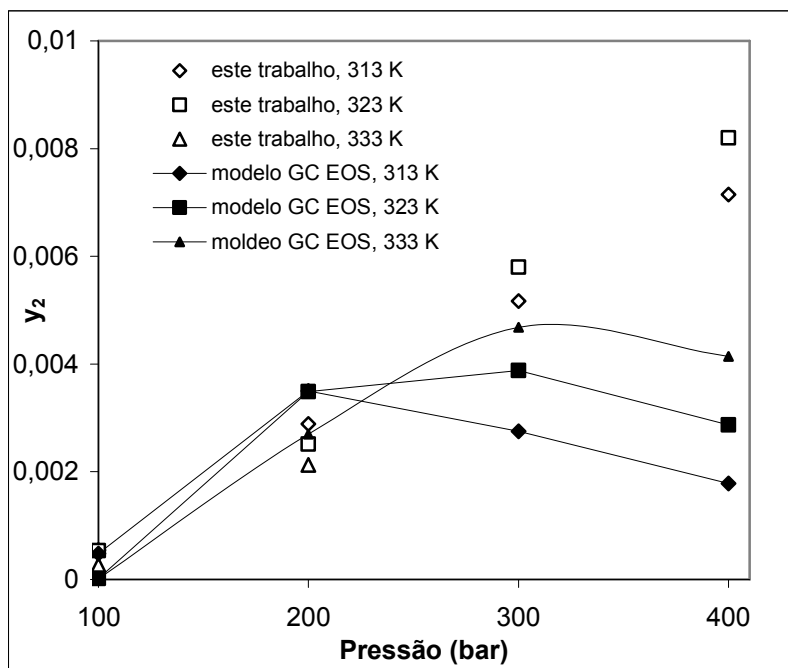


Figura 5.17 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VI.

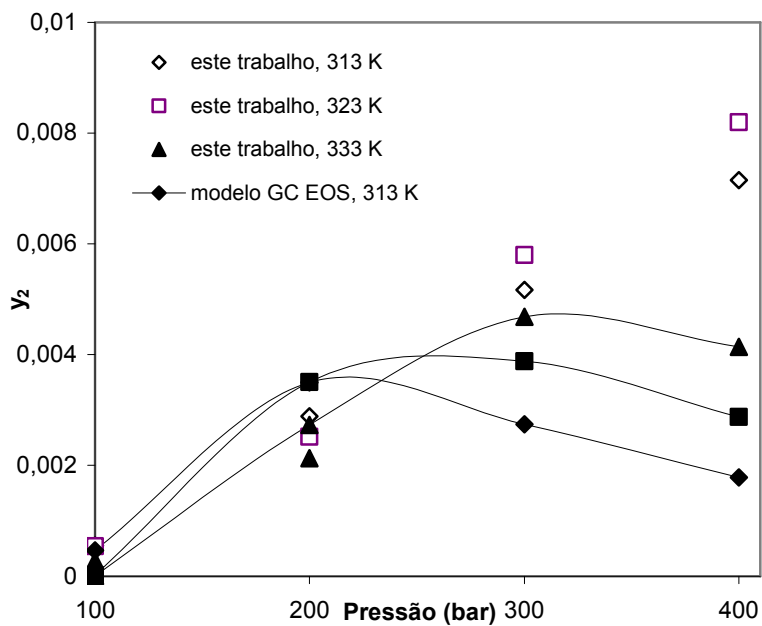


Figura 5.18 - Solubilidade do equaleno em scCO₂, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VII.

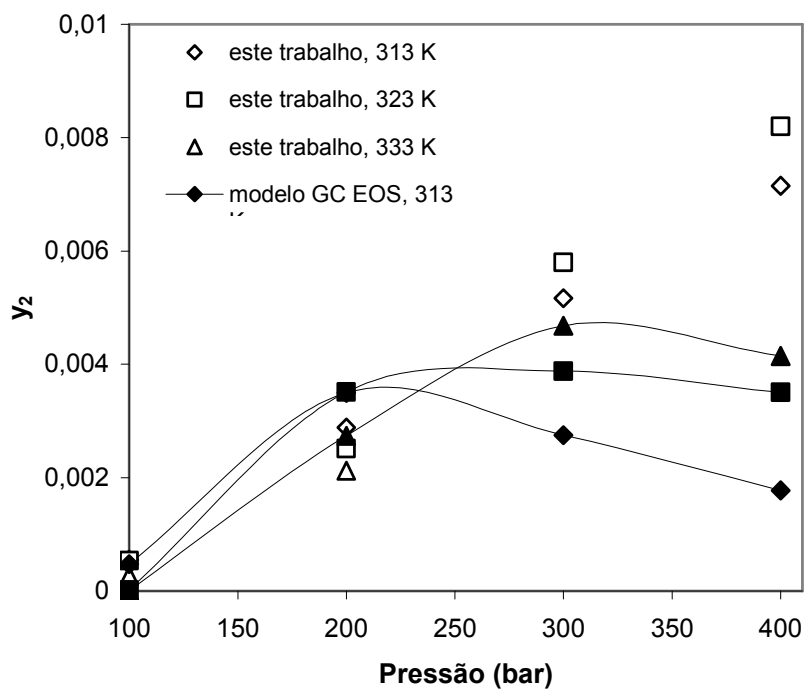


Figura 5. 19 - Solubilidade do equaleno em $scCO_2$, dados experimentais e ajuste pelo modelo GC EOS, usando o conjunto de parâmetros VIII.

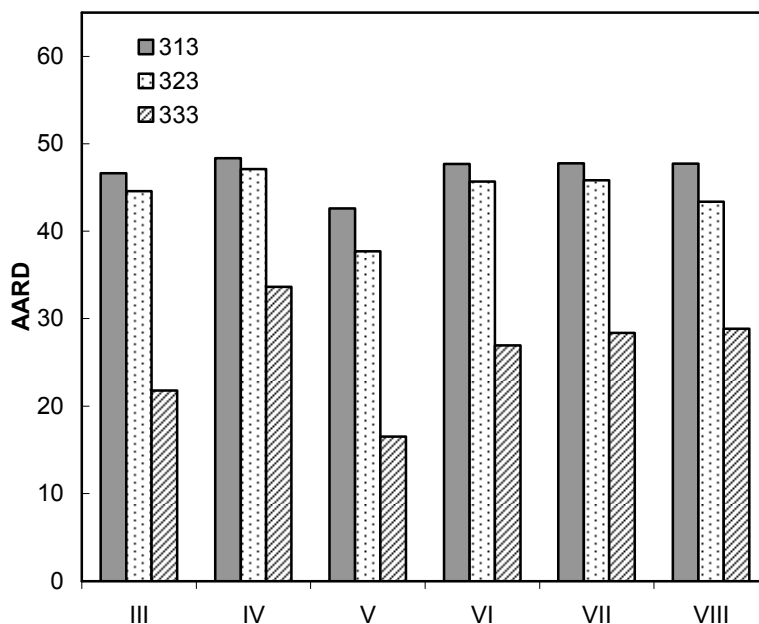


Figura 5. 20 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para os diferentes conjuntos de propriedades.

Nas Figuras (5.15) a (5.19) pode-se observar que o emprego de diferentes valores das propriedades do esqualeno, permitem predizer dados que apresentam a mesma tendência dos valores experimentais até 200 bar, acima deste valor o modelo prediz decréscimo na solubilidade.

Os valores de AARD para os diferentes conjuntos de propriedades mostradas na Figura 5.20 permitem afirmar que o valor das propriedades críticas não influenciam apreciavelmente nas predições feitas com o modelo GC EOS, para as temperaturas de 313 K e 323 K e para o mesmo valor do diâmetro crítico da esfera rígida reportados na literatura (conjunto de dados IV, VI, VII, VIII na Tabela 5.8). Importante destaque merecem as predições feitas empregando o conjunto de dados V (Figura 5.16), o qual é o único dentre os conjuntos estudados que permite predizer o ponto de cruzamento em 250 bar, concordando com as observações experimentais (Figura 5.10).

Quando empregam-se valores para diâmetro crítico da esfera rígida, calculados a partir das constantes críticas por meio da eq. (5.17) (apresentados na Tabela 5.8) observa-se que os cálculos convergem só para os conjuntos de dados VI e VII (renomeados no gráfico como VI' e VII'), resultados relatados na Figura 5.21 para a isoterma 313 K e comparados com os dados reportados para d_c (conjuntos V e VI).

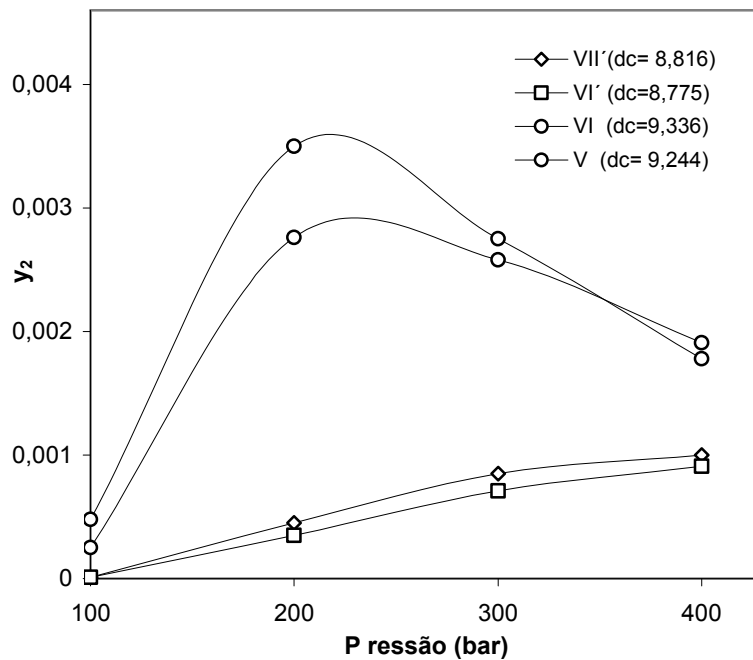


Figura 5. 21 - Dependência da solubilidade do equaleno em $scCO_2$ a diferentes valores do diâmetro crítico (dc).

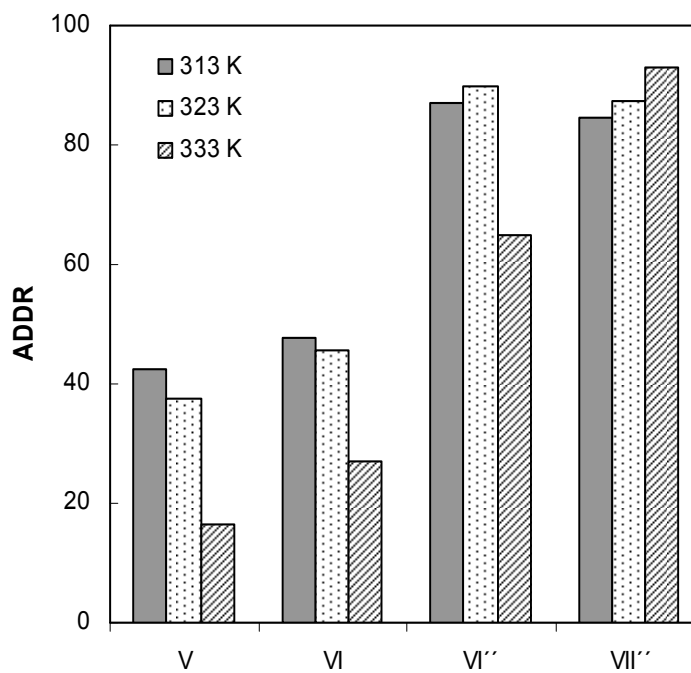


Figura 5. 22 - Comparação entre os valores dos desvios (AARD) para diferentes valores de dc .

Assim, é possível afirmar que o modelo GC EOS é fortemente dependente do valor do parâmetro dc e portanto é sensível na predição da solubilidade para o esqualeno em $scCO_2$, para outros solutos. Esta observação foi confirmada por Bottini et al. (1999), de la Fuente et al. (2005) e Mattea et al. (2007).

Esta dependência pode ser explicada a partir da equação empregada para o cálculo do parâmetro dc (Equação 5.17), a qual, para solutos de alta massa molar, não permite obter o valor adequado para dc , e sua estimativa então deverá ser feita a partir do ajuste de dados experimentais de pressão de vapor e coeficientes de atividade a diluição infinita (ESPINOSA et al., 2002a, BOTTINI et al., 1999), limitando o uso deste modelo termodinâmico como ferramenta preditiva em cálculos de equilíbrio.

