



PRISCILLA CARVALHO VEGGI

**“Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas
Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando
Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom.”**

Campinas
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PRISCILLA CARVALHO VEGGI

**“Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas
Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando
Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom.”**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

*ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILLA CARVALHO VEGGI
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA ANGELA DE ALMEIDA MEIRELES*

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

V525o Veggi, Priscilla Carvalho.
Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom / Priscilla Carvalho Veggi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Ultrassom.
3. Polifenóis. 4. Custo de manufatura. I. Meireles, Maria Angela de Almeida, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Obtaining phenolic compounds from Brazilian plants via supercritical technology using cosolvents and ultrasound assisted extraction.

Palavras-chave em inglês:

Supercritical fluid extraction

Ultrasound

Polyphenols

Cost of manufacturing

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Maria Angela de Almeida Meireles [Orientador]

Marcio Antonio Mazutti

Cintia Bernardo Gonçalves

Gislaine Chrystina Nogueira de Faria

Vanessa Martins da Silva

Data da defesa: 15-03-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Orientadora

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Membro Titular
UFSM

Profa. Dra. Cintia Bernardo Gonçalves
Membro Titular
FZEA/USP

Dra. Gislaine Chrystina Nogueira de Faria
Membro Titular
DEA/FEA/UNICAMP

Dra. Vanessa Martins da Silva
Membro Titular
DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho
Membro Suplente
ITAL

Dra. Losiane Cristina Paviani
Membro Suplente
DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira
Membro Suplente
FZEA/USP

A meus pais Angela e Gilmar, meus irmãos Polyanna e Victor e minhas sobrinhas Laura e Luiza. Obrigada pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força em todos os momentos difíceis, e quem deposito toda minha fé, agradeço todas as vitórias alcançadas.

A Professora Maria Angela por todos esses anos de supervisão. Obrigada primeiramente pela confiança e por todas as oportunidades, pelos conselhos e momentos de alegria. Sempre te terei como um exemplo de profissional.

A meu companheiro Gleber, obrigada por todos os momentos de alegria, conselhos e paciência. Principalmente por acreditar em meu potencial.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por oferecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro recebido (2008/10986-2), e pela oportunidade de estagiar na França. Ao IBAMA (02001003785/200159), pela permissão de transporte da matéria-prima para a realização do estágio, e à Embrapa Arroz e Feijão (Goiás, GO) por fornecer os grãos de feijão utilizados neste estudo.

Ao professor Farid Chemat da Universidade de Avignon, na França, pelo convite de estágio. Pelo carinho recebido de todos os novos amigos, em especial a Daniella, que esteve em todos os momentos me apoiando; e a professora Anne-Sylvie.

A equipe do LASEFI, em especial ao Ariovaldo pelo apoio no laboratório. E pela companhia e conselhos das amigas de sala Juliana, Bebel e Renata.

Aos amigos da FEA, em especial aos companheiros de almoço, que durante todos esses anos me proporcionou momentos de alegria e amizade. Que não se perca com o passar do tempo!! São tantos, mas não poderia deixar de mencionar: Luiz Henrique, Irede, Lizielle, Fernanda, Christiane, Laira, Simone, Andrea, Chris, Vânia, Fran e Lorena.

À Giovana do Laboratório Thomson pelas análises ESI-MS. Aos demais colegas da Unicamp pelo convívio diário. E a todos aqueles não citados que direta ou indiretamente contribuíram de forma positiva para realização deste trabalho

“O universo está cheio de coisas mágicas,
esperando pacientemente que nossa
inteligência se torne mais aguda.”

Eden Phillpotts

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Priscilla Carvalho Veggi

TÍTULO: Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom.

ORIENTADORA: Profa. Dra Maria Angela de Almeida Meireles

RESUMO

Este estudo teve como finalidade utilizar a extração supercrítica (SFE = *supercritical fluid extraction*) para obtenção de compostos fenólicos presentes em plantas nativas brasileiras de elevado potencial econômico. As plantas estudadas foram: Cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), Nó-de-cachorro (*Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach), Ingá Cipó (*Inga edulis*), Jatobá (*Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*) e Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Experimentos de rendimento global ($X_{0,S/F=50}$) utilizando CO₂ puro, CO₂ + etanol (10 %, massa) e CO₂ + água (10 %, massa) como solventes foram realizados a 35 MPa e 323 K; a razão da massa de CO₂ para a massa de alimentação foi mantida constante (50 kg/kg). Posteriormente os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD); foram determinadas também a atividade antioxidante, o teor de polifenóis e o de flavonoides totais. Após a avaliação do comportamento dos extratos quanto ao tipo de solvente utilizado e análises realizadas, observou-se que o solvente CO₂ + H₂O resultou em maior rendimento em extrato, especialmente para os de jatobá; adicionalmente, o extrato desta planta teve excelentes características antioxidantes. Desta forma, os estudos posteriores foram realizados com o jatobá. Para selecionar a temperatura e a pressão ótimas de operação, isotermas de rendimento global (IRG's) foram determinadas nas temperaturas de 323 e 333 K e pressões de 15, 25 e 35 MPa. Em função do maior teor de polifenóis e taninos totais obtidos, foi selecionada a pressão de 15 MPa e temperatura de 323 K para estudos da cinética de extração. Curvas cinéticas (OEC = *overall extraction curve*) foram construídas visando à determinação dos parâmetros de processo através do ajuste das OECs a um *spline* linear com 3 retas. Em seguida, realizou-se um estudo do aumento de escala, mantendo constantes a razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima (S/F) e

tempo de processo. As análises químicas dos extratos obtidos por SFE foram realizadas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas em série (UPLC-MS/MS) e Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (IES-MS/MS). De acordo com os resultados, os extratos apresentaram perfil químico de procianidinas. Por último, foi determinado o custo de manufatura (COM) dos extratos das cinco plantas obtidos nos ensaios de rendimento global ($X_{0, S/F=50}$) para os três solventes: CO₂ puro, CO₂ + etanol (10 %, massa) e CO₂ + água (10 %, massa), e do extrato de jatobá no processo otimizado (OEC's) para o solvente CO₂ + H₂O. O COM estimado demonstrou a viabilidade do processo SFE para unidades industriais com extratores de 50 e 500 L, dependendo da matéria-prima a ser processada. Segundo o COM estimado, a obtenção de extratos ricos em taninos das cascas de jatobá foi economicamente viável para o solvente CO₂ + H₂O. Adicionalmente, extratos da casca de jatobá foram obtidos utilizando a extração assistida por ultrassom (UAE). As extrações foram realizadas com potência de ultrassom de 20 e 60 W durante 40 min, utilizando a água em uma razão S/F igual a 20 (otimizada em um ensaio de extração por maceração). Maior quantidade de polifenóis foi obtida com a potência de 60 W. A eficiência da UAE na extração de polifenóis foi avaliada através de extrações em corrente cruzada em três estágios; foi estudado o aumento de escala em extrator de 3 litros. Os resultados foram comparados com os obtidos com extração por agitação (AGE) e sonda de ultrassom (UP) utilizando as mesmas condições da UAE. Foi realizado ainda um estudo cinético avaliando a obtenção de polifenóis da casca de jatobá para os processos UAE e AGE. Os extratos foram analisados por CCD; a atividade antioxidante e teor de polifenóis dos extratos foram determinados. Os resultados provaram que a UAE é um método eficiente para obter extratos ricos em compostos fenólicos e com elevada atividade antioxidante. Através da análise química com Cromatografia de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD), o perfil de compostos fenólicos da casca de jatobá obtidos por UAE constituiu de procianidinas, a (+)-catequina e a (-)-epicatequina.

Palavras-chave: Extração supercrítica, extração com ultrassom, polifenóis totais, custo de manufatura.

DOCTORAL THESIS

AUTHOR: Priscilla Carvalho Veggi

TITLE: Obtaining Phenolic Compounds from Brazilian Plants via Supercritical Technology using Cossolvents and Ultrasound Assisted Extraction.

MAJOR PROFESSOR: Dr. Maria Angela de Almeida Meireles

ABSTRACT

The objective of this study was to use supercritical fluid extraction (SFE) to extract phenolic compounds from indigenous Brazilian plants with high economic potential. The plants studied were: Flame wine (*Pyrostegia venusta*), Dog's knot (*Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach), Ice-cream bean tree (*Inga edulis*), Jatoba (*Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Global yields experiments ($X_{0,S/F=50}$) using pure CO₂, CO₂ + ethanol (10 %, mass) and CO₂ + water (10 %, mass) as solvents were performed 35 MPa and 323 K; the ratio of the CO₂ mass to feed mass was maintained constant (50 kg/kg). The extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Their antioxidant activity, total polyphenolic and flavonoids content were also determined. After evaluating the behavior of the yield and chemical composition of the extracts, it was observed that the solvent mixture CO₂ + H₂O provided higher yield, especially for jatobá. Additionally, this extract presented high antioxidant activity. Based on these results, global yields isotherms (GYI) of jatoba were determined at temperature of 323 and 333 K and pressures of 15, 25 and 35 MPa in order to select the optimum operational conditions. Due to the higher polyphenols and tannins content, the optimum conditions selected were 15 MPa and 323 K. Overall extraction curves (OEC's) were obtained under these conditions in order to determine the kinetic parameters by fitting the OECs to a linear *spline* with three straight lines. For the scale-up study, the criterion adopted was keeping constant the solvent to feed ratio (S/F) and process time. The chemical analyses of SFE extracts were performed by Ultra performance liquid chromatography - diode array detection (UPLC-MS/MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS). According to the results, the extracts showed chemical profile

of procyanidins. Finally, it was evaluated the cost of manufacturing (COM) of the extracts for all five plants obtained in the GYI experiment (X_0 , $S/F=50$) for the three solvent: CO_2 pure, CO_2 + ethanol (10 %, mass) e CO_2 + water (10 %, mass); and for the jatobá extract obtained at optimized process conditions using CO_2 + water (10 %, mass). The estimated COM demonstrated the feasibility of the SFE process for industrial scale extractors of 50 and 500 L, depending on the raw material to be processed. Moreover, according to the estimated COM, obtaining jatobá bark extracts rich in tannins was economically feasible with CO_2 + H_2O . Jatoba extracts were also obtained using ultrasound assisted extraction (UAE). The extractions were performed at the potency of 20 and 60 W during 40 min, using water at S/F ratio of 20 (optimized in a maceration extraction assay). High content of polyphenols were obtained using the potency of 60 W. The efficiency of UAE in extracting polyphenols was evaluated using crosscurrent extraction in three stages. The scale-up of the UAE process was studied in an extractor of three liters. It was also performed a kinetic study to evaluate the extraction of polyphenols from jatobá via UAE and AGE. The results were compared to those obtained by extraction under agitation (AGE) and ultrasound probe (UP), in the same conditions used for the UAE experiment. The extracts were analyzed by TLC. The antioxidant activity and polyphenols content of the extracts were also determined. The results proved that UAE is an efficient method to obtain extracts rich in phenolic compounds and with high antioxidant activity. The chemical analysis of the extracts by high performance liquid chromatography - diode array detection (HPLC-DAD), showed that the phytochemical profile of jatobá bark extracts presented procyanidins, (+)-catechin and (-)-epicatechin.

Key words: supercritical fluid extraction, ultrasound extraction, polyphenols content, cost of manufacturing.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1. Extrato liofilizado da casca da árvore de jatobá obtido por SFE..... | 9 |
| Figura 2.2. Possível estrutura de procianidina derivada da casca de jatobá..... | 9 |
| Figura 2.3. Curva global de extração de funcho por SFE a 25 MPa e 313 K | 12 |
| Figura 2.4. Extração e separação do processo SFE com CO ₂ + H ₂ O..... | 15 |
| Figura 2.5. Mecanismo representando o colapso da bolha na superfície sólida..... | 18 |
| Figura 2.6. Raízes de nó-de-cachorro (<i>Heteropterys aphrodisiaca</i> O Mach)..... | 20 |
| Figura 2.7. Folhas de Ingá-cipó (<i>Inga edulis</i> Mart)..... | 21 |
| Figura 2.8. Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..... | 22 |
| Figura 2.9. Folhas de cipó-de-são-joão (<i>Pyrostegia venusta</i>)..... | 24 |
| Figura 2.10. Casca de jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i> L)..... | 25 |
| Figura 3.1. Diagrama de fluxo das atividades realizadas na etapa SFE..... | 31 |
| Figura 3.2. Diagrama de fluxo das atividades realizadas na etapa UAE..... | 32 |
| Figura 3.3. Unidades de extração supercrítica utilizadas no estudo. SFE-II (a), SFE-I e SFE-Ii (b) e piloto (c)..... | 36 |
| Figura 3.4. Esquema simplificado da unidade de extração Spe-ed (SFE-II)..... | 39 |
| Figura 3.5. Diagrama da unidade SFE com cossolvente etanol (SFE-I)..... | 42 |
| Figura 3.6. Diagrama da unidade SFE com cossolvente água (SFE-Ii)..... | 45 |
| Figura 3.7. Diagrama da unidade SFE Piloto..... | 49 |
| Figura 3.8. Dispositivo de ultrassom laboratorial usado para a UAE..... | 53 |
| Figura 3.9. Esquema utilizado na extração de três estágios co-corrente para UAE e AGE..... | 54 |
| Figura 3.10. Fluxograma do processo SFE (CO ₂) montado pelo simulador SuperPro Designer®..... | 72 |
| Figura 3.11. Fluxograma do processo SFE (CO ₂ + EtOH) montado pelo simulador SuperPro Designer®..... | 73 |
| Figura 3.12. Fluxograma do processo SFE (CO ₂ + H ₂ O) montado no simulador SuperPro Designer®..... | 74 |
| Figura 4.1. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 10 minutos de revelação (A) e após 1 hora de revelação (B) utilizando revelador DPPH e CO ₂ como solvente..... | 78 |
| Figura 4.2. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), depois de revelado (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador alcalóides e CO ₂ como solvente..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.3. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e CO ₂ como solvente..... | 80 |
| Figura 4.4. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC), jatobá (JB); padrões quercetina (Q), ácido gálico (AG) e β-sitosterol (BS), no visível (A), em UV-365 nm (B) e em UV-254 nm (C) utilizando revelador de flavonoides e CO ₂ como solvente..... | 81 |
| Figura 4.5. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 30 minutos de revelação utilizando revelador DPPH e CO ₂ + EtOH como solvente. | 82 |
| Figura 4.6. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e CO ₂ + EtOH como solvente..... | 83 |
| Figura 4.7. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC), jatobá (JB); padrões quercetina (Q), ácido gálico (AG) e β-sitosterol (BS), no visível (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de flavonoides e CO ₂ + EtOH como solvente..... | 84 |
| Figura 4.8. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 30 minutos de revelação utilizando revelador DPPH e CO ₂ + H ₂ O como solvente..... | 85 |
| Figura 4.9. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), depois de revelado (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador alcalóides e CO ₂ + H ₂ O como solvente..... | 86 |
| Figura 4.10. CCD dos extratos de feijão (FJ), cipó-de-são-joão (CS), ingá-cipó (IC), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB) em UV-365 nm (A) e no visível (B) utilizando revelador de flavonoides e CO ₂ + H ₂ O como solvente. | 87 |
| Figura 4.11. CCD dos extratos de feijão (FJ), cipó-de-são-joão (CS), ingá-cipó (IC), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e CO ₂ + H ₂ O como solvente. | 87 |
| Figura 4.12. Concentração dos compostos fenólicos totais nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO ₂ , CO ₂ + EtOH e CO ₂ + H ₂ O..... | 88 |
| Figura 4.13. Concentração dos flavonoides nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO ₂ , CO ₂ + EtOH e CO ₂ + H ₂ O..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.14. Atividade antioxidante nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO ₂ , CO ₂ + EtOH e CO ₂ + H ₂ O..... | 92 |
| Figura 4.15. Identificação de taninos nos extratos de jatobá obtidos por SFE com CO ₂ + H ₂ O: reação com vanilina clorídrica (1), reação com sais de ferro (2) e (3)..... | 94 |
| Figura 4.16. Isotermas de rendimento global dos extratos de jatobá utilizando CO ₂ + H ₂ O (lote 2). | 95 |
| Figura 4.17. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) e padrão ácido gálico (AG) utilizando revelador taninos (A), DPPH (B) e alcalóides (C). | 97 |
| Figura 4.18. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) utilizando revelador terpenóides no visível (A) e em UV-365 nm (B). | 97 |
| Figura 4.19. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) utilizando revelador flavonoides em UV-365 nm (A) e em UV-254 nm (B)..... | 98 |
| Figura 4.20. Concentração de polifenóis totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com CO ₂ + H ₂ O para as diferentes condições de T e P..... | 98 |
| Figura 4.21. Concentração de taninos totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com CO ₂ + H ₂ O para as diferentes condições de T e P..... | 100 |
| Figura 4.22. OEC da casca do jatobá a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração.103 | |
| Figura 4.23. Taninos Totais (mg PE/g MP, b.s) e OEC (%) da casca de jatobá obtido a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração..... | 104 |
| Figura 4.24. Taninos Totais (mg PE/g MP, b.s) e Massa de extrato (g) da casca de jatobá obtido a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração..... | 105 |
| Figura 4.25. Curvas de aumento de escala obtidas no equipamento de laboratório e na unidade piloto. | 106 |
| Figura 4.26. Rendimento do separador S1 obtido na unidade piloto. | 107 |
| Figura 4.27. Extratos aquosos da casca de jatobá obtidos ao longo da cinética em unidade piloto em 80 min (A) e 110 min (B) de extração..... | 108 |
| Figura 4.28. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração (1 a 13), na unidade piloto (P2.1 a P4.2) em 323 K e 15 MPa utilizando revelador taninos..... | 109 |
| Figura 4.29. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração (1 a 13), na unidade piloto (P2.1 a P4.2) e padrão ácido gálico (AG) em 323 K e 15 MPa utilizando revelador DPPH..... | 109 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.30. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração em 323 K e 15 MPa utilizando revelador de flavonoides em UV-254 nm. | 110 |
| Figura 4.31. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração em 323 K e 15 MPa utilizando revelador de terpenóides em UV-365 nm. | 110 |
| Figura 4.32. Concentração de taninos totais nos extratos de jatobá obtidos na unidade piloto com CO ₂ + H ₂ O nos separadores S1 (2: 80 min, 3: 110 min, 4: 140 min, L: limpeza) e S2 (3: 110 min, 4: 140 min, L: limpeza). | 111 |
| Figura 4.33. Potência dissipada do ultrassom em função da variação de temperatura. | 112 |
| Figura 4.34. Rendimento da extração (% b.s) e compostos fenólicos totais (mg EAG/g matriz seca) dos extratos de jatobá obtidos por maceração utilizando: w (H ₂ O), E (etanol), Ew (etanol+H ₂ O) e T (tampão, pH 3.0) em S/F iguais a 20, 10 e 6,7. | 113 |
| Figura 4.35. Estudo cinético da UAE e AGE. Teor de polifenóis totais (mg EAG/g b.s) e rendimento (%) dos extratos de jatobá. | 114 |
| Figura 4.36. Extração em corrente cruzada em três estágios do jatobá por UAE e AGE: (A) teor de polifenóis totais (mg EAG/g MP, b.s) e (B) rendimento (% b.s). | 116 |
| Figura 4.37. Cinética de extração para o extrator de 3L. Polifenóis totais (mg EAG/g MP, b.s) dos extratos de jatobá em função do tempo de extração. | 117 |
| Figura 4.38. Cinética e constantes de extração obtidas com agitação (K^{AGE}) e ultrassom (K^{UAE}). | 118 |
| Figura 4.39. Valores de IC ₅₀ determinados por DPPH dos extratos de jatobá obtidos por: UAE máx (potência máxima, 60 W) e UAE mín (potência mínima, 20 W); AGE (extração por agitação); UP (ultrassom com sonda); UAE1, UAE2, UAE3 e AGE1, AGE2, AGE3 (extração em três estágios) e E/US (aumento de escala). | 120 |
| Figura 4.40. (A) DPPH e (B) taninos presentes no extrato do jatobá obtidos por: UAE máx (potência máxima) e UAE mín (potência mínima); AGE (extração por agitação); UP (ultrassom com sonda); UAE1, UAE2, UAE3 e AGE1, AGE2, AGE3 (extração em três estágios) e E/US (aumento de escala) com padrão AG (ácido gálico) e R (rutina). | 121 |
| Figura 4.41. Espectro de massas IES-MS (-) dos extratos em 20 min da cinética de extração, ilustrando a identificação de uma série de procianidinas baseadas na unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina. | 122 |
| Figura 4.42. Espectro de massas da infusão direta MS (-) dos extratos da casca de jatobá, ilustrando a identificação de uma série de procianidinas baseadas na unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina. | 124 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.43. Perfil de CLAE dos extratos aquosos da casca do jatobá obtidos com ultrassom a 280 nm. A: (1) (+)-catequina; (2) (-)-epicatequina; (3) unk1; (4) unk2; (5) unk3; (6) unk4; (7) (-)-epicatequina benzil-tioéter; B: (1) (-)-epicatequina; (2) unk1; (3) unk2; (4) unk3; (5) unk4..... | 126 |
| Figura 4.44. Custo de manufatura (COM) estimado para o extrato de jatobá obtido no rendimento global (X_0) utilizando CO_2 , $CO_2 + EtOH$ e $CO_2 + H_2O$ em extratores de 5, 50 e 500 L..... | 130 |
| Figura 4.45. Custo de manufatura (COM) estimado para os extratos obtidos na cinética de extração (OEC) utilizando $CO_2 + H_2O$ como solvente em extrator de 500 L..... | 138 |
| Figura 7.1. Isotermas de rendimento global dos extratos de jatobá utilizando $CO_2 + H_2O$ | 172 |
| Figura 7.2. Concentração de polifenóis totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com $CO_2 + H_2O$ a 323 e 333 K..... | 173 |
| Figura 7.3. Atividade antioxidante (IC_{50}) correspondente as IRG nas diferentes condições de P (MPa) e T (K) dos extratos de jatobá utilizando $CO_2 + H_2O$ | 175 |
| Figura 7.4. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos de jatobá na cinética de extração (C1: 20 min; C2: 40 min; C3: 60 min; C4: 80 min) a 323 K e 15 MPa na unidade SFE li..... | 179 |
| Figura 7.5. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos de jatobá na cinética de extração (C1: 20 min; C2: 40 min; C3: 60 min; C4: 80 min) a 323 K e 15 MPa na unidade SFE li..... | 180 |
| Figura 7.6. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos de jatobá em escala piloto a 323 K e 15 MPa..... | 181 |
| Figura 7.7. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos de jatobá em escala piloto a 323 K e 15 MPa..... | 182 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 2.1. Teores de taninos encontrados em plantas..... | 10 |
| Tabela 3.1. Características das unidades de extração e seus leitos..... | 37 |
| Tabela 3.2. Parâmetros econômicos utilizados para estimar o COM..... | 71 |
| Tabela 4.1. Caracterização da matéria-prima. | 75 |
| Tabela 4.2. Rendimento global (X_0 , $S/F=50$; 323 K; 35 MPa), obtido por SFE das matérias-primas pré-selecionadas..... | 76 |
| Tabela 4.3. Fragmentações observadas nas análises de MS/MS para a unidade monomérica (flavonoide) e para os oligômeros de procianidinas. | 123 |
| Tabela 4.4. Composição de polifenóis, teor (mg/kg, b.s) e \overline{DP}_n dos diferentes extratos. | 126 |
| Tabela 4.5. Características estruturais das procianidinas. | 127 |
| Tabela 4.6. Valores F de Fisher e <i>p</i> -valor associados com a ANOVA realizadas na composição do extrato fenólico (mg/kg, b.s) em função do método da extração. | 128 |
| Tabela 4.7. Análise econômica da produção de extrato de cipó-de-são-joão obtido por SFE. | 133 |
| Tabela 4.8. Análise econômica da produção de extrato de ingá-cipó obtido por SFE. | 134 |
| Tabela 4.9. Análise econômica da produção de extrato de nó-de-cachorro obtido por SFE. | 135 |
| Tabela 4.10. Análise econômica da produção de extrato de feijão obtido por SFE. | 136 |
| Tabela 4.11. Análise econômica da produção de extrato de jatobá obtido por SFE. | 137 |
| Tabela 4.12. Análise econômica da produção de extrato de jatobá obtido na cinética de extração por SFE. | 140 |
| Tabela 7.1. Dados dos experimentos de rendimento global do jatobá (lote 1)..... | 177 |
| Tabela 7.2. Dados dos experimentos de rendimento global do jatobá (lote 2)..... | 177 |
| Tabela 7.3. Dados da cinética 1 e 2: T = 323 K, P = 15 MPa, M = 50 g (b.u), $Q_{CO_2,1} = 1,10 \times 10^{-4}$ kg/s e $Q_{CO_2,2} = 1,12 \times 10^{-4}$ kg/s..... | 178 |
| Tabela 7.4. Dados do experimento 1 e 2: T = 323 K, P = 15 MPa, M = 1346 g (b.u), $Q_{CO_2} = 3,33 \times 10^{-3}$ kg/s e $Q_{H_2O} = 3,33 \times 10^{-4}$ kg/s..... | 178 |