5.8 CONCLUSÕES

Foi possível determinar dados experimentais e modelar termodinamicamente dados de solubilidade em $scCO_2$ de diferentes sistemas que incluem biomoléculas presentes em extratos naturais. No caso da artemisinina, a equação de Peng-Robinson apresenta o melhor ajuste aos dados experimentais, seguido pelos modelos empíricos de Jouyban (JCF) e de Kumar-Jhonston (KJ), estes modelos empíricos apresentam mais simplicidade no cálculo da solubilidade, além de evitar o uso de métodos de predição de propriedades para o sólido puro. A modelagem termodinâmica preditiva que emprega o modelo GC EOS foi avaliada para o sistema esqualeno- $scCO_2$; esta modelagem só foi bem sucedida na previsão de solubilidade do esqualeno a pressões menores que 200 bar. Para solutos de alta massa molar é necessário o ajuste do valor do seu diâmetro crítico, o qual limita o uso deste modelo como ferramenta preditiva do equilíbrio.

5.9 REFERÊNCIAS

- ANGUS S., ARMSTRONG, B., RUCK, K.M. Carbon Dioxide: international thermodynamic tables of the fluid state, vol. 3, Pergamon Press, New York, p. 266., 1976.
- ARAUJO, M., MACHADO, N.T., MEIRELES, M.A. Modeling the phase equilibrium of soybean oil desodorizer distillates + supercritical carbon dioxide using the Peng-Robinson equation of state. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.40, n.4, p.1239-1243, 2001.
- BARTLE, K.D., CLIFFORD, A.A., JAFAR, S.A., SHILSTONE, G.F. Solubilities of solids and liquids of low volatility in supercritical carbon dioxide. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v.20, p. 713–725, 1991.
- BOTTINI, S. B., FORNARI, T., BRIGNOLE, E. A. Phase equilibrium modelling of triglycerides with near critical solvents. **Fluid Phase Equilibria**, v.158–160, p. 211–218. 1999
- BOUKOUVALAS, C., SPILOTIS, N., COUTSIKOS, P., TZOUVARAS, N., TASSIOS, D. Prediction of vapor-liquid equilibrium with the lcvm model: a linear combination of the vidal and michelsen mixing rules coupled with the original UNIFAC and the t-mPR equation of state. **Fluid Phase Equilibria**, v.92, p.75-106, 1994.
- BOUZA, A., COLINA.C., OLIVERA-FUENTES, C.G. Parameterization of molecular based equations of state. **Fluid Phase Equilibria**, v.228-229, p.561-575, 2005.
- CATCHPOLE, O. J., VON KAMP, J. C. Phase equilibrium for the extraction of squalene from shark liver oil using supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.36, n.9, 3762-3768, 1997.
- CHAFER, A., FORNARI, T., BERNA, A., STATEVA, R. Solubility of quercitin in supercritical CO₂ + ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modelling. **The Journal of supercritical fluids**, v. 32, p. 89-96, 2004.
- CHAFER, A. FORNARI, T., STATEVA, R.P., BERNA, A. D-Pinitol Solubility in Supercritical CO₂: Experimental Data and Correlation. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.51, n.2, p.612-615, 2006.
- CHRASTIL, J. Solubility Of Solids And Liquids In Supercritical Gases. **Journal of Physics & Chemistry**, v.86, n.15, p.3016-3021, 1982.
- COIMBRA, P., BLANCO, M R., COSTA SILVA, H. S. R., GIL M H., DE SOUSA, H. C. Experimental determination and correlation of artemisinin's solubility in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 51, p. 1097-1104. 2006.
- CONSTANTINO L., GANI R. New Group Contribution Method for Estimating Properties of Pure Compounds, **AIChE J.**, v.40, n.10, p.1697-1710, 1994.
- DE LA FUENTE, JC., VALDERRAMA, J.O., BOTTINI, S.B., DEL VALLE, J.M.,. Measurement and modeling of solubilities of capsaicin in high-pressure CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p.195-201, 2005.

- Del VALLE , J.M., AGUILERA J.M. An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.27, p. 1551–1559, 1988.
- DAHL, S., MICHELSEN, M.L. High-pressure vapor-liquid equilibrium with a UNIFAC-based equation of state. **AIChE J.**, v.36, n.12, p.1829-1836,1990
- DIAZ, S., ESPINOSA, S., BRIGNOLE, E.A. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids Optimal process and solvent cycle design. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 49–61, 2005.
- ELVASSORE, N., STRIOLO,A., BERTUCCO,A. Thermodynamic modeling of high pressure equilibria within the McMillan Theory framework. **Fluid phase equilibria**, v.194-197, p.587-598, 2002.
- ESPINOSA, S, DIAZ, S., BRIGNOLE, E.A.Optimal design of supercritical fluid processes. **Computers and Chemical Engineering**, v. 24 p.1301-1307, 2000a
- ESPINOSA, S, FORNARI, T., BOTTINI, S., BRIGNOLE, E.A.. Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 91–102, 2002.
- ESPINOSA, S, DIAZ, S., BRIGNOLE, E.A. Optimal solvent cycle design in supercritical fluid processes. **Latin American Applied Research**, v. 33, p. 161-165, 2003.
- ESPINOSA, S, DIAZ, S., BRIGNOLE, E.A. Process optimization for supercritical concentration of orange peel oil. **Latin American Applied Research**, v. 35, p.321-326, 2005a.
- ESPINOSA, S, DIAZ ,T. FORNARI. Extension of the group contribution associating equation of state to mixtures containing phenol, aromatic acid and aromatic ether compounds. **Fluid Phase Equilibria**, v. 231 p. 197–210, 2005b
- FLORUSSE, L.J., FORNARI, BOTTINI, T.S.B., PETERS C.J. Phase behavior of carbon dioxide— low-molecular weight triglycerides binary systems: measurements and thermodynamic modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.31, p.123–132, 2004.
- FORNARI, T. Revision and summary of the group contribution equation of state parameter table: Application to edible oil constituents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 262, p.187–209, 2007.
- FREDENSLUND A., JONES R.L., PRAUSNITZ J.M. Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures, **AIChE J.**, v.21, n.6, p.1086-1099, 1975.
- GONG, X.Y., CAO, X.,J. Measurement and correlation of solubility of artemisinin in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.284, n.1, p.26-30, 2009.
- GORDILLO, M.D., BLANCO , M.A., MOLERO, A., MARTINEZ DE LA OSSA, E. Solubility of the antibiotic penicillin G in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.15, p. 83–189, 1999.
- GUCLU-USTUNDAG, O., TEMELLI, F. Correlating The solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide, **The Journal Of Supercritical Fluids**, v.31, n.3, p.235-253, 2004.

- HARTONO, R., MANSOORI, G. A., SUWONO, A prediction of solubility of biomolecules in supercritical solvents. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.6949–6958, 2001.
- HE, H., P., CORKE, H., CAI, J. G. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from amaranthus grain. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.51, p.7921-7925, 2003.
- HEGEL, P.E., MABE, G.D.B., PEREDA, S., ZABALOY, M.S., BRIGNOLE, E.A. Phase equilibria of near critical CO₂ + propane mixtures with fixed oils in the LV, LL and LLV region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 316–322, 2006.
- HOLDERBAUM, T., GMEHLING, J. PSRK: A group contribution equation of state based on UNIFAC, **Fluid Phase Equilibria**, v.70, n.2-3, p.251-265, 1991.
- INOMATA, H., KONDO, A., KAKEHASHI, H. Vapor-liquid equilibria for CO₂-fermentation alcohol mixtures application of a new group contribution equation of state to isomeric compounds. **Fluid Phase Equilibria**, v. 228-229, p. 335-343, 2005.
- JAFARI NEJAD, SH., ABOLGHASEMI, H., MOOSAVIAN, M.A., MARAGHEH, M.G. Prediction of solute solubility in supercritical carbon dioxide: A novel semi-empirical model. **Chemical Engineering Research and Design**, DOI: 10.1016/j.cherd.2009.12.006, 2010.
- JOBACK K.G., REID R.C. Estimation of pure-component properties from group-contributions, **Chemical Engineering Communications**, v.57, n.1-6, p.233-243, 1987.
- JOUYBAN, A., CHAN, H.K., FOSTER N.R. Mathematical representation of solute solubility in supercritical carbon dioxide using empirical expressions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.24, p.19–35, 2002.
- KOHNO, Y., EGAWA, Y., ITOH, S. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1256 ,n.1, p.52–56, 1995.
- KUMAR, S.K., JOHNSTON K.P. Modeling the solubility of solids in supercritical fluids with density as the independent variable. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.1, n.1, p. 15–22, 1988.
- LEE, Y.W., LEE, Y.Y. Flavor and aroma substances. In: TZIA, C E LIADAKIS, G. **Extraction Optimization In Food Engineering**, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.
- LYDERSEN A.L. Estimation of Critical properties of organic compounds, University of Wisconsin College Engineering, **Eng. Exp. Stn. Rep.** 3, Madison, Wisconsin, 1955
- MARTIN, A., COCERO, M. J. Mathematical modeling of the fractionation of liquids with supercritical CO₂ in a countercurrent packed column. **The Journal Of Supercritical Fluids**, v.39, p.304-314, 2007.
- MATTEA, F., MARTIN, A., COCERO, M.J. Study of a predictive model based on group-contribution equation of state, applied to the solubility of carotenoids in supercritical CO₂. Proceedings I Iberoamerican Conference On Supercritical Fluids (PROSCIBA), Iguassu falls, april 10th to 13th, 2007.
- MÉNDEZ-SANTIAGO, J., TEJA, A.S., Solubility of solids in supercritical fluids: consistency of data and a new model for cosolvent systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.39, n.12, p.4767–4771, 2000.

- NEWMARK, H.L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis, **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.6, p.1101, 1997.
- PENG, D.Y., ROBINSON, D. B. A new two-constant equation of state. **Ind. Chem. Fundam**, 15, 59-64, 1976.
- PFOHL, O., PETKOV, S., BRUNNER, G. PE quickly makes available the newest equations of state via the internet, **Ind. Eng. Chem. Res.** v.39, n.11, p.4439-4440, 2000.
- RAO, C. V., NEWMARK, H. L., REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v.19, n.2, 287-290, 1998
- RUIVO, R.M., PAIVA, A., SIMÕES, P.C. Phase equilibria of the ternary system methyl oleate/squalene/carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.29, p.79-85, 2004.
- SHI, J., KASSAMA L.S., KAKUDA, Y. In: **Functional Food Ingredients And Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. Shi, J. Taylor And Francis, Crc Press , Boca Raton, USA, p. 371, 2007.
- SKJOLD-JØRGENSEN, S. Gas solubility calculations II. Application of a new group Contribution Equation of State. **Fluid phase equilibria**, v.27, p.317-351, 1984.
- SKJOLD-JØRGENSEN, S. group contribution equation of state (GC-EOS): a predictive method for phase equilibrium computations over wide ranges of temperature and pressure up to 30 MPa. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.27, p.110-118, 1988.
- SMITH, T, J. Squalene: potential chemoprotective agent. **Expert opinion on investigational drugs**, v.9, n.8, p.1841-1848, 2000
- SOARES, B. M. C. ; GAMARRA, F. M. C. ; PAVIANI, L. C. ; GONCALVES, L. A. G. ; CABRAL, F. A. . Solubility of Triacylglycerols in Supercritical Carbon Dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 25-31, 2007.
- SOMAYAJULU G.R. Estimation procedures of critical constants. **Journal of Chemical and Engineering Data** ,v.34, p.106-120, 1989
- SONG, Y., LAMBERT, M., PRAUSNITZ J.M. A perturbed hard sphere chain equation of state for normal fluids and polymers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.33, n.4, p.1047-1017, 1994.
- SPAN, R., WAGNER, W. A new equation of state for carbon dioxide covering the fluid region from the triple point temperature to 1100 K at pressures up to 800 MPa. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, 25, 1509, 1996.
- TABERNERO, A., DEL VALLE, E.M., GALAN, M.A. A comparison between semiempirical equations to predict the solubility of pharmaceutical compounds in supercritical carbon dioxide, **The Journal of Supercritical Fluids**, v.52, n.2, p.161-174, 2010.
- TAMOUZA, S., PASSARELLO, J. P., TOBALY, P. DE HEMPTINNE, J. C. Application to binary mixtures of a group contribution SAFT EOS (GC-SAFT). **Fluid Phase Equilibria**. v.228-229 , p. 409-419, 2005.

- VASCONCELLOS, V. R., CABRAL, FERNANDO A. . A new method for estimating solubility of fatty acids, esters, and triglycerides in supercritical carbon dioxide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Estados Unidos, v. 78, p. 827-829, 2001.
- VÁZQUEZ, L., TORRE, C. F., FORNARI, T., SENÓRANS, F. J., REGLERO, G. Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, 40, 59-66, 2007.
- WAKEHAM, W.A., CHOLAKOV, G.S., STATEVA, R. Liquid density and critical properties of hydrocarbons estimated from molecular structure. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.47, p.559-570, 2002
- WONG, D.S.H., SANDLER, S.I. A theoretically correct mixing rule for cubic equations of state, **AIChE J.** v.38, p.671-680, 1992
- YU, Z., SINGH, B., RIZVI, S.S.H., ZOLLEWIG J.A. Solubilities of fatty acids, fatty acid esters, and fats and oils in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.7, n.1, p. 51–61, 1994.
- YUN, S. L. J., LIONG, K. K., GURDIAL, G. S., FOSTER, N. R. Solubility of cholesterol in supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.30, n.11, p.2476-2482, 1991.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A combinação de processos demonstrou ser uma estratégia eficiente para a obtenção de extratos diferenciados na composição química e funcionalidade. Nesse sentido as influências da extração supercrítica na primeira etapa e da natureza do solvente empregado na segunda etapa forneceram extratos distintos com características próprias, de rendimentos e de composição química.

Nas amostras de *B. dracunculifolia* compreendida por folhas totalmente desenvolvidas (AM1) e folhas mais jovens (AM2), foi possível obter extratos com alta concentração de compostos fenólicos totais (FT) quando o etanol é empregado tanto no processo em etapa única (E) quanto no processo de duas etapas (SCE). Aconteceu o mesmo com compostos da família dos flavonóides quando água é empregada como solvente. O ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C) conhecido pelas suas propriedades funcionais, foi mais eficientemente extraído com CO₂ supercrítico (SC), pois se obtiveram extratos mais concentrados e com rendimentos da ordem de 1,75 e 2,6 vezes maiores que o rendimento com etanol (E), para as amostras AM1 e AM2, respectivamente. A diferença no estado de maturidade das duas amostras explica diferenças entre os conteúdos dos compostos bioativos analisados.

Quanto à *E. uniflora*, evidenciaram-se efeitos positivos da extração prévia com CO₂ supercrítico em processos em duas etapas (SCA, SCE), pois estes foram mais eficientes que processos em etapa única (A, E). Assim, dependendo do objetivo do processo pode-se empregar etanol na 2ª etapa para se obter extratos concentrados em compostos polifenólicos, ou então água para se obter o máximo de rendimento na extração destes compostos.

No caso da extração de compostos fenólicos da *C. longa* é mais adequado o uso do etanol em etapa única (E) se o objetivo for obter extratos com alta concentração e rendimento de compostos fenólicos. Quando o alvo do processo for a extração de curcumina, a extração prévia com CO₂ supercrítico produz efeito positivo na concentração e rendimento da curcumina no extrato etanólico da etapa posterior, deste modo o extrato resultante da primeira etapa (SC) contém 5,3 % de curcumina, e o extrato proveniente da segunda etapa contém 56,5% de curcumina. Com este processo foi possível obter extratos etanólicos 1,6 vezes mais concentrado em curcumina quando comparado com o processo em etapa única (E).

Quanto a *A. annua*, o processo em duas etapas com a primeira extração com CO₂ supercrítico, seguido da extração da matriz residual com etanol (SCE) produz extratos 1,8 a 2 vezes mais concentrados em substâncias polifenólicas (fenóis totais e flavonóides totais, respectivamente), quando comparado com processo em etapa única (E), no entanto, a extração de artemisinina só ocorreu na primeira etapa do processo de extração com CO₂ supercrítico. A extração usando etanol como solvente em etapa única foi equivalente à extração supercrítica quanto ao rendimento e concentração de artemisinina. A ausência da artemisinina nos extratos aquosos permitiu confirmar a baixa solubilidade desta substância neste solvente.

Quanto a *B. pilosa*, a extração prévia com CO₂ supercrítico em processos de duas etapas teve efeito positivo no processo, quando empregado água como solvente, produzindo extratos com alto conteúdo de flavonóides.

A atividade antioxidante (AA) como propriedade funcional foi analisada para alguns dos extratos obtidos, por meio de dois métodos que atuam por mecanismos diferentes: método de inibição do radical DPPH (método do DPPH) e o método de descoloração de β -caroteno (método DBC). A partir dos resultados

obtidos observa-se que a AA mostrou ser dependente do solvente e do processo de extração empregado. Os dois métodos apresentam resultados coincidentes na avaliação dos extratos etanólicos (E, SCE), com respostas elevadas de atividade antioxidante para extratos de *B. dracunculifolia*, *E. uniflora* e *C. longa*. No caso de extratos aquosos (A, SCA) a atividade antioxidante avaliada com o método do DPPH foi superior à obtida no método do DBC. Este resultado pode ser explicado em função de fenômenos como: Partição dos compostos antioxidantes nas fases da emulsão gerada no teste do DBC, e existência de interações antagônicas ou sinérgicas entre compostos presentes nos extratos.

Outra propriedade funcional medida foi a atividade antiplasmódica em teste *in vitro* nos extratos da *B. pilosa*. Os resultados indicaram que a extração prévia com scCO₂ melhorou a atividade antiplasmódica quando empregado etanol como solvente na segunda etapa de extração (extrato SCE). Também observou-se que os extratos etanólicos (E, SCE) foram mais ativos do que os extratos aquosos (A, SCA).

Dados de solubilidade em scCO₂ de diferentes sistemas que incluem biomoléculas (artemisinina, esqualeno) foram medidos experimentalmente (esqualeno) e modelados termodinamicamente. Equações de estado cúbicas, de contribuição por grupos e correlações empíricas foram empregadas na modelagem. A equação de Peng Robinson apresentou melhor desempenho na modelagem dos sistemas estudados, no entanto, a equação GC EOS apresenta limitações na descrição do comportamento experimental da solubilidade destes sistemas. Equações empíricas como a de Chrastil, de Jouyban e de Kumar-Jhonston, apresentaram alta capacidade de correlação do comportamento experimental.

7. APÊNDICES

- APÊNDICE A:** Análise granulométrica diferencial das matrizes vegetais.
- APÊNDICE B:** Curva padrão para determinação de fenóis totais e flavonóides totais.
- APÊNDICE C:** Dados experimentais obtidos das extrações supercríticas.
- APÊNDICE D:** Cromatogramas dos extratos de *b.dracunculifolia*, *A.annua* e *C. longa*.
- APÊNDICE E:** Cromatogramas da fração volátil s extratos de *b.dracunculifolia*, *E.uniflora*, *A.annua* e *C. longa*.
- APÊNDICE F:** Dados experimentais de atividade antioxidante no teste do DPPH.
- APÊNDICE G:** Fotografias das matrizes vegetais e extratos obtidos.

APÊNDICE A

Figura A.1. Análise granulométrica diferencial das matrizes vegetais

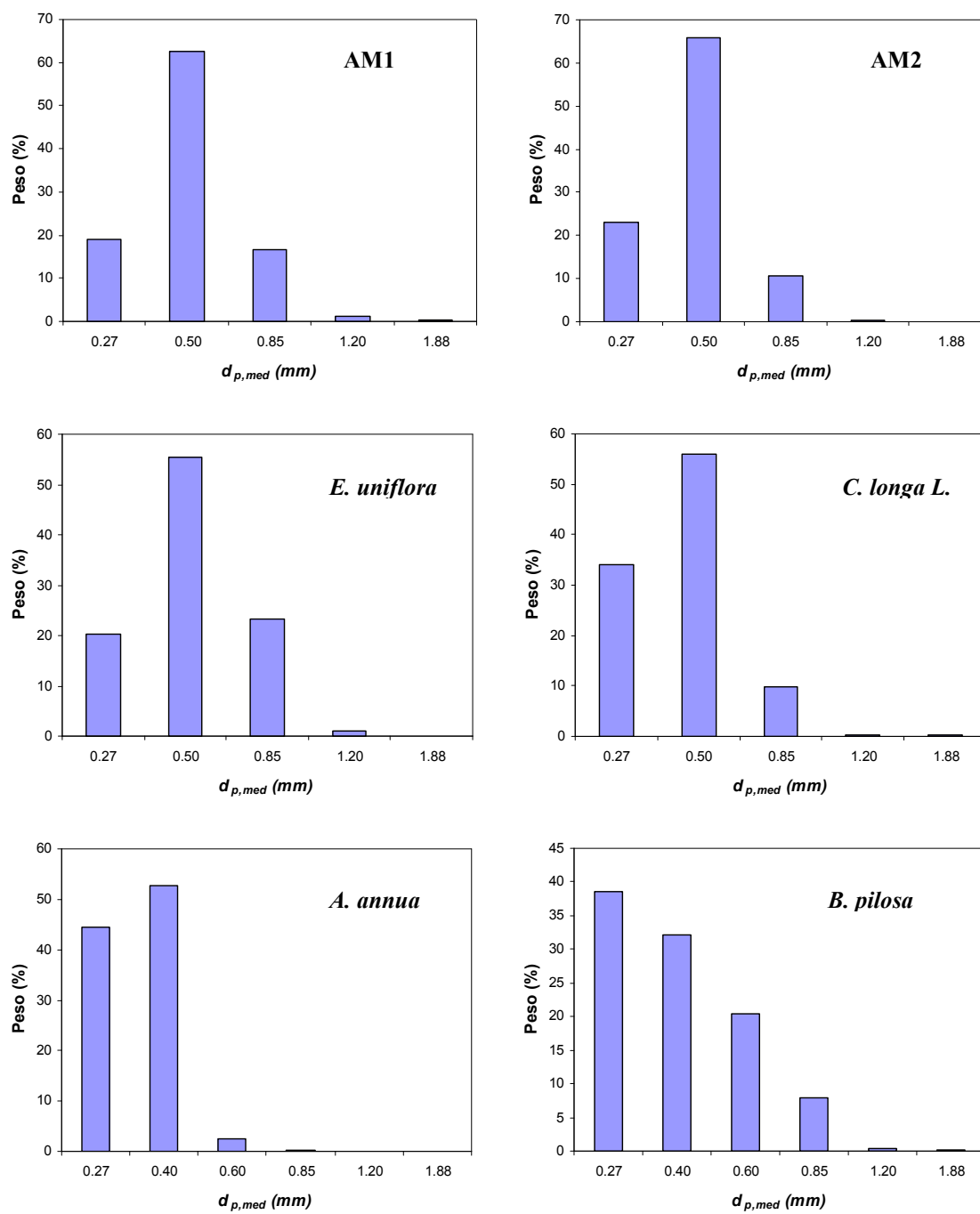


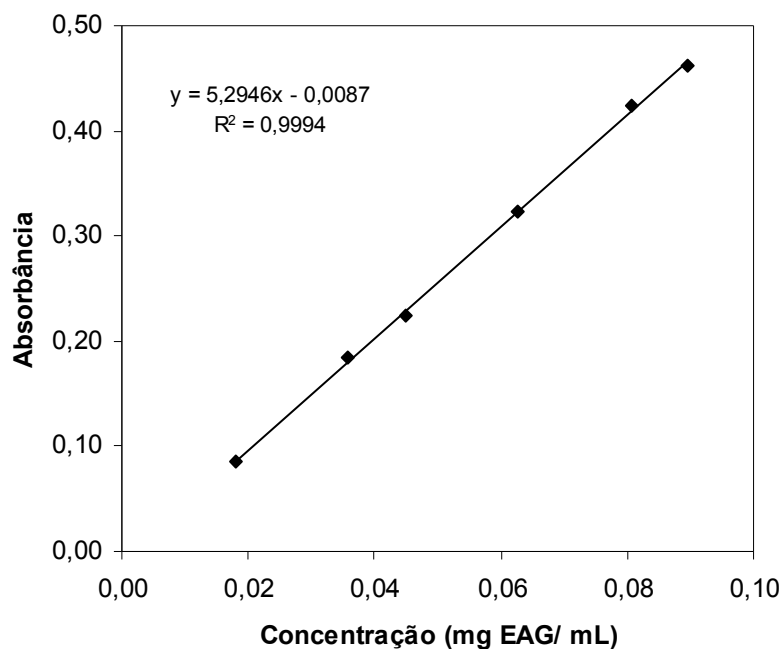
Tabela A.1. Análise granulométrica das matrizes vegetais