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 1- Introdução e objetivos | 1 |
| 1.1. Introdução | 1 |
| 1.2. Objetivos | 2 |
| 1.2.1. Geral | 2 |
| 1.2.2. Específicos | 2 |
| Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica | 5 |
| 2.1. Produtos Naturais e Compostos Fenólicos | 5 |
| 2.1.1. Flavonoides | 6 |
| 2.1.2. Taninos | 7 |
| 2.2. Extração com Fluido Supercrítico (SFE) | 11 |
| 2.3. Utilização de Cossolventes ou Modificadores | 14 |
| 2.4. Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | 16 |
| 2.5. Matérias-primas utilizadas no estudo | 19 |
| 2.5.1. <i>Heteropterys aphrodisiaca</i> (nó-de-cachorro) | 19 |
| 2.5.2. <i>Inga Edulis</i> (Ingá-cipó) | 21 |
| 2.5.3. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Feijão) | 22 |
| 2.5.4. <i>Pyrostegia venusta</i> (Cipó-de-são-João) | 23 |
| 2.5.6. <i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá) | 25 |
| 2.4.Aumento de Escala | 26 |
| 2.5.Simulação de Processos e Custo de Manufatura | 28 |
| Capítulo 3 - Material e Métodos | 31 |
| 3.1. Matéria-Prima | 33 |
| 3.1.1. Origem e preparo das matérias-primas | 33 |
| 3.1.2. Caracterização da Matéria-prima | 33 |
| 3.1.2.1. Umidade | 33 |
| 3.1.2.2. Densidade real, densidade aparente e porosidade do leito | 34 |
| 3.2. Obtenção dos extratos | 34 |
| 3.2.1. Rendimento global (X_0) | 37 |
| 3.2.1.1. Extração utilizando CO_2 supercrítico puro como solvente | 38 |
| 3.2.1.2. Extração utilizando como solvente a mistura CO_2 + etanol | 41 |
| 3.2.1.3. Extração utilizando como solvente a mistura CO_2 + água | 44 |
| 3.2.2. Isotermas de rendimento global (IRG) | 46 |
| 3.2.2.1. Liofilização | 46 |
| 3.2.3. Determinação da cinética da extração | 47 |
| 3.2.3.1. Ajuste da Curva Global de Extração | 47 |
| 3.2.4. Unidade Piloto (2 × 5 L) | 47 |
| 3.2.5. Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | 51 |
| 3.2.5.1. Maceração | 51 |
| 3.2.5.2. Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | 52 |
| 3.2.5.3. Extração em Corrente Cruzada em três estágios | 54 |
| 3.2.5.4. Estudo Cinético | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Análise da composição química dos extratos | 57 |
| 3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) | 57 |
| 3.3.1.1. CCD dos extratos obtidos utilizando os solventes CO ₂ puro e CO ₂ + etanol | 57 |
| 3.3.1.2. CCD dos extratos obtidos utilizando como solvente a mistura CO ₂ + água | 58 |
| 3.3.1.3. CCD dos extratos obtidos por UAE | 59 |
| 3.3.2. Atividade Antioxidante | 59 |
| 3.3.3. Determinação de Polifenóis Totais | 60 |
| 3.3.3.1. Extratos obtidos por SFE..... | 60 |
| 3.3.3.2. Extratos obtidos por UAE | 61 |
| 3.3.4. Determinação dos Flavonoides | 62 |
| 3.3.5. Taninos Totais..... | 62 |
| 3.3.5.1. Identificação de Taninos dos extratos de jatobá obtidos utilizando CO ₂ + água | 63 |
| 3.3.5.2. Determinação de Polifenóis totais dos extratos de jatobá obtidos utilizando CO ₂ + água | 63 |
| 3.3.5.3. Determinação de Taninos totais dos extratos de jatobá obtidos utilizando CO ₂ + água | 64 |
| 3.4. Caracterização dos Extratos obtidos por SFE..... | 66 |
| 3.4.1. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas em série (UPLC-MS/MS)..... | 66 |
| 3.4.2. Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (IES – MS/MS) | 67 |
| 3.5. Caracterização dos Extratos obtidos por UAE | 68 |
| 3.5.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a um Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD) | 68 |
| 3.6. Avaliação Econômica | 69 |
| Capítulo 4 - Resultados e Discussão | 75 |
| 4.1. Caracterização da Matéria-prima..... | 75 |
| 4.2. Obtenção dos extratos..... | 75 |
| 4.2.1. Rendimento global (X ₀) | 75 |
| 4.2.1.1. CCD dos extratos obtidos por SFE utilizando CO ₂ puro como solvente .. | 77 |
| 4.2.1.2. CCD dos extratos obtidos por SFE utilizando como solvente a mistura CO ₂ + etanol..... | 81 |
| 4.2.1.3. CCD dos extratos obtidos por SFE utilizando como solvente a mistura CO ₂ + H ₂ O..... | 85 |
| 4.2.1.4. Polifenóis totais | 87 |
| 4.2.1.5. Flavonoides | 90 |
| 4.2.1.6. Atividade Antioxidante | 91 |
| 4.2.1.7. Identificação de Taninos | 93 |
| 4.2.2. Isotermas de Rendimento Global (IRG) | 94 |
| 4.2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 96 |
| 4.2.2.2. Polifenóis totais | 98 |
| 4.2.2.3. Taninos Totais | 99 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.3. Cinética de Extração | 102 |
| 4.2.3.1. Taninos totais | 104 |
| 4.2.4. Estudo do Aumento de escala | 105 |
| 4.2.4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 108 |
| 4.2.4.2. Taninos Totais | 110 |
| 4.2.3. Extração Assistida por Ultrassom (UAE) | 111 |
| 4.2.3.1. Maceração | 112 |
| 4.2.3.2. Comparação entre UAE e AGE..... | 113 |
| 4.2.3.3. Extração em Corrente Cruzada em três estágios | 115 |
| 4.2.3.4. Aumento de escala..... | 117 |
| 4.2.3.5. Estudo cinético | 118 |
| 4.2.3.6. Atividade Antioxidante | 119 |
| 4.2.3.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 121 |
| 4.3. Caracterização dos extratos obtidos por SFE | 122 |
| 4.3.1. Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (IES – MS/MS) .. | 122 |
| 4.3.2. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em série (UPLC-MS/MS)..... | 124 |
| 4.4. Caracterização dos Extratos obtidos por UAE | 125 |
| 4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a um Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD)..... | 125 |
| 4.5. Avaliação Econômica | 128 |
| 5. Conclusão | 141 |
| 6. Referências Bibliográficas | 145 |
| 7. Apêndice..... | 171 |
| 7.1. Experimentos envolvendo o Lote 1 de jatobá..... | 171 |
| 7.1.1. Isotermas de Rendimento Global (IRG) para o jatobá (lote 1) | 171 |
| 7.1.2. Determinação dos Polifenóis totais..... | 173 |
| 7.1.3. Atividade Antioxidante (AA)..... | 174 |
| 7.2. Resultados Experimentais..... | 177 |
| 7.2.1. <i>Rendimento Global</i> | 177 |
| 7.2.2. <i>Cinética de Extração</i> | 178 |
| 7.2.3. <i>Escala Piloto</i> | 178 |
| 7.2.4. <i>Espectros dos extratos da casca do jatobá obtidos na cinética de extração</i> .. | 179 |
| 7.3. Exemplo de rotina de programação utilizada no SAS System 8.02 para ajuste de três retas..... | 183 |
| 7.3. Atividades acadêmicas..... | 187 |
| 7.3.1. Publicações Durante o Doutorado..... | 187 |
| 7.3.1.1. Artigos | 187 |
| 7.3.1.2. Capítulos de livro | 188 |
| 7.3.1.3. Trabalhos completos publicados em anais de eventos | 188 |
| 7.3.1.4. Resumos publicados em anais de eventos | 189 |
| 7.3.2. Palestra Ministrada..... | 190 |
| 7.3.3. Participação em eventos científicos e cursos | 190 |

CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO

O trabalho apresentado consiste em duas etapas: a extração via tecnologia supercrítica (SFE) e a extração assistida por ultrassom (UAE). A primeira etapa foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Naturais (LASEFI) - DEA/FEA/UNICAMP. Foi realizado um *screening* de cinco plantas brasileiras visando à obtenção de polifenóis. Após a seleção de uma matéria-prima, a casca do jatobá, o processo foi então otimizado e análises químicas e econômicas foram realizadas. A segunda etapa foi realizada durante o estágio de Doutorado sanduíche em Avignon/França, na Universidade de Avignon, no laboratório GREEN (Grupo de Pesquisa em Eco-Extração de Produtos Naturais) do INRA (Instituto Nacional de pesquisa Agrônômica) por um período de quatro meses. Durante o estudo da extração dos polifenóis da casca de jatobá utilizando a tecnologia SFE surgiu o interesse de verificar o comportamento deste extrato utilizando outra tecnologia inovadora, a extração assistida por ultrassom (UAE). Este processo tem sido bastante empregado na extração de matrizes vegetais com a mesma finalidade da SFE, sendo promissora por promover a extração exaustiva de princípios ativos de vegetais com gasto de energia relativamente baixo, economia de tempo e maior segurança no processo.

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

A ampla utilização de plantas para a produção de extratos naturais é explorada em todas as partes do mundo e tem sido de importância crucial para a saúde humana durante séculos. Estima-se que mais de 70.000 espécies de plantas brasileiras têm sido utilizadas para fins de efeitos terapêuticos, embora os constituintes químicos de outras centenas de milhares de espécies na Terra ainda estão por ser desvendadas (OLIVEIRA et al., 2009)

A riqueza de ervas medicinais com base em espécies nativas é incalculável. Apenas uma pequena parte dessa riqueza biológica e cultural tem sido completamente avaliada em estudos fitoquímicos e farmacológicos sendo que uma proporção ainda menor tem sido traduzida em patentes de aplicação terapêutica (BALBANI, 2009). Ainda hoje, o Brasil continua sendo um importante fornecedor de material botânico para o mercado internacional da indústria farmacêutica (BRANDÃO et al., 2008).

Drogas derivadas de plantas são utilizadas atualmente pelas indústrias farmacêuticas, como matérias-primas para a extração de substâncias ativas ou de precursores químicos e, principalmente, para produção de extratos fluidos, chás caseiros, medicamentos e pós (RUNHA et al., 2001). Os compostos fenólicos, flavonoides e taninos têm se tornado cada vez mais evidentes devido aos efeitos benéficos à saúde por sua atividade antioxidante, e por serem responsáveis por possíveis ações farmacológicas (ANTOLOVICH et al., 2002).

Juntamente com o uso racional de plantas medicinais brasileiras, processos químicos foram aprimorados para atender o uso em larga escala a um custo aceitável e reduzir as emissões de dióxido de carbono. O processo de extração com fluidos supercríticos (SFE) pode ser rápido, eficiente e limpo para a extração de produtos naturais a partir de matrizes vegetais (PEREIRA e MEIRELES, 2010). No estado supercrítico, o CO₂ possui um excelente poder de extração ajustável às condições de pressão e temperatura, facilitando o aumento do poder de solvatação. Além disso, a extração assistida por ultrassom (UAE) também é considerada uma tecnologia limpa e tem sido aplicada na

extração de produtos naturais a partir da matriz vegetal devido ao seu fenômeno de cavitação. A cavitação é um efeito mecânico do ultrassom conhecido por acelerar a liberação de compostos bioativos da matriz vegetal devido à ruptura da parede celular e intensificação de transferência de massa. Portanto, as vantagens apresentadas por estas tecnologias as tornam uma alternativa para recuperação de variados tipos de substâncias.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. GERAL

Avaliar a obtenção de extratos de plantas nativas brasileiras empregando a tecnologia supercrítica com diferentes solventes (CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) a fim de selecionar uma planta com maior potencial para a produção de extratos ricos em compostos fenólicos; e desenvolver análise econômica para o aumento de escala e otimização do processo. Além disso, avaliar a eficiência do ultrassom na obtenção de compostos fenólicos da planta de interesse selecionada no estudo.

1.2.2. ESPECÍFICOS

Etapas SFE

- Determinar, para o sistema matéria-prima + CO_2 , o rendimento global (X_0 , $S/F=50$) para as extrações sob condições de temperatura e pressão de 323 K e 35 MPa para as plantas selecionadas;
- Determinar, para o sistema matéria-prima + $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (10 %, massa), o rendimento global (X_0 , $S/F=50$) para as extrações sob condições de temperatura e pressão de 323 K e 35 MPa para as plantas selecionadas;
- Determinar, para o sistema matéria-prima + $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (10 %, massa), o rendimento global (X_0 , $S/F=50$) para as extrações sob condições de temperatura e pressão de 323 K e 35 MPa para as plantas selecionadas;
- Identificar o perfil fitoquímico dos extratos utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD);

- Analisar os extratos quanto ao teor de: flavonoides e polifenóis, e determinar a sua atividade antioxidante;
- Com base nos rendimentos, composição química e atividade antioxidante, selecionar uma matéria-prima e um sistema de solventes;
- Determinar para o sistema matéria-prima + CO₂ + H₂O (10 %, massa), as isotermas de rendimento global (IRG) para diferentes temperaturas (323 e 333 K) e pressões (15, 25 e 35 MPa) e $X_{0, S/F=50}$;
- Identificar os compostos utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD);
- Analisar os extratos quanto aos polifenóis e taninos totais;
- Com base nos rendimentos e na composição química, selecionar uma condição de temperatura e pressão;
- Determinar as curvas de extração (OEC = Overall Extraction Curve) para o processo SFE otimizado em relação aos compostos de interesse para obtenção dos parâmetros do processo.
- Identificação dos compostos utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD);
- Analisar os extratos quanto aos taninos totais;
- Aumento de escala do processo SFE otimizado utilizando planta piloto (SFE 2 × 5L) contendo dois extratores de 5L;
Determinar a composição dos extratos de SFE através da cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas em série (UPLC-MS/MS) e por espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (IES – MS/MS);
- Estimar o custo de manufatura (COM) dos extratos obtidos nos processos SFE (CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O) utilizando o *software* SuperPro Design[®].

Etapa UAE

- Determinar as condições ótimas na extração de polifenóis totais da casca do jatobá empregando H₂O, H₂O + EtOH (1:1, v/v), EtOH e uma solução tampão (pH 3,0) e a razão solvente/massa alimentação (S/F) (20, 10 e 6,7) através da extração por maceração;

- Determinar o rendimento da extração assistida por ultrassom (UAE) nas potências de 20 e 60 W em 40 min sob temperatura de 323 K aplicando as condições ótimas em reator de 1 L;
- Analisar os extratos quanto aos polifenóis totais e atividade antioxidante;
- Determinar a viabilidade do aumento de escala para o processo UAE em reator de 3 L;
- Realizar extrações com sonda de ultrassom (UP) como método de comparação;
- Realizar extrações de três estágios em série da casca do jatobá utilizando a extração por agitação (AGE) como comparação com a UAE;
- Realizar o estudo cinético da extração de polifenóis dos extratos de jatobá obtidos por UAE;
- Analisar os extratos quanto aos polifenóis totais e atividade antioxidante;
- Identificar o perfil fitoquímico dos extratos UAE utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD);
- Determinar a composição dos extratos de UAE através de cromatografia de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD).

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRODUTOS NATURAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS

A sociedade moderna vem priorizando, cada vez mais, os tratamentos com produtos à base de plantas medicinais por entenderem que, quando utilizados de maneira adequada, os fitoterápicos apresentam efeitos terapêuticos, às vezes, superiores aos de medicamentos convencionais. As plantas medicinais são os mais ricos recursos biológicos de drogas para os tradicionais sistemas de medicina, medicamentos modernos, nutracêuticos, suplementos alimentares, medicina popular, intermediários farmacêuticos e drogas sintéticas (HANDA et al., 2008).

O consumo de remédios à base de ervas e plantas medicinais era prática comum para cerca de 80 % da população mundial, no início da década de 1990, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (AKERELE, 1993). O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de 50 bilhões de dólares anuais, sendo cerca de 3 bilhões somente na Alemanha. No Brasil, em 2011, esse setor movimentou cerca de US\$ 1 bilhão, alta de 25 % em relação ao ano anterior, quando totalizou US\$ 800 milhões (ABIFISA, 2011).

O Brasil é um dos grandes centros no mundo quando a biodiversidade é considerada, detém 28 % do que restam de florestas tropicais do planeta e o maior número (22 %) de espécies de plantas superiores, dos quais se estima que 40 % devem conter propriedades terapêuticas (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996), porém apenas 20 % das plantas foram farmacologicamente estudadas (NEWMAN et al., 2003). Esta grande reserva natural de compostos orgânicos tem demonstrado um papel altamente importante na descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (ALVES et al., 2000), sendo inúmeras as atividades funcionais e farmacológicas atribuídas a seus extratos brutos, óleos voláteis e princípios ativos (PEREIRA et al., 2003).

Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos numerosos fitoquímicos além dos compostos fenólicos como, por exemplo, compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis. Muitos destes fitoquímicos apresentam significante

capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (YILDIRIM et al., 2002).

Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides. Compostos fenólicos estão largamente difundidos na natureza e fazem parte da constituição de grande maioria das plantas apresentando considerável importância fisiológica e morfológica. Exibem uma ampla gama de propriedades fisiológicas tais como antialérgicos, antiaterogênico, antiinflamatórios, antimicrobiano, antioxidante, antitrombóticos, cardioprotetores e efeitos vasodilatadores (PUUPPONEN-PIMIA, 2001; MANACH e MAZUR, 2005).

Hoje em dia, como parte de nossa dieta, os compostos fenólicos também tem sido associados com outras atividades promovendo a saúde como: diminuição dos níveis de açúcar no sangue, redução do peso corporal, anticarcinogênico e antiidade. Portanto, os efeitos benéficos derivados a partir de compostos fenólicos mais requisitados têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante (HEIM et al., 2002; DE LA LASTRA e VILLEGAS, 2005; BERNAL et al., 2010).

Apesar da grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos que ocorrem na natureza, estes podem ser divididos em várias classes. Destes, ácidos fenólicos, flavonoides e taninos são considerados como principais compostos fenólicos (KING e YOUNG, 1999).

2.1.1. FLAVONOIDES

São inúmeras as atividades funcionais e farmacológicas atribuídas aos extratos brutos, óleos voláteis e princípios ativos de plantas nativas e/ou adaptáveis ao cultivo brasileiro (PEREIRA et al., 2003) Os flavonoides são um grande exemplo, pois estão largamente difundidos na natureza e fazem parte da constituição de grande maioria das plantas.

Flavonas e flavonóis, como a quercetina (um dos principais), responsáveis pela remoção de radicais livres no organismo, e a miricetina, são os flavonoides de ocorrência mais ampla na natureza (CARLO et al., 1999).

Não só os pesquisadores, como indústrias e os próprios consumidores, têm tido um crescente interesse nos flavonoides, pois desempenham papel importante na saúde humana devido às suas propriedades farmacológicas antiinflamatória, antitrombótica, antimicrobiana, entre outras (BRAVO, 1998; YODA et al., 2003). Os flavonoides possuem papel importante no controle do câncer do pulmão, do fígado, dos rins e da mama (FERREIRA et al., 2008), além de promover efeitos benéficos no sistema cardiovascular como a redução da oxidação do colesterol LDL (um processo prejudicial que permite o colesterol acumular-se nos vasos sanguíneos) (ENGLER et al., 2004).

Diante deste quadro, alguns estudos têm sido realizados sobre a importância dos flavonoides na saúde humana. MA et al. (2008) relataram que cascas de tangerina (*Citrus reticulata*) apresentam uma rica composição em flavonoides; a hesperidina é o mais abundante. Estes compostos são importantes por inibir *in vitro* a proliferação das células do câncer de mama e na diminuição de triglicerídeos no sangue (DING et al., 2007). Estudos de algumas matérias-primas ainda são pouco encontrados na literatura como as folhas de manga e jaca estudadas por PEREIRA e MEIRELES (2006) e TAKEUCHI et al. (2006), estas são importantes fontes de compostos antioxidante por serem ricas em compostos fenólicos.

Alguns estudos ainda mostram a eficiência da SFE frente às extrações convencionais na obtenção de compostos antioxidantes, segundo CARVALHO JUNIOR et al. (2005) o rendimento e a atividade antioxidante de extratos de alecrim demonstraram resultados mais satisfatórios na extração por SFE quando comparados com extratos submetidos a hidrodestilação e extração com etanol e hexano.

2.1.2. TANINOS

Os taninos são fenóis comuns em plantas, e seu uso tradicional como agentes que transformam peles de animais em couro é um exemplo de sua maior atividade: sua habilidade de interagir e precipitar proteínas, alcalóides e gelatina (HASLAM, 1989). Outros estudos reportam a importância dos taninos na indústria do petróleo como agente dispersante para controlar a viscosidade de argilas na perfuração de poços (DOAT, 1978) e na fabricação de tintas e adesivos (TRUGILHO et al., 1997).

Os taninos estão distribuídos em plantas e alimentos de origem vegetal, especialmente em frutas, sementes de leguminosas, grãos de cereais e diferentes bebidas (vinho, chá, cacau e cidra). Eles foram definidos como compostos fenólicos solúveis em água apresentando massa molecular entre 500 e 3000 Daltons e, além de apresentar reações fenólicas, contém suficientes grupos hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (DESHPANDE et al., 1986; FONSECA e LIBRANDI, 2008). Podem ser retirados dos vegetais por diferentes tipos de solventes tais como água, etanol, acetona ou por soluções aquosas, entre outros, porém não é economicamente viável a utilização de reagentes no processo de extração, visto que a extração em água é bastante eficiente e de baixo custo (MARINHO, 2004).

Os taninos extraídos de cascas de árvores são utilizados de forma efetiva como matéria-prima na fabricação de adesivos para produtos de madeira e podem ser uma fonte segura e renovável de matéria-prima para adesivos (CHEN, 1991); podendo tornar-se economicamente viável, uma vez que depois de extraídas, as cascas podem também ser aproveitadas como fonte de energia (MORI et al., 1999).

Os taninos são classicamente divididos em dois grupos, os taninos hidrolisáveis e os condensados (proantocianidinas). Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos (gálico, caféico, egálico e um açúcar). Por outro lado, largamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados (Figura 2.1) são polímeros dos flavonoides, formados predominantemente por unidades de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3,4-diols (leucoantocianidina), presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (HELDT, 1997). Os taninos condensados estão atraindo mais atenção, pois são considerados como ingredientes funcionais e suplementos nutricionais. Eles constituem a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina (QUEIROZ, 2002). No entanto, a capacidade de bioatividade dos taninos condensados de plantas é geralmente reconhecida como largamente dependente de sua estrutura e em particular o grau de polimerização. O que se torna desafiador, devido a sua alta complexidade (Figura 2.2) (HÜMMER e SCHREIER, 2008).

Os taninos são potenciais antioxidantes biológicos (RIVIERE et al., 2009). Estudos sugerem que proteínas livres ou complexadas condensadas e taninos hidrolisáveis

são mais eficientes do que pequenos compostos fenólicos. Pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos (SCALBERT, 1991) e fungos (MONTEIRO et al., 2005); como agentes carcinogênicos (mama, próstata, pele e estômago) e causadores de toxicidade hepática (DE BRUYNE et al., 1999). Além disso, podem agir como antiinflamatórios e cicatrizantes (MELLO e SANTOS, 2001); apresentam atividade contra o reumatismo, problemas renais e processos inflamatórios em geral (GINDRI et al., 2010; DUFRENSE e FARNWORTH, 2001) e até como inibidores da transcriptase reversa em HIV (CHUNG et al., 1998).

Diante deste quadro, alguns estudos têm sido realizados sobre a importância dos taninos na saúde humana. Na Tabela 2.1 é possível observar os teores de taninos encontrados em algumas plantas.



Figura 2.1. Extrato liofilizado da casca da árvore de jatobá obtido por SFE.

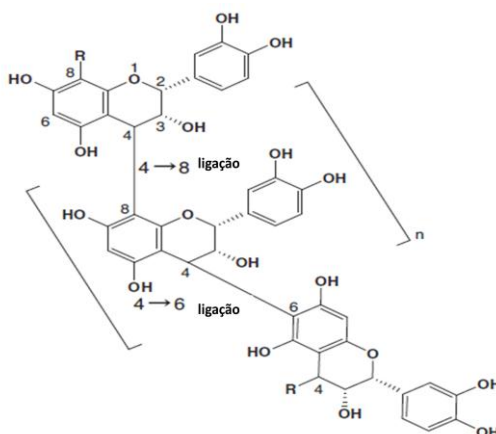


Figura 2.2. Possível estrutura de procianidina derivada da casca de jatobá (SASAKI, 2009)

Tabela 2.1. Teores de taninos encontrados em plantas.

| Planta | Teor de Taninos | Método extração/ Solvente | Referência |
|---|--|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Acacia confusa</i> (carambuco africano) | 280,70 mg/g MP ^a | Maceração: acetona:água (70:30) | WEI et al. (2010) |
| <i>Urera baccifera</i> (L.) (urtiga-brava) | 19,11 mg/g ext. ^b | Maceração: etanol:água (70:30) | GINDRI et al. (2010) |
| <i>Ilex paraguariensis</i> (pó de erva-mate) | 0,29 % ^b | Ultrassom: metanol:água (80:20) | VIEIRA et al. (2009) |
| <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira preta) | 31,20 mg/g MP ^b 16,70 % ^b | Maceração: metanol:água (80:20) | QUEIROZ et al.(2002) |
| <i>Macropitilium atropurpureum</i> (orelha de onça) | 5,6 mg/g MP ^d | Agitação: acetona:água (80:20) | SANTOS et al. (2010) |
| (<i>Carya illinoensis</i> Wangenh.) C. | 185 mg/g MP, b.s ^b | Maceração: Acetona | PRADO et al. (2009) |
| Koch (Noz-pecã - casca) | 736 mg/g MP, b.s ^b | Álcool | PRADO et al. (2009) |
| | 23,70 % ^d | Soxhlet | |
| <i>Acácia bark</i> | 3,90 % ^d | SFE/metanol | PANSERA et al. (2004) |
| | 5,00 % ^d | SFE/etanol | |
| | 9,00 % ^d | SFE/água | |
| <i>Ajuga reptans – Herba</i> | 5,83 % ^c | | |
| <i>Mentha pulegium-Herba</i> | 9,88 % ^c | | |
| <i>Mentha x piperita- Folium</i> | 11,70 % ^c | Soxhlet/água | PALICI et al. (2005) |
| <i>Mentha longifolia- Folium</i> | 9,38 % ^c | | |
| <i>Maytenus ilicifolia</i> (espinheira-santa) | 3,43 a 4,71 % ^d | Refluxo/água | NEGRI (2007) |
| <i>Coffea arabica</i> L. | 4,20 mg/g MP ^b | Refluxo/água | FERREIRA JR e MORAES (2007) |
| Barbatimão - tintura | 0,65 % ^c | Refluxo/água | FONSECA e LIBRANDI (2008) |
| <i>Calycophyllum spruceanum</i> (mulateiro) | 9,90 % ^e | Decocção/água | COSTA et al. (2011) |
| <i>Anacardium occidentale</i> L. (cajueiro- pendúculo) | 4,36 % ^b | Hidrólise/HCl/MeOH | AGOSTINI-COSTA (1999) |

^a: Tanino condensado purificado; ^b: Catequina; ^c: Ácido Pirogálico; ^d: Ácido tânico; ^e: Ácido gálico; MP: matéria-prima.

2.2. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

O interesse pela extração supercrítica cresceu muito nos últimos anos tornando-se um campo promissor para a indústria química, farmacêutica e de alimentos. Trata-se de um processo alternativo que atende às restrições impostas pelos órgãos de saúde podendo minimizar o impacto ambiental pela diminuição dos resíduos tóxicos, reduzindo os custos operacionais (SAJFROTOVÁ et al., 2005).

No processo de extração com fluido supercrítico de matrizes sólidas, o fluido supercrítico passa continuamente através do leito de partículas e dissolve o soluto, sendo o solvente alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Conforme o solvente escoar através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluida, e em qualquer ponto dentro do extrator a concentração do soluto na fase sólida e fluida varia continuamente. Como em geral, a quantidade de soluto é pequena, na mistura soluto/solvente a condição de equilíbrio dificilmente é alcançada. Os solutos são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para a superfície externa, em seguida a mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo precipitador, onde finalmente são separados (BRUNNER, 1994; SOVOVÁ, 2005; ALKIO, 2008).

Na etapa de extração, duas informações experimentais são necessárias: (1) rendimento global (X_0), e; (2) curva global de extração (OEC: Overall Extraction Curve). Segundo MARTÍNEZ et al. (2003), o rendimento global da extração para o processo SFE em leito fixo de partícula e método dinâmico de extração, é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão.

A curva global de extração (OEC) consiste na relação entre a massa de extrato acumulada em função do tempo de extração ou a quantidade de solvente utilizada (SOVOVÁ, 2005). Estas curvas são tipicamente divididas em três períodos (BRUNNER, 1994) e podem ser observados na Figura 2.3.