PENEIRA		% Retido			Peneira	% Retido	
(Tyler)	AM1	AM2	<i>E. uniflora</i>	<i>C. longa</i>		<i>A. annua</i>	<i>B. pilosa</i>
8	0,30	0,00	0,00	0,09	8	0,00	0,33
12	0,25	0,01	0,01	0,14	12	0,00	0,13
16	1,18	0,27	0,92	0,20	16	0,00	0,39
24	16,65	10,68	23,27	9,77	24	0,25	8,02
48	62,56	65,89	55,47	55,88	32	2,61	20,42
60	19,06	23,15	20,34	33,92	48	52,63	32,12
					60	44,52	38,58

APÊNDICE B

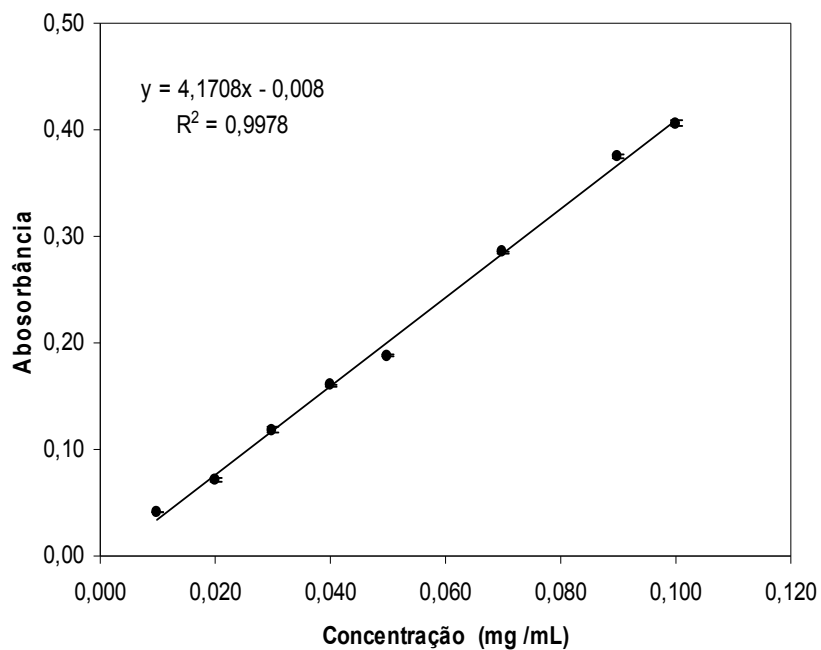
CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Curva padrão de ácido gálico



Codigo sol	Conc diluição (mg/mL)	Absorbância	Média	DP
S1	0,018	0,0878	0,0865	0,0012
		0,0863		
		0,0854		
S2	0,036	0,1840	0,1837	0,0004
		0,1837		
		0,1833		
S3	0,045	0,2249	0,2241	0,0007
		0,2235		
		0,2239		
S4	0,063	0,3242	0,3231	0,0011
		0,3231		
		0,3220		
S5	0,081	0,4368	0,4232	0,0118
		0,4164		
		0,4163		
S6	0,090	0,4630	0,4626	0,0005
		0,4627		
		0,4621		

Curva padrão de catequina



Codigo sol	Conc diluição (mg/mL)	Absorbância	Média	DP
S1	0,010	0,0410	0,0403	0,0012
		0,0410		
		0,0390		
S2	0,020	0,0730	0,0717	0,0023
		0,0730		
		0,0690		
S3	0,030	0,1180	0,1187	0,0006
		0,1190		
		0,1190		
S4	0,040	0,1600	0,1603	0,0006
		0,1600		
		0,1610		
S5	0,050	0,1880	0,1883	0,0006
		0,1880		
		0,1890		
S6	0,070	0,2870	0,2850	0,0020
		0,2830		
		0,2850		
S7	0,090	0,3750	0,3757	0,0021
		0,3740		
		0,3780		
S8	0,100	0,4060	0,4060	0,0030
		0,4030		
		0,4090		

APÊNDICE C

DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DAS EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS

C.1. Dados da extração supercrítica da *B. dracunculifolia* (amostra 1) a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.1.1. Corrida 1 (massa amostra: 7,0743 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0	0	0	0
30	0,2772	0,2772	77,376	3,918
60	0,0972	0,3744	156,399	5,292
90	0,042	0,4164	235,421	5,886
120	0,0312	0,4476	312,797	6,327
180	0,0516	0,4992	465,903	7,057
240	0,029	0,5282	605,839	7,466
300	0,0133	0,5415	754,006	7,654
360	0,0226	0,5641	905,466	7,974
Limpeza e despressurização	0.0085	0,5726		8,094

Tabela C.1.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0271 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0	0	0	0
30	0,278	0,278	85,608	3,95
60	0,076	0,354	166,276	5,032
90	0,045	0,398	245,299	5,667
120	0,025	0,423	322,675	6,018
180	0,04	0,463	472,489	6,589
240	0,035	0,499	602,546	7,094
300	0,016	0,514	694,739	7,316
360	0,018	0,532	793,517	7,574
Limpeza e despressurização	0.0021	0,5343		7,603

Tabela C.1.3. Corrida 3 (massa amostra: 7,0868 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,282	0,282	83,582	3,979
60	0,079	0,361	158,97	5,091
90	0,032	0,393	231,081	5,55
120	0,025	0,418	308,108	5,9
180	0,026	0,444	455,606	6,271
240	0,009	0,454	598,188	6,401
300	0,015	0,469	696,52	6,618
360	0,012	0,481	804,685	6,782
Limpeza e despressurização	0.004	0,485		6,839

C.2. Dados da extração supercrítica da extração supercrítica da *B. dracunculifolia* (mostra 2) a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.2.1. Corrida 1 (massa amostra: 7,0774 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,231	0,231	75,745	3,258
60	0,093	0,323	149,844	4,567
90	0,052	0,375	225,589	5,297
120	0,038	0,413	298,041	5,835
180	0,051	0,464	451,178	6,559
240	0,034	0,498	599,376	7,041
300	0,016	0,514	747,573	7,268
360	0,031	0,545	900,710	7,699
Limpeza e despressurização	0.0028	0,5477		7,739

Tabela C.2.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0694 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,239	0,239	50,987	3,385
60	0,121	0,360	148,026	5,095
90	0,034	0,394	220,394	5,570
120	0,029	0,423	294,408	5,986
180	0,039	0,462	440,789	6,542
240	0,025	0,488	587,170	6,899
300	0,018	0,506	735,197	7,159
360	0,012	0,518	883,223	7,323
Limpeza e despressurização	0.0042	0,5219		7,383

Tabela C.2.3. Corrida 3 (massa amostra: 7,0557 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,278	0,278	81,270	3,931
60	0,082	0,360	160,882	5,088
90	0,045	0,405	232,201	5,728
120	0,029	0,435	303,519	6,139
180	0,034	0,468	449,474	6,614
240	0,022	0,490	598,746	6,925
300	0,017	0,508	744,701	7,172
360	0,008	0,515	893,973	7,282
Limpeza e despressurização	0,0001	0,515		7,284

C.3. Dados da extração supercrítica da extração supercrítica da *E. uniflora* a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.3.1. Corrida 1 (massa amostra: 7,0606 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,1447	0,1447	36,374	2,049
30	0,0224	0,1671	69,441	2,367
45	0,0101	0,1772	104,162	2,510
60	0,0080	0,1852	142,189	2,623
90	0,0096	0,1948	214,937	2,759
120	0,0070	0,2018	286,859	2,858
180	0,0037	0,2055	434,835	2,911
240	0,0074	0,2129	581,157	3,015
300	0,0050	0,2179	728,307	3,086
360	0,0006	0,2185	872,976	3,095
Limpeza e despressurização	0,0000			

Tabela C.3.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0461 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,145	0,145	38,796	2,046
30	0,015	0,160	77,592	2,258
45	0,018	0,178	112,260	2,516
60	0,008	0,186	146,104	2,626
90	0,008	0,194	212,139	2,745
120	0,002	0,196	282,302	2,777
180	0,008	0,204	396,213	2,886
240	0,004	0,208	543,142	2,949
300	0,002	0,210	693,373	2,977
360	0,006	0,216	846,905	3,059
Limpeza e despressurização	0,009	0,217		3,072

Tabela C.3.3. Corrida 3 (massa amostra: 7,0678 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
360	0,229	0,229	883,412	3,245
Limpeza e despressurização	0,000			

C.4. Dados da extração supercrítica da extração supercrítica da *C. longa* a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.4.1. Corrida 1(massa amostra: 7,0008 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,249	0,249	68,252	3,508
60	0,020	0,269	140,213	3,796
90	0,005	0,274	214,829	3,865
120	0,008	0,282	290,265	3,982
180	0,005	0,287	437,857	4,048
240	0,003	0,290	585,450	4,089
300	0,002	0,292	738,782	4,116
360	0,002	0,294	885,554	4,147
Limpeza e despressurização	0,001	0,296		5,273

Tabela C.4.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0305 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,301	0,301	35,896	4,284
30	0,027	0,328	64,279	4,663
45	0,004	0,332	109,358	4,722
60	0,007	0,339	154,436	4,823
90	0,006	0,345	226,228	4,907
120	0,008	0,352	300,525	5,014
180	0,010	0,362	453,292	5,149
240	0,006	0,368	606,059	5,233
300	0,003	0,371	757,991	5,274
360	0,002	0,373	908,253	5,307
Limpeza e despressurização	0,000			

Tabela C.4.3. Corrida 3 (massa amostra: 7,0272 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
360	0,389	0,229	903,554	5,533
Limpeza e despressurização	0,000			

C.5. Dados da extração supercrítica da extração supercrítica da *A. annua* a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.5.1. Corrida 1 (massa amostra: 7,0258 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,192	0,192	39,206	2,731
30	0,065	0,257	76,744	3,655
45	0,014	0,271	113,448	3,853
60	0,025	0,295	149,318	4,203
90	0,013	0,309	225,228	4,392
120	0,013	0,322	300,304	4,577
180	0,014	0,336	454,627	4,781
240	0,013	0,349	603,111	4,960
300	0,016	0,364	751,595	5,185
360	0,003	0,368	904,250	5,231
Limpeza e despressurização	0,005	0,373		5,305

Tabela C.5.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0759 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,198	0,198	34,845	2,797
30	0,061	0,259	77,157	3,655
45	0,023	0,281	119,469	3,975
60	0,006	0,287	159,291	4,057
90	0,020	0,307	235,619	4,343
120	0,014	0,322	310,286	4,548
180	0,022	0,343	452,155	4,878
240	0,008	0,352	594,854	4,968
300	0,008	0,359	745,019	5,074
360	0,000	0,359	900,992	5,078
Limpeza e despressurização	0,006	0,366		5,171

Tabela C.5.3. Corrida 3(massa amostra: 7,0419 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
360	0,363	0,363	897,955	5,159
Limpeza e despressurização	0,016	0,379		5,371

C.6. Dados da extração supercrítica da extração supercrítica da *B. pilosa* a 400 bar e 60 °C.

Tabela C.6.1. Corrida 1 (massa amostra: 7,0396 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,025	0,025	31,605	0,360
30	0,011	0,037	78,180	0,521
45	0,007	0,043	118,102	0,619
60	0,004	0,047	152,202	0,675
90	0,004	0,052	223,728	0,736
120	0,003	0,055	297,750	0,781
180	0,002	0,057	448,289	0,817
240	0,004	0,062	597,995	0,877
300	0,003	0,064	756,851	0,918
360	0,004	0,069	896,577	0,979
Limpeza e despressurização	0,006	0,074		1,058

Tabela C.6.2. Corrida 2 (massa amostra: 7,0286 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO ₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,020	0,020	26,645	0,285
30	0,018	0,038	69,943	0,537
45	0,008	0,046	109,910	0,656
60	0,002	0,048	149,878	0,681
90	0,003	0,052	228,147	0,729
120	0,001	0,052	298,090	0,741
180	0,003	0,056	449,633	0,793
240	0,006	0,062	598,678	0,875
300	0,006	0,068	753,552	0,958
360	0,001	0,069	913,101	0,977
Limpeza e despressurização	0,000	0,069		0,979

Tabela C.6.3. Corrida 3 (massa amostra: 7,0251 g)

Tempo	Massa extrato	Massa acumulada do extrato	Massa CO₂	Rend
(min)	(g)	(g)	(g)	(%)
0	0,000	0,000	0,000	0,000
360	0,043	0,043	901,372	0,611
Limpeza e despressurização	0,002	0,045		0,988

APÊNDICE D

CROMATOGRAMAS PARA EXTRATOS DA *B. DRACUCULIFOLIA*, *ARTEMISIA ANNUA* E *CURUMA LONGA* L

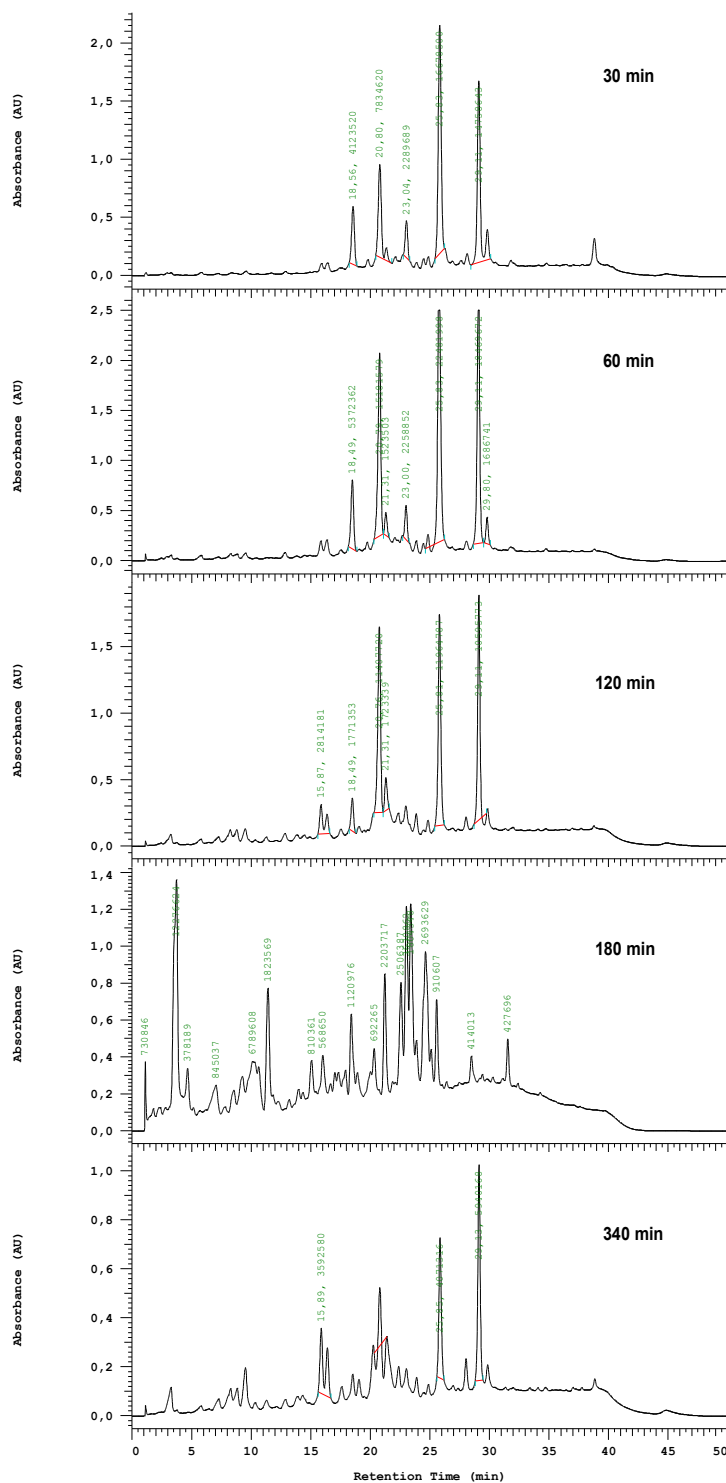


Figura D.1. Cromatograma de cinco amostras obtidas durante a extração supercrítica da amostra AM1.

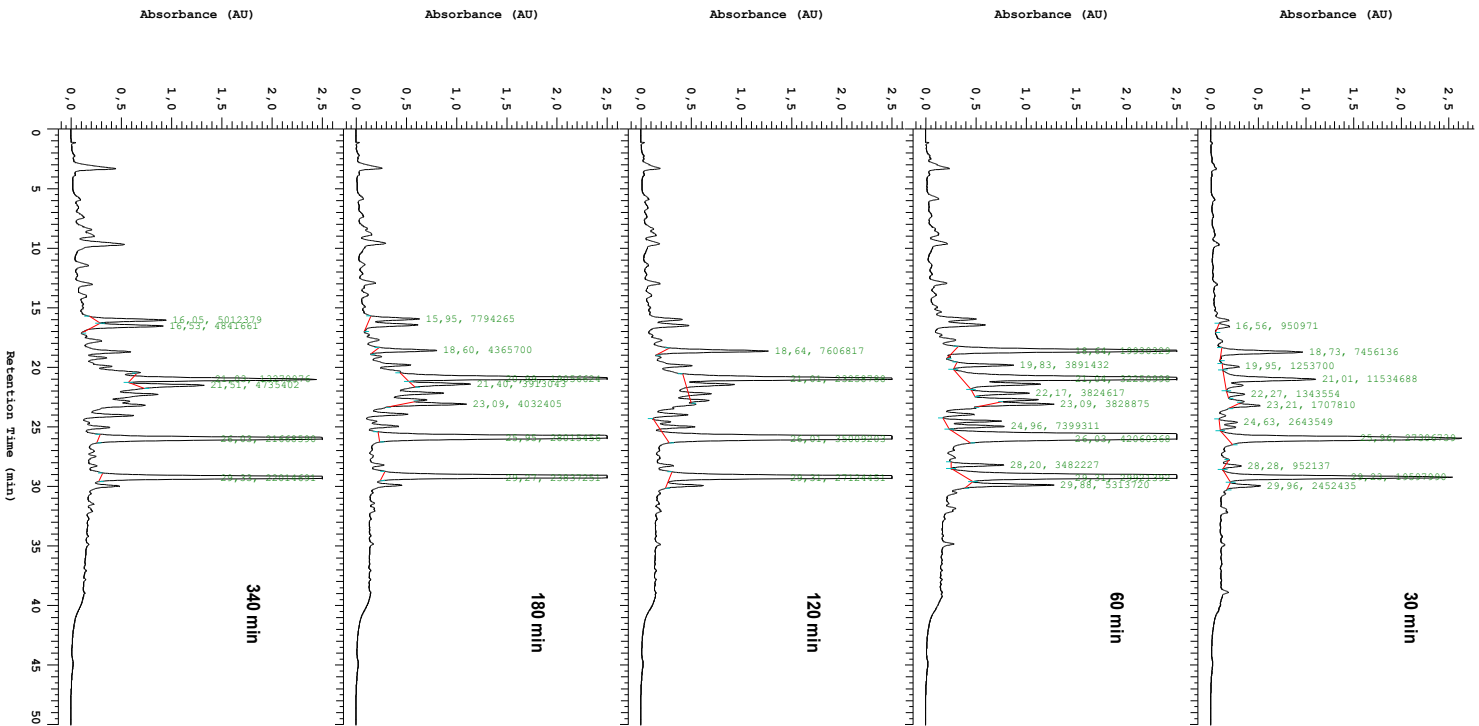


Figura D.2. Cromatograma de cinco amostras obtidas durante a extração supercrítica da amostra AM2.

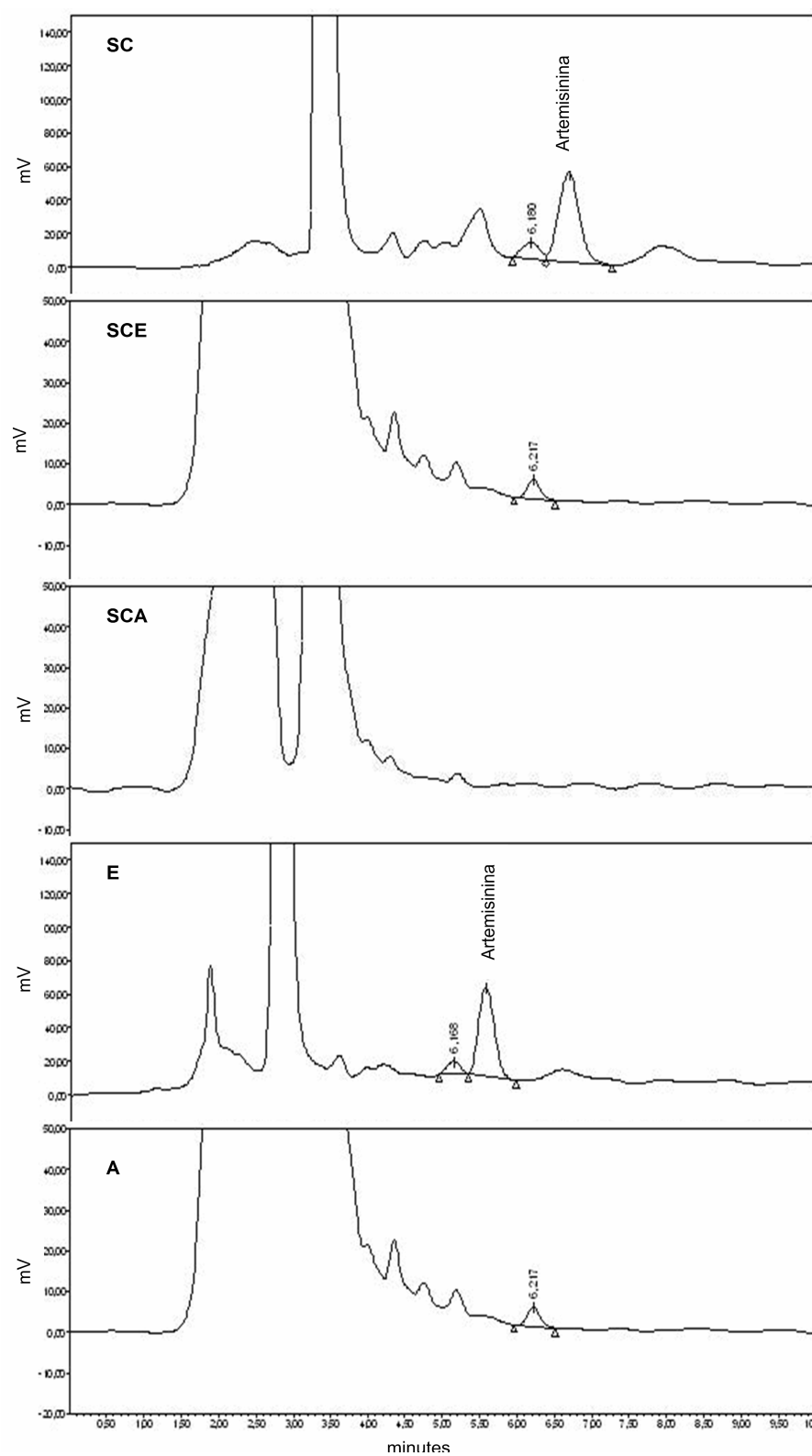


Figura D.3. Cromatograma dos extratos de *A. annua* para determinação de artemisinina.