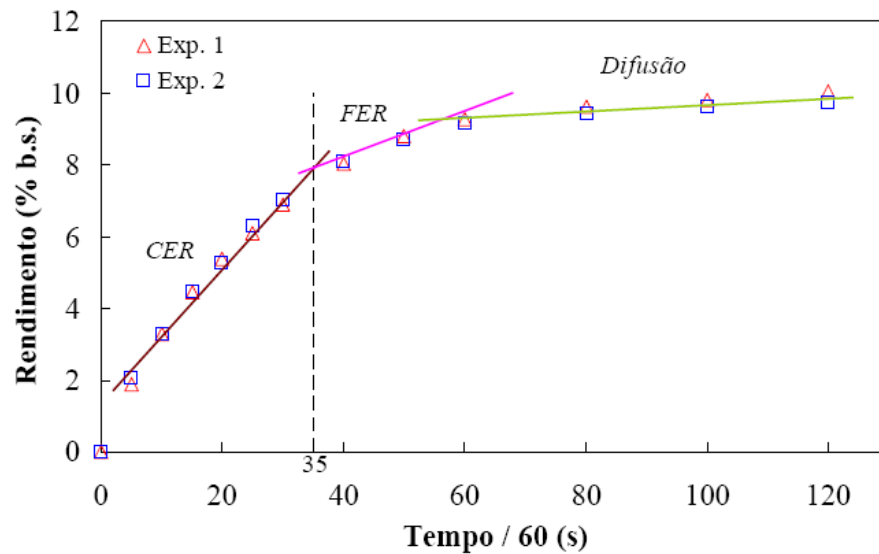


Figura 2.3. Curva global de extração de funcho por SFE a 25 MPa e 313 K (CONDORI, 2005).

(1) Etapa da taxa constante de extração (CER: Constant Extraction Rate): consiste na retirada do extrato que se encontra na superfície da partícula com uma velocidade aproximadamente constante, prevalecendo a transferência de massa por convecção;

(2) Etapa de taxa decrescente de extração (FER: Falling Extraction Rate): começa a aparecer a resistência à transferência de massa na interface sólido-fluido. Nesta fase ocorre tanto a transferência de massa por convecção quanto por difusão. Parte do soluto está menos disponível, devido a não disponibilidade de grande parte do soluto na superfície da partícula ou a não uniformidade do rompimento das células da matriz vegetal;

(3) Etapa difusiva (DC: Diffusion-Controlled): etapa em que ocorre a retirada do soluto que está na parte interna da partícula, sendo uma etapa lenta de extração.

O fluido no estado supercrítico tem densidade próxima do líquido, enquanto que a viscosidade está próxima a dos gases, e a difusividade é, em ordem de magnitude, aproximadamente duas vezes maior que a de líquidos, o que favorece sua função como solvente (BRUNNER, 2005; VEDAMARAN et al., 2004). Por outro lado, as propriedades de transporte são intermediárias entre os estados dos gases e líquidos, o que faz com que o fluido supercrítico se comporte como uma fase extremamente móvel, capaz de se misturar

rápida e profundamente com outras substâncias devido à sua baixa viscosidade, garantindo uma extração mais eficiente e mais rápida do que com solventes orgânicos (MOHAMED e MANSOORI, 2002).

No que diz respeito a técnicas que envolvem o uso de fluidos supercríticos, o dióxido de carbono é, na grande maioria das vezes, a substância escolhida. A sua pressão e temperatura críticas de 7,38 MPa e 304,1 K respectivamente, são facilmente atingíveis (LEAL et al., 2003). Adicionalmente, o dióxido de carbono tem ainda as vantagens da sua natureza inerte, não tóxica e não inflamável (SARMENTO et al., 2004; GRIGONIS et al., 2005), baixo custo (YANG e ZHONG, 2005) e da disponibilidade do CO₂ na forma purificada (FERRENTINO et al., 2010).

A extração com fluido supercrítico usando dióxido de carbono como solvente fornece uma alternativa para processos como a destilação a vapor e a extração com solventes orgânicos (percolação, maceração, método de Soxhlet, etc.) devido às desvantagens que estes processos apresentam em termos de degradação e perdas de compostos biologicamente ativos (SOVOVÁ et al., 2004; SARMENTO et al., 2004), consumo de grandes quantidades de solventes altamente poluentes e necessidade elevada de energia e mão-de-obra (SOVOVÁ et al., 2004).

A SFE permite contornar problemas ocorridos nos processos tradicionais, como a presença de resíduos de solventes em produtos acabados, a necessidade de etapas de purificação em extrações que utilizam solventes pouco seletivos e a degradação de substâncias, causadas por condições drásticas de operação com a utilização de elevadas temperaturas em processos de destilação.

Por três décadas, CO₂ supercrítico tem sido usado para extração e isolamento de compostos de valor de produtos naturais (DEL VALLE e AGUILERA, 1999). LEAL et al. (2003) estudaram as atividades antioxidantes dos extratos de várias plantas por SFE e LPSE (low pressure solvent extraction), sendo que, extratos obtidos por SFE têm apresentado maior atividade que os extratos obtidos por extração por LPSE.

Segundo PEREIRA et al. (2004) a fácil remoção do solvente do extrato final, a alta seletividade do processo e a possibilidade de utilização de temperaturas moderadas são vantagens significativas da SFE. Além disso, restrições legislativas são cada vez mais

severas relacionadas à presença de solventes orgânicos considerados tóxicos em determinados produtos (MENDES et al., 2003; DAUKSAS et al., 2002) voltados para o consumo humano e podem representar uma vantagem competitiva ainda maior da SFE.

2.3. UTILIZAÇÃO DE COSSOLVENTES OU MODIFICADORES

Devido ao seu comportamento não polar, o dióxido de carbono tem pouca afinidade com compostos polares (POURMORTAZAVI e HAJMIRSADEGHI, 2007; MCHUGH e KRUKONIS, 1994). Por isso o uso de cossolventes adequados tem sido proposto para melhorar a solubilidade dos compostos (SERRA et al., 2010). A mistura do CO₂ com uma pequena quantidade de cossolvente ou modificador, como a água, o etanol ou o isopropanol, pode aumentar consideravelmente o poder de solvatação da mistura para compostos polares (MENDES et al., 2003; GRIGONIS et al., 2005).

Os cossolventes polares interagem com os grupos funcionais do soluto facilitando a extração do mesmo, embora o aumento desta propriedade dependa da concentração do cossolvente (ZANCAN et al., 2002). O conceito de extração e separação da SFE, em que a água e o CO₂ supercrítico fluem no sentido descendente do extrator pode ser observado na Figura 2.4. Os compostos apolares são diretamente extraídos ou dissolvidos a partir da superfície e no interior da matriz em CO₂. Uma parte destes compostos é inicialmente dissolvida na água a partir da superfície ou no interior da matriz, e em seguida, dissolvida em CO₂. Os compostos apolares deverão ser recolhidos na fase CO₂. Por outro lado, os compostos polares são dissolvidos em água e coletados na fase aquosa.

Devido a necessidade de acrescentar uma etapa ao processo de extração, a remoção do solvente do extrato final, as quantidades de cossolvente utilizadas são geralmente reduzidas. É de grande importância que o solvente seja considerado um totalmente seguro ou solvente GRAS¹. Assim, todas as vantagens ambientais da extração supercrítica são mantidas (BRAGA et al., 2003). Recentemente, a água tem sido utilizada como cossolvente, e empregada na extração de compostos utilizados na fabricação de

¹ GRAS = Generally Recognized as Safe

nutracêuticos (KITADA et al., 2009) e em especial na aplicação em alimentos (MACHMUDAH et al., 2012). A utilização de água como cossolvente apresenta como vantagens um menor custo de processo e impacto ambiental, além de facilidade de manuseio (MARKOM et al., 2007).

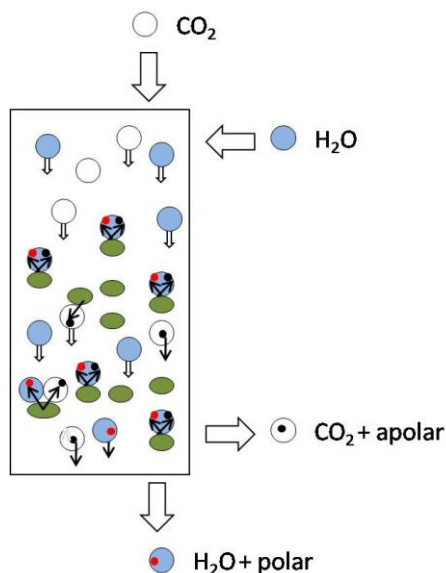


Figura 2.4. Extração e separação do processo SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Segundo MENAKER et al. (2004), CATCHPOLE et al. (2004) e DE MARIA et al. (1997) compostos polares são dificilmente extraídos por SFE usando somente CO_2 , havendo a necessidade de adição do modificador. CHIU et al. (2002) estudaram para várias condições de temperatura e pressão a SFE de terpenos e flavonoides de folhas de *Ginkgo biloba* L. usando CO_2 puro como solvente. De acordo com os resultados, somente o CO_2 não foi suficiente para extrair estes compostos. No estudo realizado por PEREIRA et al. (2004) na extração a partir de folhas e galhos de leiteira de dois irmãos (*Tabernaemontana catharinensis*) com cossolvente etanol, observou-se que, ao dobrar a porcentagem de cossolvente (etanol), obteve-se não só maior rendimento de extrato, mas também maior concentração dos compostos de interesse (alcalóides) no mesmo. Também, CASTRO-VARGAS et al. (2010) mostraram que o rendimento do processo SFE em termos de fração fenólica foi menor quando comparado ao processo soxhlet com etanol. Porém, ao adicionar

etanol como modificador na SFE, maiores rendimentos foram obtidos. Importante ressaltar que a escolha do cossolvente dependerá do composto de interesse.

MACHMUDAH et al. (2011) utilizaram o sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ a fim de extrair o ácido clorogênico e a cafeína dos grãos de café. Segundo estes autores, o aumento da pressão provocou uma melhora nas propriedades da água relacionadas com a taxa de transferência de massa do soluto no solvente, como a densidade, o produto iônico (K_w), e a constante dielétrica, ocasionando um aumento na eficiência da extração. Adicionalmente, um maior volume de água pode também inchar a matriz e favorecer a penetração do CO_2 supercrítico favorecendo a difusão do soluto para a superfície da matriz. Este mesmo comportamento foi observado na extração da cafeína e epigallocatequina galato do chá verde (KIM et al., 2008).

PARK et al. (2012) estudaram a desinfecção de grãos de trigo contaminados com esporos de *Penicillium oxalicum* com o sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. A inativação dos esporos *P. oxalicum* foi significativamente aumentada pela adição da água como cossolvente. Utilizando o mesmo sistema, KATAYAMA et al. (2012) desenvolveram um método para modificar a superfície do tecido de algodão (criação de vincos) a fim de suportar fortemente agentes funcionais e eliminar os agentes ligantes. De acordo com os autores, a água no qual o CO_2 à alta pressão foi dissolvido infiltra no interior do algodão dilatando-o, criando os vincos.

2.4. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)

Muitos países estão começando a aplicar normas ambientais estritas em quase todos os aspectos da vida humana devido às crescentes preocupações ambientais da sociedade (SUNARSO e ISMADJI, 2009). Nas últimas décadas, a indústria de alimentos tem se adaptado às crescentes exigências do consumidor, que se tem mostrado mais preocupado com a segurança alimentar e mais exigente em relação aos níveis de qualidade dos alimentos.

Os procedimentos de extração comuns utilizado no isolamento de compostos orgânicos a partir de plantas medicinais são: hidrodestilação, maceração, extração com solvente a baixa pressão (LPSE), entre outros. No entanto, estas técnicas geralmente

requerem tempos de extração elevados e pouca eficiência. Além disso, a presença de compostos termolábeis requer a utilização de técnicas a baixas temperaturas a fim de evitar a hidrólise, a solubilização em água e a degradação.

Além da extração supercrítica, a extração assistida por ultrassom (UAE: ultrasound-assisted extraction) é também considerada uma tecnologia limpa na indústria de alimentos e tem sido o tópico de muita pesquisa e desenvolvimento. O efeito que as ondas de ultrassom de alta potência têm sobre características físicas, bioquímicas e nas propriedades dos alimentos tem atraído um grande interesse. Este interesse é devido à possibilidade do ultrassom produzir uma variedade de efeitos, dependendo da combinação de características entre as ondas de ultrassom e o produto. Esta nova tecnologia “verde” também tem sido considerada em aplicações de sustentabilidade ambiental (CHEMAT et al., 2011).

O desenvolvimento da tecnologia do ultrassom e seu potencial benefício desencadearam um interesse de sua aplicação em uma ampla variedade de produtos químicos e em processos (MASON e LORIMER, 2002). Esta tecnologia pode oferecer uma alternativa econômica aos processos de extração tradicionais que utilizam matérias-primas de custo elevado (GARCIA-SALAS et al., 2010).

A extração assistida por ultrassom é um método eficaz na extração de constituintes químicos a partir de matrizes vegetais (PALMA e BARROSO, 2002; HROMÀDKOVÀ e EBRINGEROVÀ, 2003; DOBIÁŠ et al., 2010). A extração pode ser realizada em tempos mais curtos comparada a outras técnicas de extração, o que indica que este método pode ser potencialmente utilizado na extração de compostos termossensíveis utilizados em alimentos, produtos de saúde, cosméticos, e produtos farmacêuticos (DONG et al., 2010).

O ultrassom é um processo que utiliza a energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana, ou seja, acima de 20,0 kHz. As ondas de ultrassom se propagam na matéria, criando no meio em que se propagam ciclos de expansão e compressão no meio. Em um líquido, estas ondas criam um ciclo de expansão, o que produz uma pressão negativa, podendo gerar bolhas ou cavitação (LUQUE-GARCÍA e DE CASTRO, 2003).

Os principais efeitos do ultrassom na extração são o aumento da permeabilidade das paredes celulares, a produção de cavitações, ou seja, formação de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando em um forte estresse dinâmico e, conseqüentemente, o aumento do estresse mecânico das células, também chamado de fricção interfacial (CHEMAT et al., 2011). Desta forma, esta técnica pode facilitar a dilatação e a hidratação do material, aumentando o tamanho dos poros da parede celular e otimizando os processos de difusão e de transferência de massa. Um aumento no tecido celular ao dobro do seu volume pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, o que causa a saída de compostos celulares, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração (VINATORU, 2001).

A Figura 2.5 (a) mostra um estado de geração de bolhas quando um ultrassom é emitido em água. Dentro de alguns segundos, as bolhas crescem, ficam instáveis mecanicamente quando atingem um determinado tamanho e entram em contração rápida (BANKS, 2004). O processo pelo qual as bolhas se formam, crescem e sofrem colapso implosivo é conhecido por "cavitação". A Figura 2.5 (b) mostra uma bolha de cavitação em uma superfície do eletrodo sofrendo um colapso assimétrico levando a um microjet em que a solução é arrastada para fora em segundos.

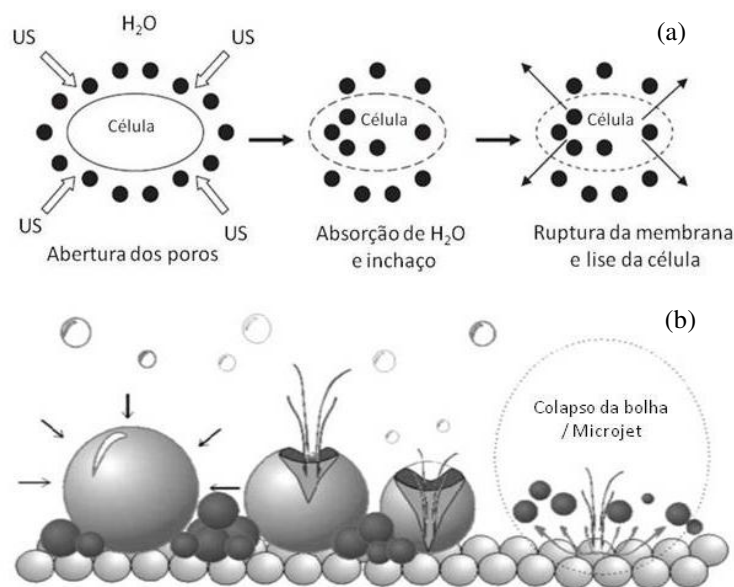


Figura 2.5. Mecanismo representando o colapso da bolha na superfície sólida (adaptado de CHEMAT et al., 2011; SEIDI e YAMINI, 2012).

O mecanismo de extração envolve dois tipos de fenômenos físicos: a difusão através da parede das células e a saída do conteúdo da célula, uma vez que as paredes estão rompidas (GAETE-GARRETÓN et al., 2011). Ondas de ultrassom interagem com a matriz a fim de alterar suas propriedades físicas e químicas; o efeito cavitacional dessas ondas facilita a liberação de compostos extraíveis e aprimora o transporte de massa alterando as paredes das células vegetais (CHEMAT et al., 2011; MASON et al., 1996; VINATORU, 2001; SHIRSATH et al., 2012). Melhora o inchamento da matriz, melhora a taxa de transferência de massa, resultando em um aumento da eficiência e/ou redução no tempo de extração (MELECCHI et al., 2006).

2.5. MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Foram selecionadas plantas nativas brasileiras ricas em compostos fenólicos de elevada capacidade antioxidante com elevado potencial econômico e que ainda não foram exploradas utilizando a extração com fluido supercrítico (SFE).

2.5.1. *HETEROPTERYS APHRODISIACA* (NÓ-DE-CACHORRO)

A *Heteropterys aphrodisiaca* O Mach (Nó-de-cachorro) (Figura 2.6) é uma espécie semi-arbustiva conhecida pelas populações tradicionais do estado de Mato Grosso por suas propriedades medicinais (COELHO et al., 2008). É tida como planta medicinal de grande importância devido ao poder curativo de enfermidades, principalmente devido a sua capacidade estimulante de memória e sexual, vasodilatação, revigorante físico e psicológico, antiulcerogênica, depurativo e antioxidante (POTT e POTT, 1994; MATTEI et al., 2001). É usada ainda para agravos no sistema reprodutivo, circulatório, digestivo e nervoso. A casca e a entrecasca da raiz são empregadas em soluções alcoólicas, principalmente contra debilidades nervosas e como afrodisíacas (MORAIS, 2003). As raízes e as folhas jovens são utilizadas para irritação e inflamação ocular, assim como para agravos na catarata (MACEDO et al., 2004). É também empregada na indústria alimentícia na fabricação de geléias, licores, vinhos e molhos picantes (GALVÃO et al., 1998).



Figura 2.6. Raízes de nó-de-cachorro (*Heteropterys aphrodisiaca* O Mach) (FLICKR, 2010).

COELHO e SPILLER (2008) comprovaram a presença dos seguintes compostos na raiz de nó-de-cachorro: polifenóis, taninos condensados e hidrossolúveis, alcalóides, glicosídeos flavônicos, glicosídeos aromáticos simples, glicosídeos cardiotônicos e saponinas. Foram isoladas as substâncias dihidroflavonoides como astilbina, neoastilbina e isoastilbina (MARQUES et al., 2007).

O efeito farmacológico e toxicológico do extrato das raízes de nó-de-cachorro no sistema nervoso de ratos idosos foi comprovado em pesquisa realizada por GALVÃO et al. (2002). Este mesmo extrato apresentou propriedade antioxidante cerebral por inibir a interação dos radicais livres com as biomoléculas presentes no cérebro de ratos jovens (MATTEI et al., 2001).

Devido à sua importância para bens medicinais, existem três patentes no INPI, duas referentes ao processo de obtenção e outra devido a sua propriedade farmacológica de ação virucida, antifúngica e antibacteriana. PALAZZO et al. (2000) constataram o efeito cicatrizante dos extratos das raízes de nó-de-cachorro em ratos ulcerados e SANTOS e CARLINI (2000) verificaram efeito afrodisíaco e a melhoria na memória de ratos idosos tratados com a dose de 50 mg/kg do extrato de raízes BST0298 (extrato liofilizado, código adotado pelo Laboratório Biosintética - Patente requerida, PI9803518-5). O extrato BST0298 apresentou atividade antiviral e virucida. A atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral foi comprovada por ROMAN-JÚNIOR et al. (2005) através do extrato BST0402 (extração por maceração com acetona, concentrado e liofilizado).

2.5.2. *INGA EDULIS* (INGÁ-CIPÓ)

O *Inga edulis* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) (Figura 2.7) é uma árvore nativa das florestas tropicais da América, seus extratos têm sido usados na medicina popular como antiinflamatório e diurético (SILVA et al., 2007a). O ingá destaca-se principalmente devido ao sabor exótico e aos componentes nutricionais como açúcar e sais minerais presentes na polpa (ARÉVALO-PINEDO et al., 2004).

Estudos prévios da espécie mostraram elevados valores de capacidade antioxidante e conteúdo fenólico em extratos de suas folhas (SOUZA et al., 2008; SILVA et al., 2007b), e de acordo com seu perfil fitoquímico, compostos fenólicos como catequina, epicatequina, miricetina-3-ramnopiranosídeo, quercetina-3-ramnopiranosídeo e quercetina-3-glucopiranosídeo foram revelados (SOUZA et al., 2007).



Figura 2.7. Folhas de Ingá-cipó (*Inga edulis* Mart) (FLICKR, 2010).

No estudo realizado por SOUZA et al. (2008), foi verificada a ocorrência de compostos com capacidade antioxidante significativa nas folhas de ingá-cipó que podem ser utilizados em aplicações farmacêuticas e medicinais. A capacidade antioxidante (AA) e os polifenóis do extrato das folhas de ingá-cipó utilizando metanol-água foi medida por SOUZA et al. (2007). O extrato bruto seco apresentou valores de AA igual a 11,16 mmol equivalente trolox/g e 496,5 mg de catequina equivalente/g.

SILVA et al. (2007a) otimizaram as condições para extração dos compostos fenólicos das folhas de ingá-cipó, maximizando simultaneamente o rendimento em

fenólicos totais (TP), flavonoides totais (TFA) e fenóis totais (TFO). As condições otimizadas foram 86,8 % de etanol, 331 K e tempo de 46,8 min, contendo 134,6 mg de ácido gálico equivalente/g (b.s), 26 mg de catequina equivalente/g (b.s) e 13,8 mg de rutina equivalente/g (b.s) respectivamente para TP, TFA e TFO.

De acordo com DIAS et al. (2010), frações enriquecidas em polifenóis de folhas de ingá-cipó foram obtidas a partir de extrações líquido-líquido e em fase sólida (SPE-C₁₈). Também se observou uma importante elevação da capacidade antioxidante desta fração, mostrando a importância dos compostos fenólicos como potentes agentes antioxidantes.

2.5.3. *PHASEOLUS VULGARIS* L. (FEIJÃO)

O feijão é uma leguminosa largamente consumida no mundo, estando-lhe associadas diferentes propriedades nutricionais (BOATENG et al., 2008) (Figura 2.8). O Brasil é um dos principais produtores e o consumo anual é em torno de 19,18 kg/hab/ano existindo preferência de cor, tipo de grão e qualidade culinária em algumas regiões do país (AGRIANUAL, 2010). É amplamente conhecido por ser fonte rica e relativamente barata de proteínas (20-25 %), carboidratos (50-60 %) (RANILLA et al., 2009), fibras e minerais (BOATENG et al., 2008).



Figura 2.8. Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (FLICKR, 2010).

Além dos componentes nutricionais que o feijão apresenta, este é rico em uma variedade de fitoquímicos como flavonoides (incluindo os flavonóis, seus glicosídeos, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas) bem como alguns ácidos fenólicos (ácido p-

cumárico, ácido sinápico e ácido felúrico) (SUTIVISEDSAK et al., 2010; APARICIO-FERNANDEZ et al., 2005; LITHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006). A semente do feijão contém uma série de compostos bioativos tais como inibidores da enzima (α -amylase), lecitinas, fitatos, oligossacarídeos e fibras solúveis (RANILLA et al., 2007). As proantocianidinas são o grupo mais amplamente distribuído de flavonoides em feijão (BENINGER e HOSFIELD, 2003; GUZMÁN-MALDONADO et al., 1996), as quais são associadas a sua atividade antioxidante, principalmente nas cascas das sementes (BENINGER e HOSFIELD, 2003; RANILLA et al., 2009).

O extrato etanólico do feijão guandu estudado por TSUDA et al. (1994) apresentou intensa atividade antioxidante. Ainda, hoje em dia, o grão de feijão é o mais popular usado em prevenção de doenças como câncer de colo de útero, redução do risco de diabetes, obesidade e doenças coronárias (ROSS et al., 2009). OOMAH et al. (2006) mencionam que o efeito protetor do feijão na prevenção de doenças como câncer pode não ser inteiramente associado a fibra dietética, mas aos compostos fenólicos e outros compostos nutritivos. LIN et al. (2008) identificaram alguns flavonoides como o 3-O-glicosídeo, delphinidina, petunidina, malvidina, canferol, quercetina-3-O-glicosídeo entre outros em várias espécies estudadas.

2.5.4. PYROSTEGIA VENUSTA (CIPÓ-DE-SÃO-JOÃO)

Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers (Figura 2.9) é conhecida popularmente como cipó-de-são-joão, é de ampla distribuição no Brasil, desde o sul ao nordeste, com exceção do norte (LORENZI, 1991). É cultivada pelo aspecto vistoso e por suas consideradas propriedades terapêuticas (DUARTE e JURGENSEN, 2007). Suas folhas e caules são utilizados na medicina tradicional como tônico e no tratamento de diarreia, disenteria (FERREIRA et al., 2000; KUMAR et al., 2012), tosses, gripes e resfriados e bronquite (SCALON et al., 2008). As flores são utilizadas para o tratamento de manchas brancas no corpo (vitiligo) (FERREIRA et al., 2000; KUMAR et al., 2012).



Figura 2.9. Folhas de cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*) (FLICKR, 2010).

A partir da casca de *P. venusta* é preparada uma infusão muito utilizada no tratamento de infecções uterinas e do trato genital feminino, erisipela e icterícia (hiperbilirubinemia e deposição de pigmentos biliares) em bebês recém-nascidos (SENS, 2002). Banho das folhas ajuda no controle de micoses, manchas brancas da pele e provoca rejuvenescimento na pele (MARTINS et al., 2000).

Foram isolados e caracterizados a partir das folhas o β -sitosterol, *n*-hentriacontano, acacetina-7-*O*- β -D-glicopiranosídeo, mesoinositol, estigmasterol, β -amirin, ácido oleanólico (DUBEY e MISRA, 1976; KRISHNA et al., 2002), e rutina (BLATT et al., 1998); das flores o β -sitosterol, *n*-hentriacontano, 7-*O*- β -D-glicopiranosilacacetina e meso-inositol (DUBEY e MISRA, 1976) e a partir do extrato etanólico das raízes a alantoína, esteróides β -sitosterol e 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol e a flavanona hesperidina (FERREIRA et al., 2000). Além disso, de acordo com o estudo de PINHO et al. (2009), a *P. venusta* apresentou altas concentrações de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico, com 56,2 %, tendo um potencial significativo como biocombustíveis e como recursos renováveis para a indústria química do óleo. KUMAR et al. (2012) relatam que as flores consistem de ácido galotânico e glicosídeo, o qual é amargo, picante, digestível, e utilizado como laxante, antiinflamatório, contra asma e bronquite, e dor de garganta.

Segundo estudo de TINOI et al. (2006), foram identificados os carotenóides β -caroteno, luteína, β -criptoxantina, neoxantina, violaxantina, e zeaxantina nos extratos de cipó-de-são-joão. A partir da extração concentrada das folhas, DOS SANTOS e BLATT

(1998) determinaram a presença de classes diferentes de flavonoides e fenóis. Os valores obtidos foram 1,72 % e 1,87 % de fenóis totais e, 0,62 % e 0,53 % de flavonoides para a mata e cerrado, respectivamente.