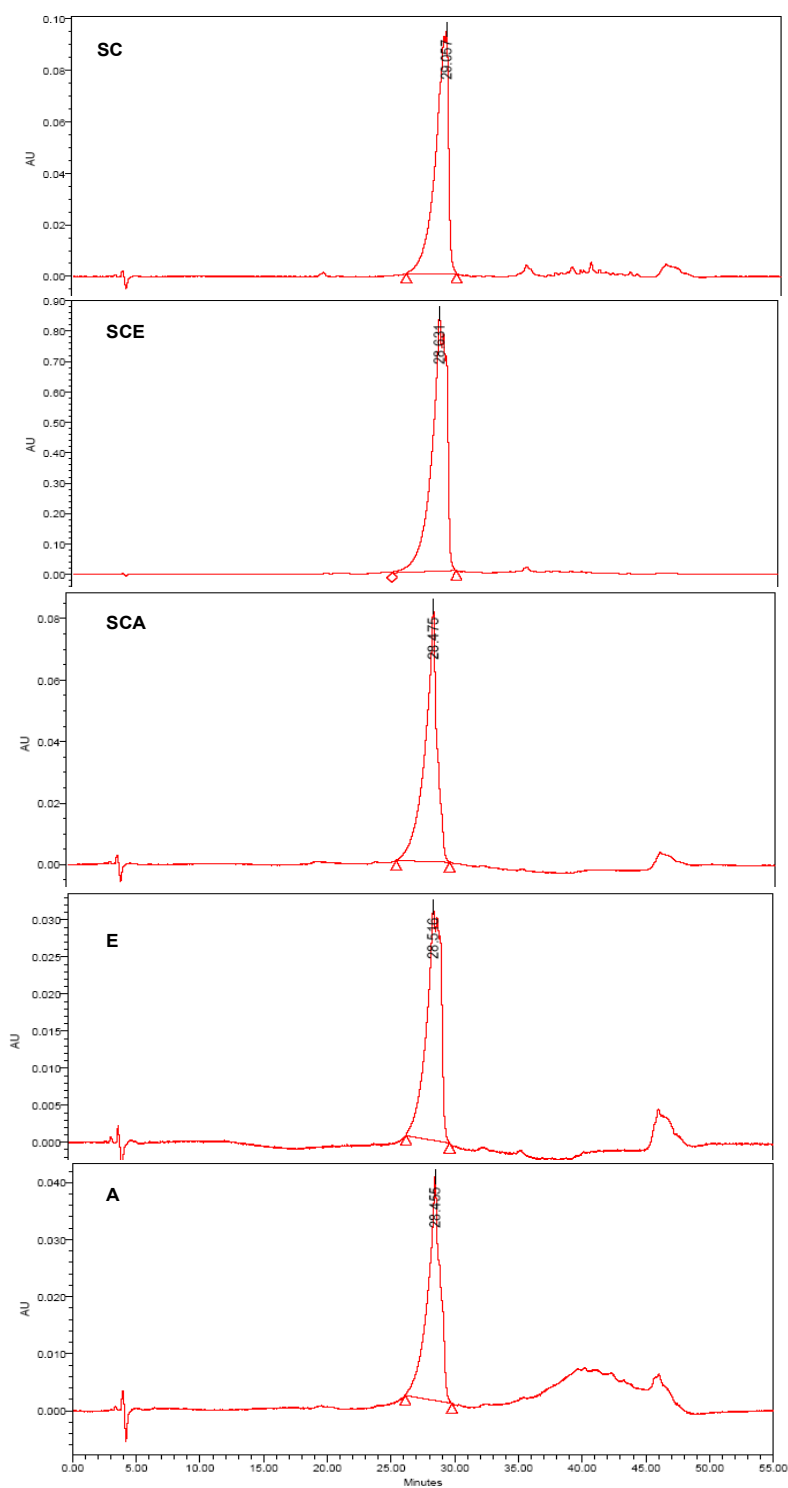


Figura D.4 Cromatograma dos extratos de *C. longa* L. para determinação de curcumina.

APÊNDICE E

CROMATOGRAMAS DA FRAÇÃO VOLÁTIL CAPTURADA NO PORAPACK-Q

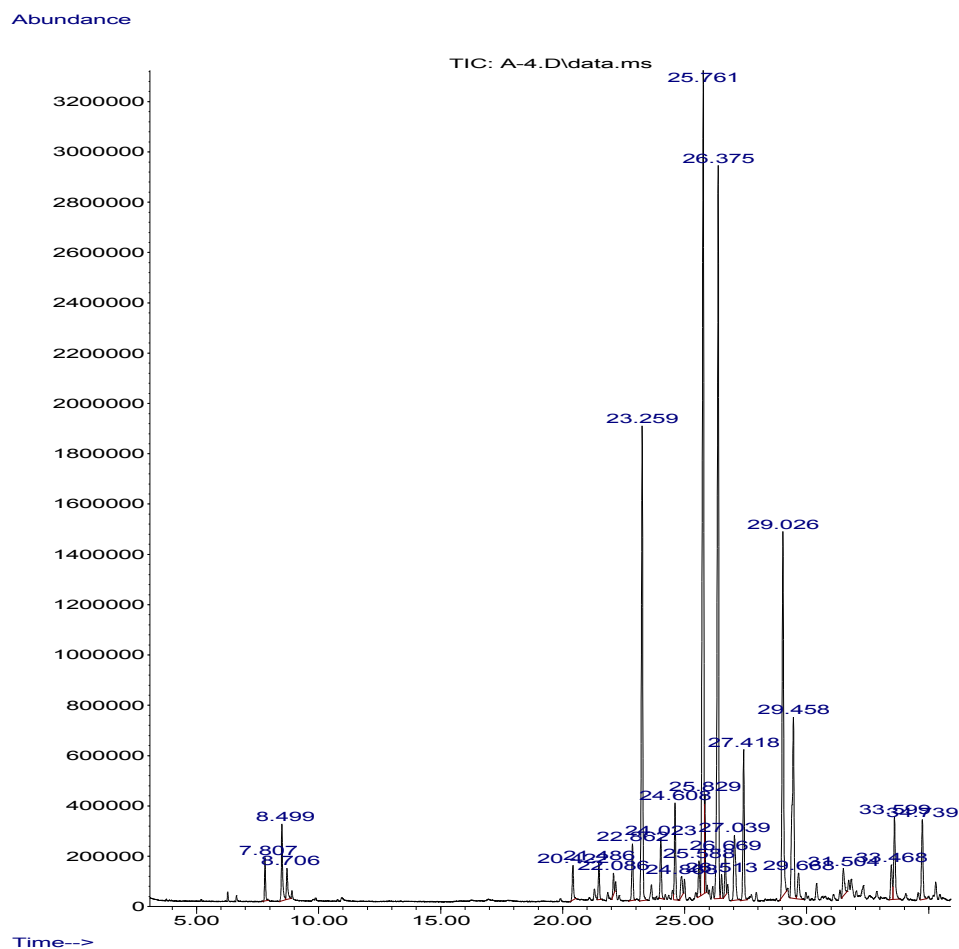


Figura E.1. Cromatograma da fração volátil de *B. dracunculifolia* (AM1).

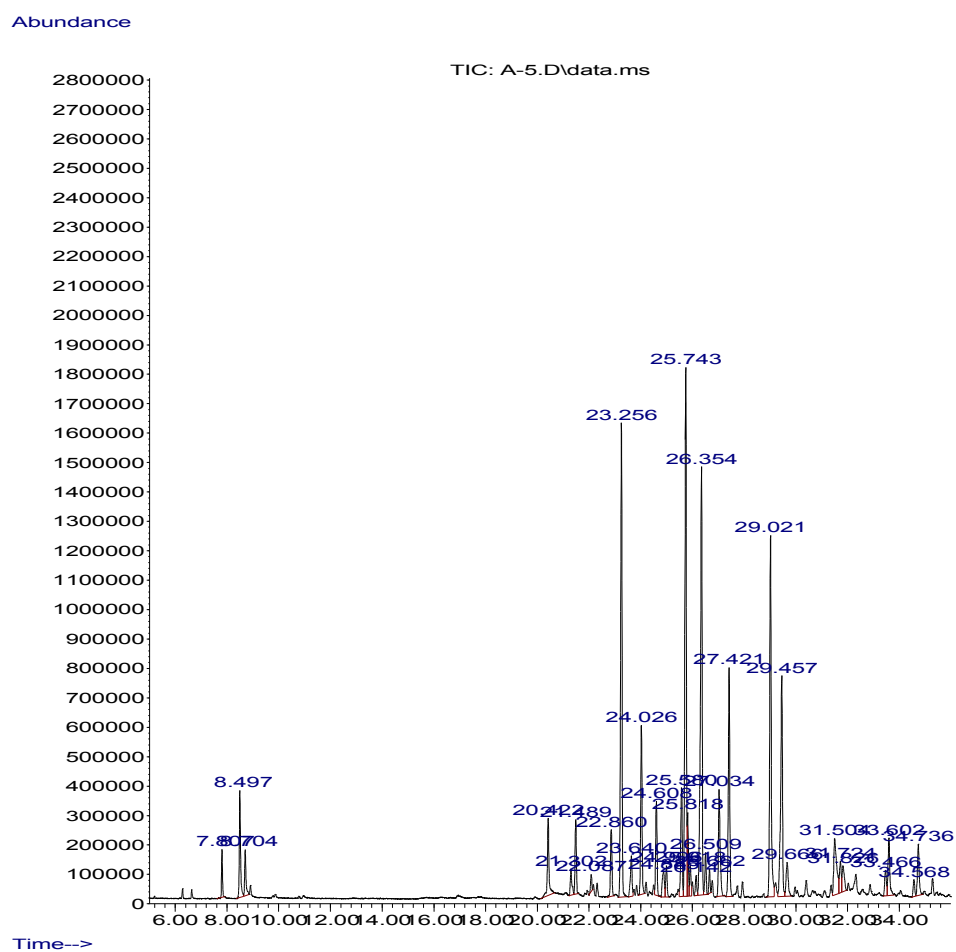


Figura E.2. Cromatograma da fração volátil de *B. dracunculifolia* (AM2).

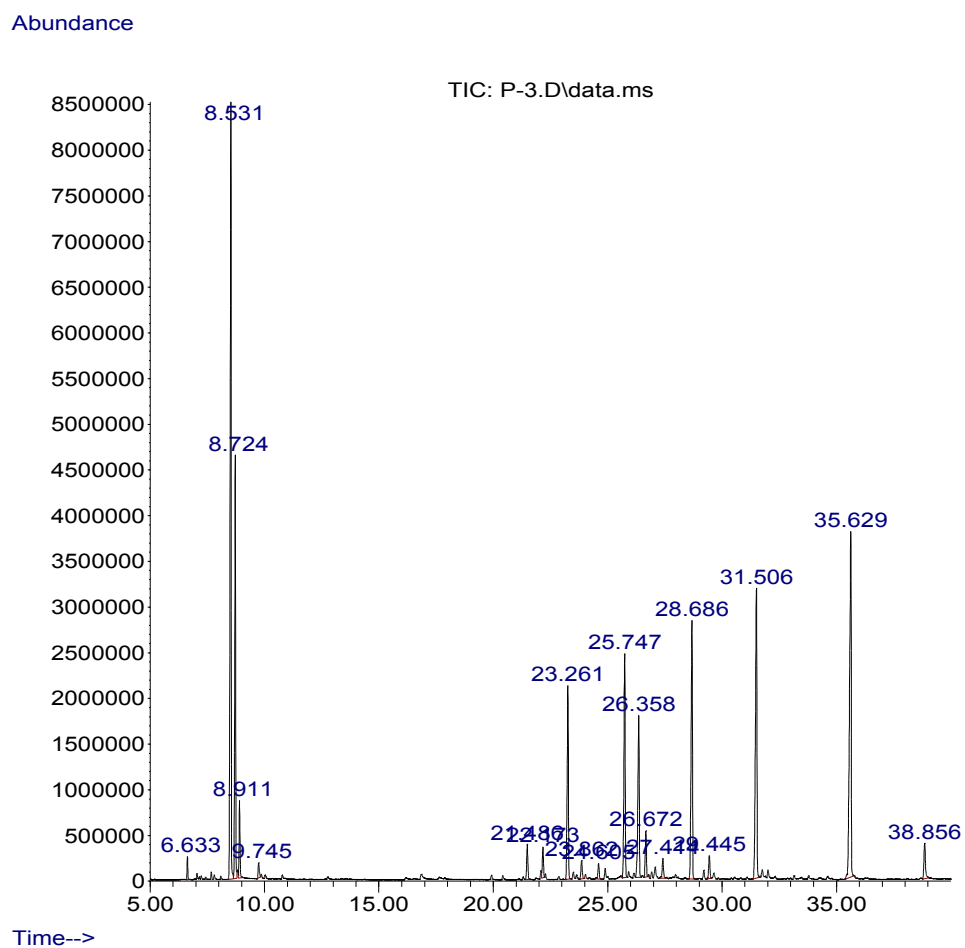
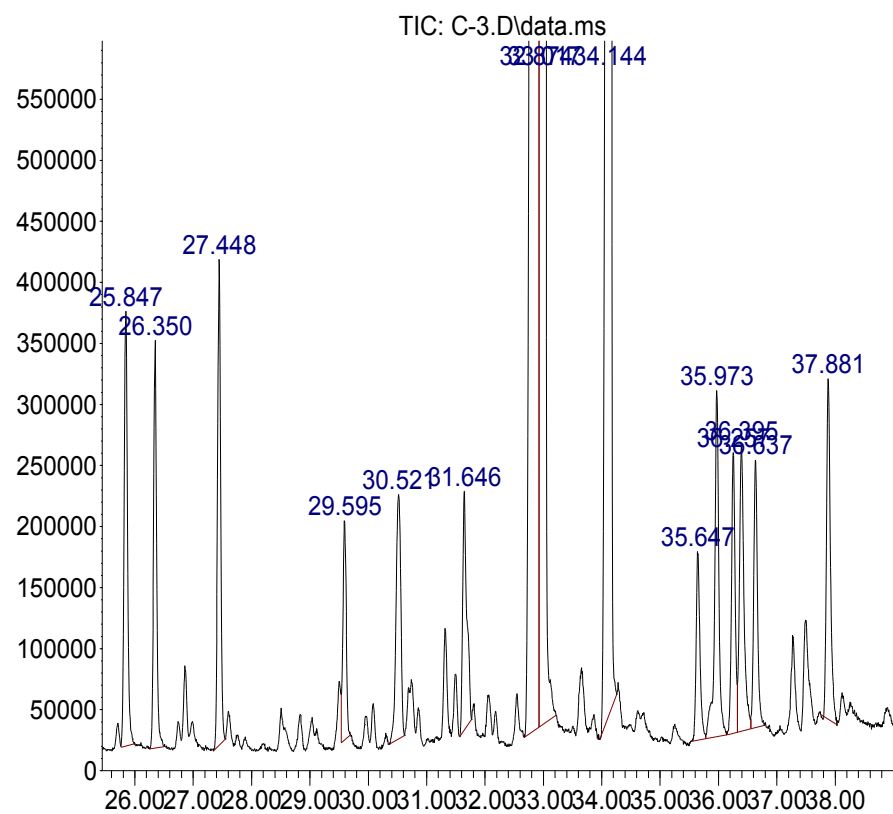


Figura E.3. Cromatograma da fração volátil de *E. uniflora*.