2.5.6. *HYMENAEA COURBARIL* (JATOBÁ)

A *Hymenaea courbaril* L. (Figura 2.10), pertencente à família *Fabaceae*, é vulgarmente conhecida como jatobá (FERNANDES et al., 2005). É popularmente utilizada como carminativa, sedativa e adstringente; o chá da casca é recomendado para diarreia, disenteria e cólicas intestinais (LORENZI e MATOS, 2002). Análises químicas de seus extratos apontam sua importância em compostos biologicamente ativos, incluindo diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides e oligossacarídeos (NOGUEIRA et al., 2001).



Figura 2.10. Casca de jatobá (*Hymenaea courbaril* L) (FLICKR, 2010).

As folhas e cascas são ricas em terpenos e fenóis com várias atividades biológicas atuando como proteção contra infecções e ataque de insetos (MARQUES et al., 2007), ação antimicrobiana (ROBBERS et al., 1997; MARTINS et al., 2010; GONÇALVES et al., 2005), atividade antifúngica e antibacteriana e moluscidas (FERNANDES, 2005). Além disso, são usados como adstringente nas afecções da bexiga e próstata, bronquites, tosses e coqueluche (CHAVES et al., 2008).

Suas árvores são caracterizadas por suas resinas com alta proporção de ácidos diterpênicos, antimicrobianos fortes (ABDEL-KADER et al., 2002). Os extratos da casca de jatobá apresentam alta atividade inibitória de 5-lipoxigenase (BRAGA et al., 2000); e também tem sido usado na indústria cosmética, devido a poli catequinas, com efeitos

hidratantes e de clareamento da pele (PETTIT et al., 2003). É sabido que o alto teor de compostos fenólicos em extratos de jatobá é devido à presença de taninos condensados, sendo oligômeros e polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavonoides, também conhecido como poliflavonoides e está presente na maioria das plantas superiores (GU et al., 2003).

Um estudo fitoquímico resultou no isolamento de uma série de flavonoides de estruturas variadas (PETTIT et al., 2003). Alguns destes produtos químicos, como ácido copálico, delta-cadineno, cariofileno e alfa-humuleno, teriam sido empregados como um paliativo, anti-séptico, adstringente, expectorante, laxante, purgativo, estimulante, sedativo e tônico na medicina popular (ABDEL-KADER, 2002; LORENZI e MATOS, 2002). GRANATO et al. (2005) estudaram a caracterização química qualitativa e avaliação microbiológica de resíduos da casca de jatobá; os extratos de metanol obtidos por soxhlet indicaram a presença de compostos fenólicos e atividades antioxidante contra microorganismos.

2.4. AUMENTO DE ESCALA

Nas últimas décadas, a extração de produtos naturais utilizando a SFE tem sido inserida em escala industrial, assim como o número de plantas industriais está aumentando. O aumento de escala ocorre geralmente em resposta ao aumento da demanda do produto, e principalmente quanto aos elevados custos de produção (BLOCK, 2005). Portanto, é de grande importância desenvolver e aplicar procedimentos para otimização do processo de extração, tendo a necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para implementação das condições operacionais de extração (BLOCK, 2005).

Informação preliminar como testes laboratoriais é fundamental para assegurar a praticabilidade do processo e obter informação para validar o impacto econômico do processo em escala industrial (MUÑOZ et al., 2007). Além disso, a obtenção das condições ótimas de extração, considerando a qualidade do produto, o rendimento e a economia do processo são necessários para então implementação em escala industrial (BERNA et al., 2000).

O design de uma planta de extração supercrítica industrial é baseado geralmente em experimentos de planta piloto. A planta piloto é utilizada primeiramente para determinar as condições ótimas de extração, realizando uma varredura em diferentes pressões, temperaturas e solventes, e em seguida a obtenção de dados termodinâmicos e cinéticos (SOVOVÁ e SAJFRTOVA, 2005).

MARTINEZ (2005) afirma que o grande desafio está na escolha dos critérios, isto é, quais parâmetros e condições devem ser mantidos constantes, quais devem variar, e como devem variar para reproduzir em grande escala curvas de extração. Diante disso, o processo de extração SFE deve visar a otimização das variáveis tempo de extração e rendimento do processo, as quais afetam diretamente na viabilidade econômica do processo (AL-JABARI, 2002). Portanto, é importante que se encontre as melhores condições operacionais que maximizem a taxa de extração e a quantidade de extrato obtido de uma matriz vegetal.

Segundo BRUNNER (2005), o conceito de larga escala refere-se a extratores com volumes maiores de 20.000 litros, como por exemplo, o processo de descafeinação do café. Atualmente, a maioria dos extratores é projetada para capacidade menor que 1.000 litros. Ainda assim, existe informação limitada na literatura de dados de aumento de escala para grandes sistemas industriais de extração SFE. EGGERS e SILVERS (2003) estudaram o aumento de escala (10 x) para um processo de produção do óleo de prímula utilizando a SFE. Segundo os autores, os parâmetros como o tempo de residência do solvente e a relação entre o índice de óleo carregado com solvente e a altura do leito fixo foram importantes no aumento de escala.

DEL VALLE et al. (2004) demonstraram que ocorrem diferenças no fenômeno de transferência de massa ao mudar da escala analítica à piloto e que este comportamento pode estar relacionado à heterogeneidade do escoamento do solvente no leito, à dispersão de soluto entre o extrator e separador, e/ou no arraste de gotas do extrato no ciclo de solvente. Além disso, segundo REVERCHON e MARRONE (1997) o mecanismo de transferência de massa pode alterar entre as diferentes espécies e estruturas vegetais a serem utilizadas na extração.

Dentro deste contexto, muitos critérios de aumento de escala para processo SFE podem ser encontrados na literatura. Segundo PRADO et al. (2011), utilizando um simples critério pode ajudar a desenvolver um método de aumento de escala facilmente aplicável, o que diminuiria o tempo e o custo empregado no desenvolvimento do processo SFE. O simples critério de escala adotado por PRADO et al. (2011) consiste em manter constante a proporção entre a massa de solvente e a massa de alimentação para um tempo de residência constante. Os autores estudaram o aumento de escala (15 x) para o resíduo de cana-de-açúcar e cravo em escala laboratorial (0,29 L) e piloto (5,15 L). O rendimento foi ligeiramente maior nos experimentos em escala piloto para o cravo, 20 % e para o resíduo de cana-de-açúcar, 15 %. O mesmo critério foi mantido por PRADO et al. (2012) no estudo do aumento de escala (17 x) para a semente de uva (*Vitis vinifera* L.). O rendimento em escala piloto foi 6 % maior comparado à escala laboratorial.

2.5. SIMULAÇÃO DE PROCESSOS E CUSTO DE MANUFATURA

As ferramentas da simulação de processos têm sido utilizadas nas indústrias químicas e petroquímicas desde 1960 (TOUMI et al., 2010). A simulação de processos facilita a avaliação, o desenvolvimento e o aumento de escala a fim de estimar os custos do processo. Adicionalmente, os simuladores permitem encurtar o tempo necessário para o desenvolvimento do processo, comparar alternativas de processos, processando e analisando interativamente um grande número de informações; e estudar as interações existentes entre as correntes de entrada e saída das várias operações unitárias integradas (ROULF et al., 2001).

Geralmente, as maiores aplicações dos simuladores estão em avaliar e otimizar processos integrados. Este pode ser aplicado em diversos estágios durante o processo da comercialização, sendo também utilizados na seleção do projeto baseado na análise econômica ou em outra exigência crítica do processo. Através do simulador é possível o ajuste do processo e das condições operacionais permitindo que uma indústria reduza os custos (LEAL et al., 2006) e o tempo em laboratório e planta piloto (JULLY et al., 2004).

Desta forma, a simulação de processos surge como uma alternativa interessante, visando a diminuição dos custos com experimentação e otimização do processo

previamente à instalação de uma unidade industrial. Adicionalmente, o simulador facilita a transferência da tecnologia assim como o projeto de novos processos, além de estimar todos os custos exigidos no processo (VEGGI, 2009).

O simulador de processos SuperPro Designer[®] é considerado um dos simuladores mais completos e muito utilizado em processos tecnológicos e de produtos bioquímicos. É também empregado em modelagens bioquímicas, em indústrias alimentícias e farmacêuticas, assim como em outros processos contínuo ou em batelada (ATHIMULA et al., 2006). O *software* permite a criação de projetos diferenciados, dimensionando equipamentos e estimando o custo preliminar do processo através da integração com ferramentas de outros processos de engenharia e de modelagem de custo. Além disso, é possível avaliar o capital de investimento no início do projeto.

Desta forma, as principais vantagens deste simulador consistem em uma vasta base de dados com compostos químicos específicos e operações unitárias, e a avaliação econômica do processo, além de fornecer o detalhamento dos resultados como relatórios de avaliação econômica e dos dados de entrada e saída (FLORA et al., 1999).

MISAILIDIS et al. (2009) obteve sucesso ao utilizar o *software* SuperPro Designer[®] para analisar três alternativas de bio-processamento para a co-produção de arabinosilano em uma operação de biorefinaria de trigo. Segundo os autores, a economia foi melhorada com a co-produção de arabinosilano e com a adição de uma reciclagem para outros componentes críticos do processo. KOTOUPAS et al. (2006) realizaram a avaliação econômica e verificaram o impacto ambiental no tratamento de águas residuais do soro do queijo. Através da simulação foi demonstrado que procedimentos baseados em unidade de membrana como ultrafiltração e osmose reversa podem ser facilmente modelados utilizando o *software*.

PRADO et al. (2012) avaliaram a viabilidade econômica do processo utilizando o simulador SuperPro Designer[®] a fim de obter dados consistentes de forma a apoiar o interesse de um potencial investimento na produção de extratos obtidos por SFE em larga escala.

MONTAÑÉS et al. (2012) estudaram o aumento de escala (1.000.000 x) e a viabilidade econômica para o isolamento de prebióticos utilizando SFE, utilizando o

software AspenONE[®] V7.3. De acordo com os resultados, o processo foi considerado rentável.

Apesar da utilização do *software* estar focado na indústria de bioprocessos, este tem sido bastante empregado no *design* e na simulação do processo SFE, principalmente no estudo do aumento de escala e na viabilidade econômica do mesmo. Segundo PERRUT (2000), apesar da tecnologia supercrítica ser considerada uma técnica viável para a obtenção de extratos de alta qualidade, ela é conhecida por produzir extratos de alto custo devido a elevados investimentos relativos à operação em alta pressão. Em contrapartida, ao comparar as propriedades e a qualidade dos extratos obtidos por diferentes processos, a SFE se torna competitiva e um processo alternativo de extração (MEIRELES, 2003).

A viabilidade econômica do processo SFE, ou seja, o custo de manufatura (COM) do extrato está diretamente relacionado com alguns fatores como o rendimento, produtividade e a seletividade do processo (AL-JABARI, 2002; ROSA e MEIRELES, 2005). Desta forma, uma maior quantidade do extrato e/ou do composto alvo obtido em menor tempo de extração resultará em um menor COM.

O grupo de pesquisa LASEFI/Unicamp vem estudando o aumento de escala e alguns trabalhos foram publicados sobre simulação e estimativa da viabilidade econômica do processo SFE em escala industrial (ROSA e MEIRELES, 2005; MARTÍNEZ et al., 2007; TAKEUCHI e MEIRELES, 2007; PRADO et al., 2011; PRADO et al., 2012). Os estudos concluíram que o critério de aumento de escala mantendo S/F (razão entre solvente e massa de alimentação) em tempo de residência constante apresenta boa concordância entre os dados de escala piloto e laboratorial.

Portanto, o processo de aumento de escala permite simplificar o estudo do processo SFE, sendo possível uma previsão do comportamento do processo em escala industrial a partir de dados de laboratório sem necessidade de cálculos complexos (PRADO et al., 2011). Desta forma, dados em escala laboratorial podem ser usados para avaliar o economicamente o processo SFE.

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

As Figuras 3.1 e 3.2 apresentam o diagrama de fluxo das atividades realizadas. As atividades encontram-se detalhada nas seções a seguir.