Abundance



Time-->

Figura E.4. Cromatograma da fração volátil de *C. longa*.

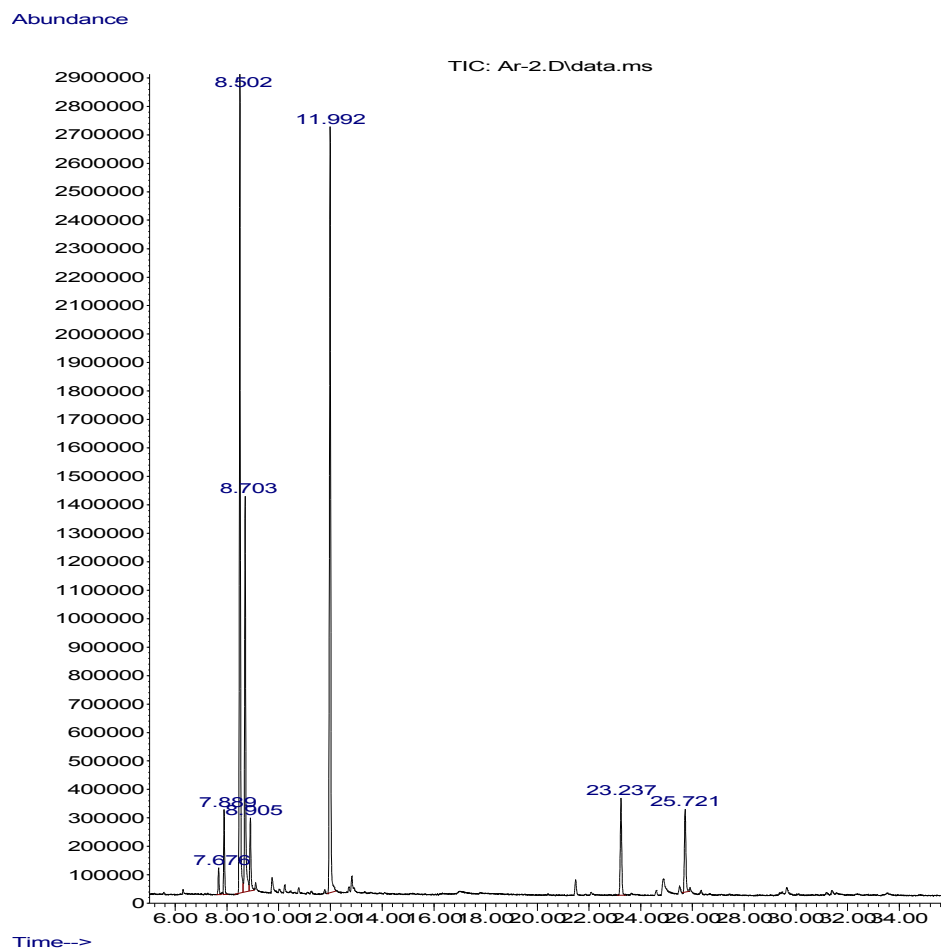


Figura E.5. Cromatograma da fração volátil de *A. annua*.

APÊNDICE E

DADOS EXPERIMENTAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO TESTE DO DPPH

Tabela E.1. Atividade antioxidante (AA, %) dos diferentes extratos

<i>B. dracunculifolia</i> (AM1)					
Concentração (µg/mL)	AA(%)				
	SC	E	A	SCE	SCA
5	0,51 ± 0,41	6,73 ± 3,03		6,87 ± 3,96	6,87 ± 0,47
10	1,65 ± 0,0	10,67 ± 3,95	2,26 ± 0,52	10,07 ± 0,29	12,47 ± 0,43
25	5,92 ± 0,67	29,96 ± 0,07	6,50 ± 0,71	23,86 ± 2,66	26,18 ± 0,88
50	10,6 ± 0,93	46,46 ± 2,11	15,89 ± 0,28	43,49 ± 0,94	42,63 ± 0,22
125	27,26 ± 0,31	88,48 ± 1,34	40,32 ± 0,60	79,86 ± 1,73	87,63 ± 1,01
250	49,23 ± 0,15	93,47 ± 0,21	77,15 ± 2,18	92,22 ± 0,65	92,78 ± 1,39
<i>B. dracunculifolia</i> (AM2)					
Concentração (µg/mL)	AA(%)				
	SC	E	A	SCE	SCA
5	2,32 ± 2,21	10,03 ± 0,68	2,97 ± 1,70	8,29 ± 1,14	1,53 ± 0,99
10	5,59 ± 3,09	19,37 ± 1,35	4,47 ± 1,30	19,67 ± 1,36	3,89 ± 2,18
25	15,75 ± 2,77	38,23 ± 1,07		37,26 ± 2,36	9,55 ± 1,94
50	31,12 ± 2,24	58,77 ± 2,15	12,43 ± 0,76	61,88 ± 1,57	17,10 ± 0,95
125	64,0 ± 1,34	89,90 ± 0,95	30,47 ± 0,76	92,47 ± 0,36	40,50 ± 4,72
250	84,58 ± 0,51	92,97 ± 1,45	43,35 ± 0,48	94,84 ± 0,00	58,82 ± 2,98
<i>E. uniflora</i> L.					
Conc. Extrato (µg/ml)	AA(%)				
	P SC	P E	P A	P SCE	P SCA
5		34,33 ± 1,83	17,62 ± 0,79	46,87 ± 1,85	17,26 ± 3,28
10	0,87 ± 1,15	78,40 ± 2,19	35,73 ± 1,28	87,87 ± 1,25	29,32 ± 3,83
25	1,22 ± 0,59	95,19 ± 0,19	71,70 ± 2,51	95,72 ± 0,12	70,82 ± 7,91
50	3,21 ± 0,79	95,61 ± 0,11	95,28 ± 0,10	96,03 ± 0,16	92,45 ± 3,21
125	9,0 ± 0,21	95,72 ± 0,0	95,72 ± 0,05	95,89 ± 0,18	94,93 ± 0,16
250	20,47 ± 1,94	93,33 ± 4,70	95,96 ± 0,10	95,85 ± 0,26	92,58 ± 0,06
<i>C. longa</i>					
Concentração (µg/mL)	AA(%)				
	SC	E	A	SCE	SCA
5	1,92 ± 0,75	9,56 ± 1,46		20,54 ± 3,85	
10	3,49 ± 0,73	20,71 ± 0,53	2,31 ± 0,67	41,11 ± 2,56	1,33 ± 0,17
25	7,33 ± 0,77	40,80 ± 1,20	2,76 ± 0,42	69,97 ± 2,23	
50	12,42 ± 0,71	62,63 ± 0,74	3,14 ± 0,51	88,17 ± 0,47	2,49 ± 0,15
125	29,53 ± 0,73	89,61 ± 0,30	4,25 ± 0,37	92,19 ± 0,12	3,75 ± 0,17
250	51,19 ± 1,17	92,50 ± 0,33	5,32 ± 0,60	92,81 ± 0,06	3,42 ± 0,15

SC: Extrato supercrítico, E: Extrato etanólico, A: Extrato aquoso, SCE: Extrato etanólico após extração supercrítica, SCA: Extrato etanólico após extração supercrítica. Dados experimentais expostos como média ± DP em teste conduzido em triplicata.

Tabela E.2. Atividade antioxidante (AA, %) dos diferentes padrões

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	AA(%)		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	AA(%)
	Ac. Ascórbico	Catequina		Ac. Gálico
5	$0,53 \pm 1,99$	$45,26 \pm 0,31$	1	$19,98 \pm 0,15$
10	$31,83 \pm 6,14$	$78,12 \pm 0,67$	3	$75,22 \pm 0,0$
25	$96,69 \pm 0,07$	$91,08 \pm 1,11$	4	$91,48 \pm 0,0$
50	$96,73 \pm 0,0$	$90,84 \pm 0,16$	5	$94,27 \pm 0,39$
125	$96,77 \pm 0,13$	$88,92 \pm 0,98$		
250	$96,81 \pm 0,17$	$87,97 \pm 1,30$		

Dados experimentais expresos como média $\pm$ DP

Tabela E.3. Valores do CE_{50} para os padrões nos diferentes modelos de regressão empregados.

MÉTODO	Ac. Ascórbico		Catequina		Ac. Gálico	
	$CE_{50}(\mu\text{g/mL})^*$	ajuste ^{**}	$CE_{50}(\mu\text{g/mL})^*$	ajuste ^{**}	$CE_{50}(\mu\text{g/mL})^*$	ajuste ^{**}
Linear FL	18 ± 3^a	0,7613 (7,254)	$6,13 \pm 0,03^a$	0,9917 (2,925)	$2,05 \pm 0,0^a$	0,9595 (2,023)
Linear FC	35 ± 4^a	0,3804 (34,335)	$-40,7 \pm 3^a$	0,1484 (28,174)	$2,30 \pm 0,01^a$	0,9945 (7,736)
Exp	$12,7 \pm 0,7^a$	0,9109 (12,939)	$4,93 \pm 0,05^a$	0,9997 (3,06)	$1,92 \pm 0,0^a$	0,9957 (4,452)
Exp FA	$12,9 \pm 0,7^a$	0,9279(11,625)	$4,95 \pm 0,04^a$	0,9902 (3,028)	$1,92 \pm 0,0^a$	0,9831 (4,993)
L3P	$10,9 \pm 0,7^a$	1,00 (0,306)	$5,60 \pm 0,06^a$	0,9906 (1,128)	$2,11 \pm 0,01^a$	0,9957 (8,953)
L4P	$10,9 \pm 0,6^a$	0,9999 (0,084)	$5,40 \pm 0,02^a$	0,9983 (1,104)	$1,87 \pm 0,0^a$	0,9986 (1,424)

Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

* Valor da média $\pm$ DP dos ensaios em triplicata

** Coeficiente de determinação, r^2 ; raiz quadrada do erro médio RSME (entre parêntese).

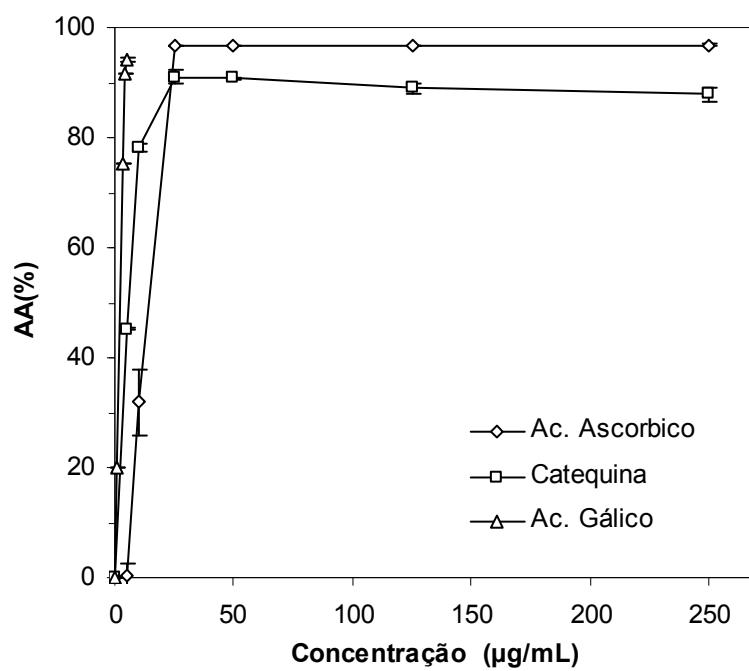


Figura E.1. Atividade antioxidante dos padrões.

APÊNDICE G

Fotografias das Matrizes Vegetais e dos Extratos Obtidos

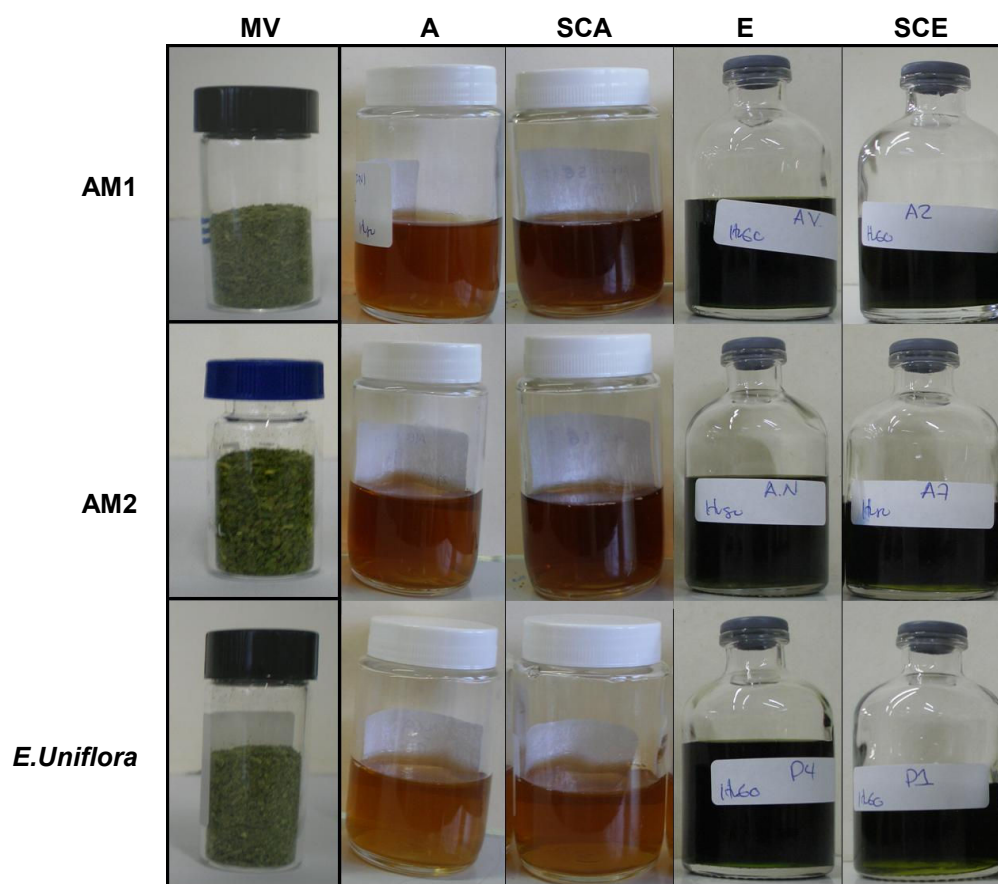


Figura H.1. Fotografia das matrizes vegetais dos extratos obtidos.

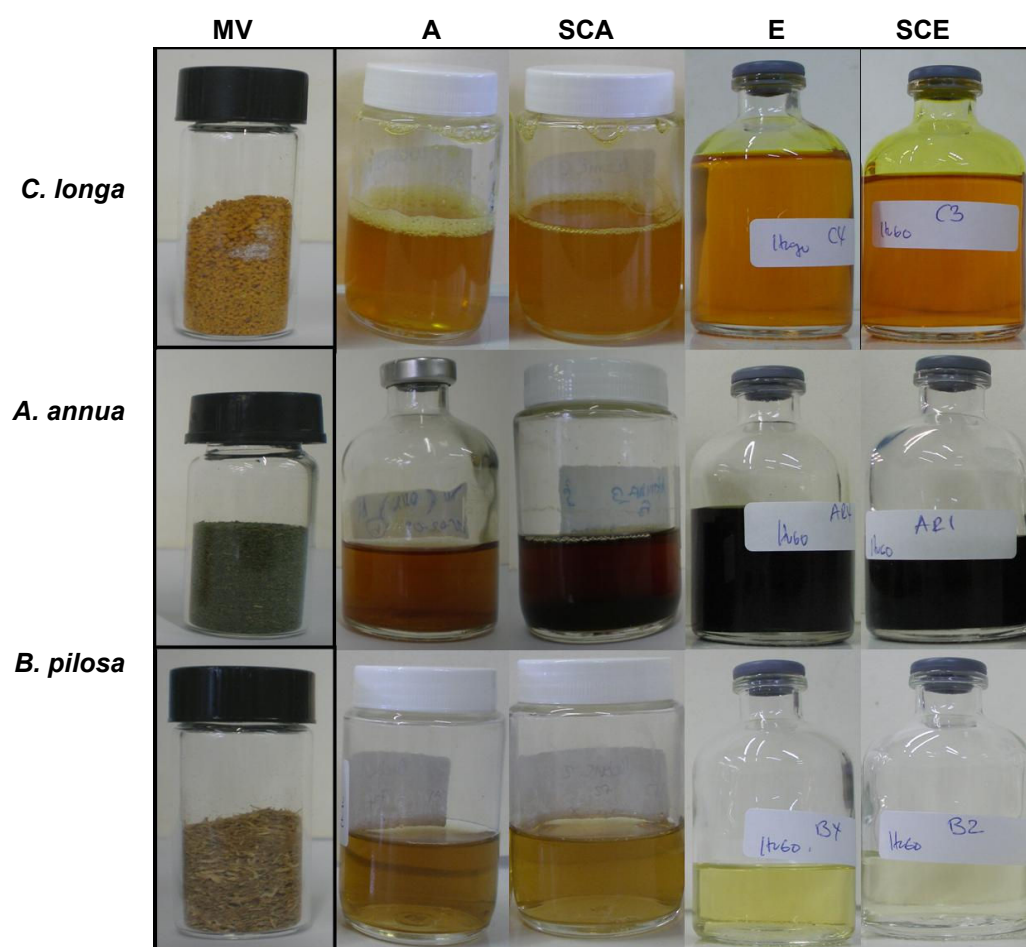


Figura H.2. Fotografia das matrizes vegetais dos extratos obtidos.

8. ANEXO A

TEORIA DA CADEIA PERTURBADA DE ESFERAS RÍGIDAS (PHSC)

Song et al. (1994) desenvolveram a teoria da cadeia perturbada de esferas rígidas (*Perturbed Hard-Sphere-Chain*, PHSC) e obtiveram uma EOS para fluidos normais e cadeias poliméricas. A PHSC modela cada molécula como uma cadeia de esferas rígidas.

O modelo PHSC possui um termo de referência (contribuição de misturas de esferas rígidas antes de se formar as ligações) e um termo de perturbação que contabiliza interações atrativas e repulsivas (contribuição devida à formação da cadeia de esferas), o modelo é re-escrito como segue, na equação (A.1):

$$\left(\frac{P}{\rho kT} \right) = \left(\frac{P}{\rho kT} \right)_{ref} + \left(\frac{P}{\rho kT} \right)_{pert} \quad (A.1)$$

Onde ρ é a densidade molecular (moléculas/volume) e k a constante de Boltzmann. Os subscritos *ref* e *pert* representam os termos de referência e perturbação no modelo termodinâmico.

A EOS é representada pela expressão abaixo (Equação A.2):

$$\left(\frac{P}{\rho kT} \right)_{ref} = 1 + \rho \sum_{i=1}^{nc} \sum_{j=1}^{nc} x_i x_j r_i r_j b_{ij} g_{ij}(d_{ij}^+) - \sum_{i=1}^{nc} x_i (r_i - 1) [g_{ii}(d_{ii}^+) - 1] - \frac{\rho}{kT} \sum_{i=1}^{nc} \sum_{j=1}^{nc} x_i x_j r_i r_j a_{ij} \quad (A.2)$$

Onde nc é o número de componentes, x_i a fração molar do componente i , r_i o número de esferas rígidas (segmentos) por molécula do componente i , d_{ij}^+ o

diâmetro da esfera rígida, g_{ij} a função de distribuição radial do par i - j antes da ligação, a_{ij} contabiliza as forças atrativas entre dois segmentos não enlaçados, b_{ij} , interação repulsiva por segmento e k_{ij} é o parametro ajustável. O modelo completo é descrito pelas seguintes Equações (A.3) a (A.11):

$$a_{ij} = \left(2\pi/3\right) (\sigma_{ij})^3 \varepsilon_{ij} F_a \left(\frac{kT}{\varepsilon_{ij}} \right) \quad (\text{A.3})$$

$$b_{ij} = \left(2\pi/3\right) (\sigma_{ij})^3 \varepsilon_{ij} F_b \left(\frac{kT}{\varepsilon_{ij}} \right) \quad (\text{A.4})$$

$$F_a = 1.8681 \exp \left[0.0619 \left(\frac{kT}{\varepsilon} \right) \right] + 0.6715 \exp \left[-1.7317 \left(\frac{kT}{\varepsilon} \right)^{3/2} \right] \quad (\text{A.5})$$

$$F_b = 0.7303 \exp \left[-0.1649 \left(\frac{kT}{\varepsilon} \right) \right] + 0.2697 \exp \left[-2.3793 \left(\frac{kT}{\varepsilon} \right)^{3/2} \right] \quad (\text{A.6})$$

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_{ii} + \sigma_{jj}}{2} \quad (\text{A.7})$$

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} (1 - k_{ij}) \quad (\text{A.8})$$

$$g_{ij}(\eta, \xi_{ij}) = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} (1 - k_{ij}) \quad (\text{A.9})$$

$$\eta = (\rho/4) \sum_{i=1}^{nc} x_i r_i b_i \quad (\text{A.10})$$

$$\xi_{ij} = (b_i b_j / b_{ij})^{1/3} (\rho/4) \sum_{k=1}^{nc} x_k r_k b_k^{2/3} \quad (\text{A.11})$$

Para um composto puro são três os parâmetros requeridos: σ , ε e r , os quais podem ser apresentados como expressões relacionadas à forma, tamanho e interação energética das moléculas do fluido, por meio de volume característico (V^*), área superficial característica (A^*), e energia coesiva (E^*) (Equações A.12 a A.15):

$$V^* = (\pi/6)R\sigma^3 N_A \quad (\text{A.12})$$

$$A^* = \pi R\sigma^3 N_A \quad (\text{A.13})$$

$$E^* = r(\varepsilon/k)R \quad (\text{A.15})$$

com N_A representando o número de Avogadro.

A PHSC foi empregada por Li et al. (2004) na investigação de sistemas líquido-vapor contendo dióxido de carbono supercrítico e n-alcanos, encontrando uma descrição apropriada de equilíbrio líquido-vapor. Colussi et al. (2006) empregaram o modelo PHSC com o intuito de obter uma descrição termodinâmica das fases sólida e fluida no processo de formação de partículas com tecnologia supercrítica, encontrando que o modelo reproduz corretamente o equilíbrio líquido-vapor em condições próximas às críticas, e a solubilidade de compostos sólidos.

Miguel et al. (2008) estudaram a formação de partículas da luteína com dióxido de carbono supercrítico, no qual foi analisada a influência das variáveis pressão e temperatura sobre a solubilidade da luteína no fluido supercrítico. O emprego da equação PHSC foi muito útil na descrição termodinâmica do processo.

Elvassore et al. (2002) relataram o método de contribuição de grupos para o cálculo dos parâmetros do composto puro, empregando o modelo PHSC. Através deste método é possível obter parâmetros para as substâncias diferentes as reportadas nas tabelas originais de Song et al. (1994), deste modo Colussi et al. (2006) empregaram o método na predição dos parâmetros da vitamina D₂, vitamina D₃, colesterol e ácido esteárico, para seu posterior uso na predição do equilíbrio destas substâncias com CO₂.

REFERÊNCIAS

COLUSSI, S., ELVASSORE, N., KIKIC, I. A comparison between semi-empirical and molecular based equations of state for describing the thermodynamic of supercritical micronization process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.38, n.1, p.18-26, 2006.

- ELVASSORE, N., STRIOLO, A., BERTUCCO, A. Thermodynamic modeling of high pressure equilibria within the McMillan Theory framework. **Fluid phase equilibria**, v.194-197, p.587-598, 2002.
- LI, Z., WANG, W., ZHANG, X., LIU, X., HU, D., XIA, Y. Vapor-liquid phase behavior of the binary systems containing supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v.43, n.4, p.541-545, 2004
- MIGUEL, F., MARTÍN A., MATTEA, F., COCERO, M.J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v.47, n.9-10, p. 1594-1602. 2008.
- SONG, Y., LAMBERT, M., PRAUSNITZ J.M. A perturbed hard sphere chain equation of state for normal fluids and polymers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.33, n.4, p.1047-1017, 1994.