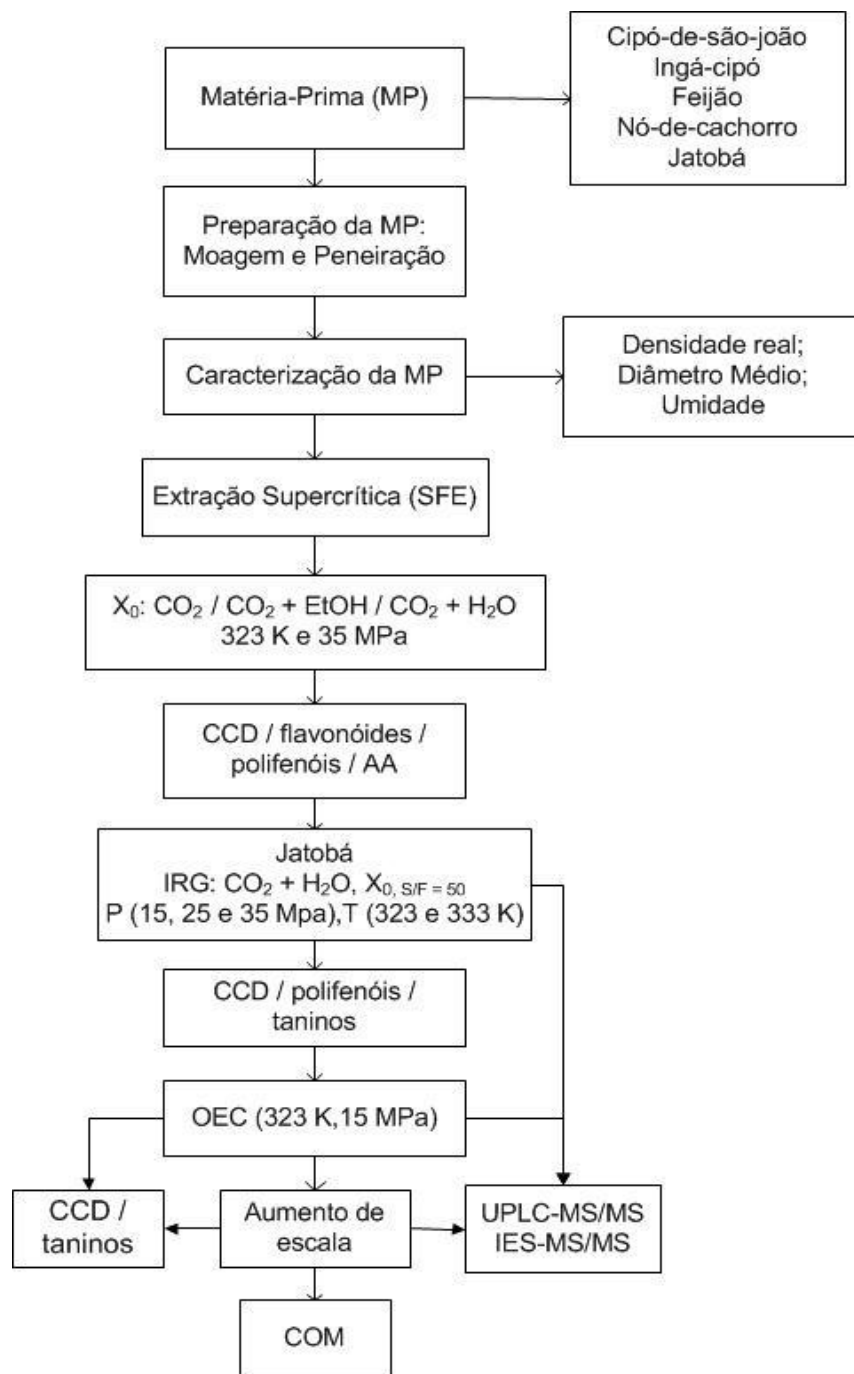


Figura 3.1. Diagrama de fluxo das atividades realizadas na etapa SFE.

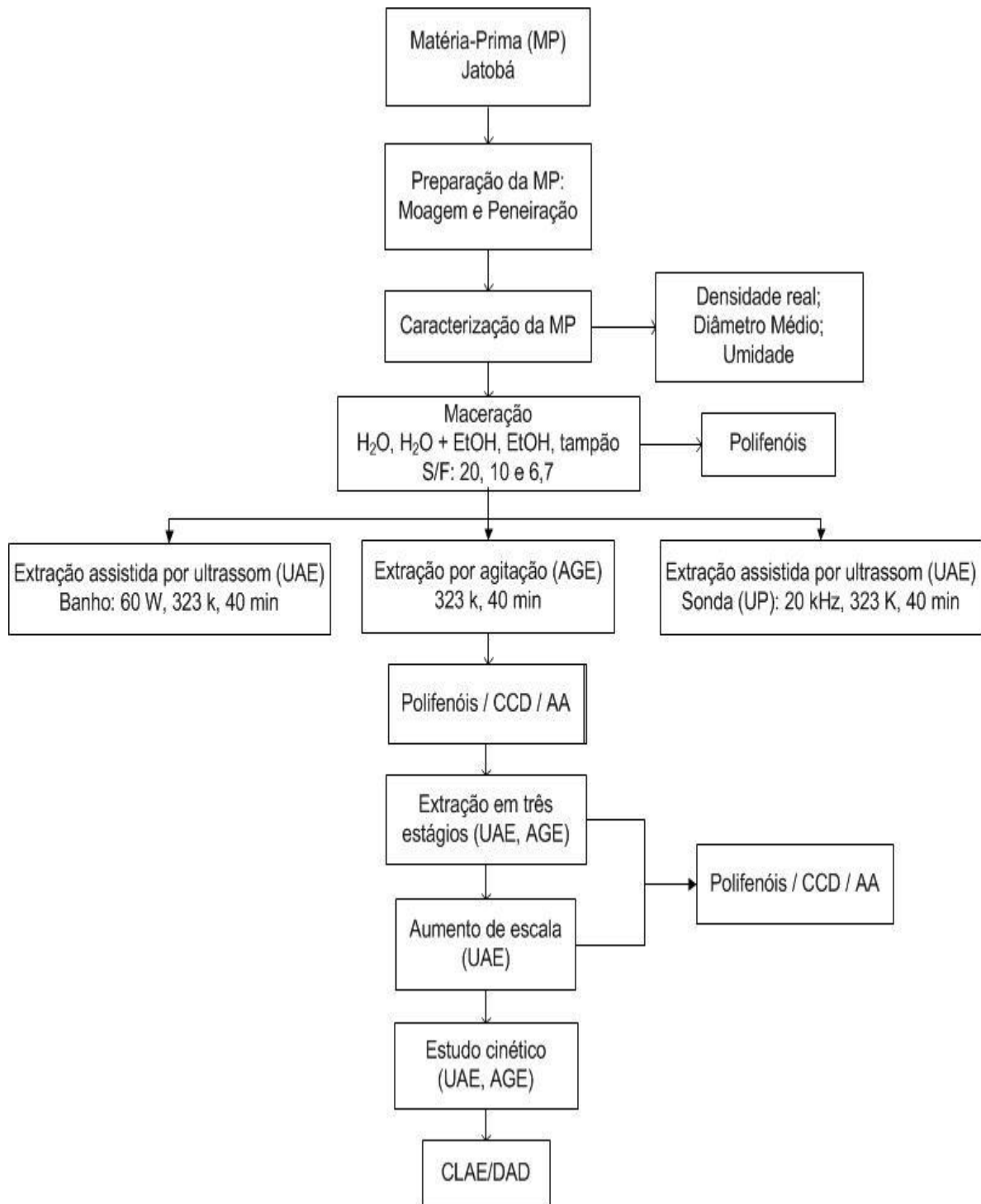


Figura 3.2. Diagrama de fluxo das atividades realizadas na etapa UAE.

3.1. MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. ORIGEM E PREPARO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas nó-de-cachorro (raiz), jatobá (casca do tronco - Lote 1), cipó-de-são-joão (folhas), ingá-cipó (folhas) foram adquiridas da empresa Superextra Brasil (São Paulo, SP). O jatobá (Lote 2) foi adquirido da empresa Nutry Brasil (São Paulo, SP) e o feijão (BRS grafite) utilizado neste trabalho foi doado pela Embrapa Arroz e Feijão (Goiás, GO).

As amostras foram moídas em moinho de facas (Marconi, modelo MA 340, Piracicaba, SP) e fracionadas com o uso do jogo de peneiras Tyler (W.S. Tyler, EUA) de 16, 24, 32, 48 e 80 mesh, posicionado em um vibrador magnético (Bertel, São Paulo, SP) e deixado por 15 minutos no indicador 10. Cada fração da amostra foi pesada em balança semi-analítica (Marte, AS200, $\pm 0,01g$, Alemanha), acondicionada em sacos plásticos e armazenada em freezer doméstico (Metalfrio, HC-4, São Paulo, SP) a 263 K.

3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.2.1. UMIDADE

A umidade da matéria-prima foi determinada pelo método de destilação com solvente imiscível xilol (JACOBS, 1973), método este recomendado para produtos que contém óleo volátil.

Para a determinação, foram utilizados 0,025 kg do material moído e 100 cm³ de xilol (P.A., Ecibra, lote 17463, São Paulo, SP) em balão de 250 cm³. O sistema foi levado à ebulição com auxílio da manta de aquecimento e mantido sob refluxo por 1 hora e 30 minutos. Após o resfriamento, mediu-se o volume de água no tubo coletor. O experimento foi realizado em duplicata.

A umidade do material, expressa em porcentagem (% em base úmida) foi calculada pela (Equação 3.1).

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde:

U: umidade;

V_{H_2O} : volume de água extraída da amostra (m^3);

ρ_{H_2O} : densidade da água ($996,51 \text{ kg/m}^3$) nas condições ambientais do laboratório (300 K);

m: massa da amostra (kg).

3.1.2.2. DENSIDADE REAL, DENSIDADE APARENTE E POROSIDADE DO LEITO

A densidade aparente (d_a) foi calculada usando-se o volume total da célula de extração e a massa total das plantas necessária para empacotá-la (Equação 3.2).

$$d_a = \frac{m}{V} \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde: m = massa de matéria-prima seca e moída; V = volume; d_a = densidade aparente.

A densidade real (d_r) das partículas foi determinada por picnometria com gás hélio na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. A porosidade total (leito + partículas) (ε) foi calculada com as densidades aparente e real.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (\text{Equação 3.3})$$

3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção dos extratos, foram utilizadas as seguintes unidades de extração SFE: i) SFE-II: sistema Spe-ed (Applied Separations, modelo 7071, Allentown, EUA) para extrações utilizando somente CO_2 como solvente da extração; ii) SFE-I: unidade de cossolvente para extrações utilizando $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ como solvente da extração; iii) SFE-Ii: unidade de cossolvente para extrações utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente da extração; iv) unidade piloto com dois extratores de 5 L ($2 \times 5\text{L}$) (Thar Technologies, Pittsburgh, EUA) (Figura 3.3). As dimensões dos leitos das unidades podem ser verificadas na Tabela 3.1.

Para as extrações utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (10 %, massa), a unidade SFE-I (Figura 3.3b) foi modificada após algumas tentativas de extração em que foram encontrados alguns problemas. Desta forma, o equipamento passou por uma alteração no funcionamento da

bomba e do extrator durante um período de quatro meses aproximadamente. Os problemas encontrados e as soluções foram:

- Problema: Retorno da água na bomba pneumática - booster (Maximator mod PP 111-VE MBR, Alemanha) e congelamento. Primeiramente, esta foi substituída por uma bomba de alta pressão (Thermo Separation Products, Modelo 3200, P/F, Fremont, EUA), assim, enquanto esta operava no modo pressão, a outra operava no modo vazão de cossolvente. Porém, a pressão de operação do sistema não estava sendo atingida. Solução: foi feito novamente uma substituição por outra bomba pneumática disponível, e a elevação desta para eliminar qualquer efeito da gravidade, já que esta não estava bombeando antigravidade, e a remoção da válvula back pressure que estava permitindo o retorno da água na bomba de CO₂. A válvula back pressure é utilizada em processos SFE como uma válvula de alívio de pressão, possibilitando a recirculação de excesso de fluido. Esta foi substituída por uma válvula reguladora de pressão do ar comprimido ligando diretamente o compressor à bomba;
- Problema: a água do sistema não estava sendo arrastada juntamente com o CO₂ na corrente de saída do extrator. Solução: primeiramente aumentou-se a vazão de extração verificando que somente na despressurização do sistema a água escoava; em seguida, foi inserido um misturador elétrico (Thermo Separation Products, LC mixer 1,0 cm³) na saída de água e CO₂, não solucionando o problema.
- Problema: o sistema não funcionou mesmo com as mudanças realizadas. Solução: o extrator foi invertido, de forma que a alimentação da mistura CO₂ + H₂O ficasse na parte superior e a saída na parte inferior do extrator.
- Problema: manutenção da vazão do sistema. Solução: acoplamento de um rotâmetro (Cole-Parmer, 150-mm Correlated Flowmeter, Fo-YO-03227-30) para melhor controle da vazão durante a extração.



Figura 3.3. Unidades de extração supercrítica utilizadas no estudo. SFE-II (a), SFE-I e SFE-Ii (b) e piloto (c).

Tabela 3.1. Características das unidades de extração e seus leitos (PRADO, 2010).

| Unidade | d_b (cm) | H_b (cm) | V (cm ³) | Q_{CO_2} (kg/s) |
|---------|------------|------------|------------------------|----------------------|
| SFE-I | 3,41 | 46 | 415 | $1,0 \times 10^{-4}$ |
| SFE-II | 5,42 | 12,54 | 290 | |
| e | 2 | 2,09 | 6,57 | $5,5 \times 10^{-4}$ |
| SFE-Ii | 2 | 1,46 | 4,60 | |
| Piloto | 10,34 | 61,4 | 2×5150 | $3,3 \times 10^{-3}$ |

d_b - diâmetro do leito; H_b - altura do leito; V - volume do leito; Q_{CO_2} - vazão máxima de CO₂.

3.2.1. RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

Nesta etapa, foi determinada a quantidade total de material ou rendimento global (X_0) solúvel em CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O presente nas matérias-primas sob condição fixa de temperatura, pressão e S/F (razão entre a massa de solvente e sólido). A temperatura e pressão selecionada para extração foram de 323 K e 35 MPa, já que em condições de pressão elevada e temperatura moderada, o CO₂ supercrítico apresenta alta densidade, promovendo a solubilização de diferentes compostos normalmente encontrados nos extratos SFE.

Foram utilizadas 3 ± 1 gramas de matéria-prima nas extrações utilizando CO₂ e 10 ± 1 gramas de matéria-prima nas extrações utilizando CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O, mantendo constante a densidade aparente das matérias-primas. A relação S/F de 50 foi fixada e mantida constante.

Considerou-se uma mistura dos solventes no misturador em uma proporção mássica de 10 % (9:1) de CO₂: EtOH e CO₂: H₂O. Desta forma, a vazão média do solvente (CO₂) e dos cossolventes (EtOH e H₂O) foi de $1,11 \times 10^{-4}$ kg/s e $1,1 \times 10^{-5}$ kg/s, respectivamente. O tempo para as extrações utilizando CO₂ supercrítico puro como solvente variou de 40 ± 2 min e, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O em 77 ± 2 min.

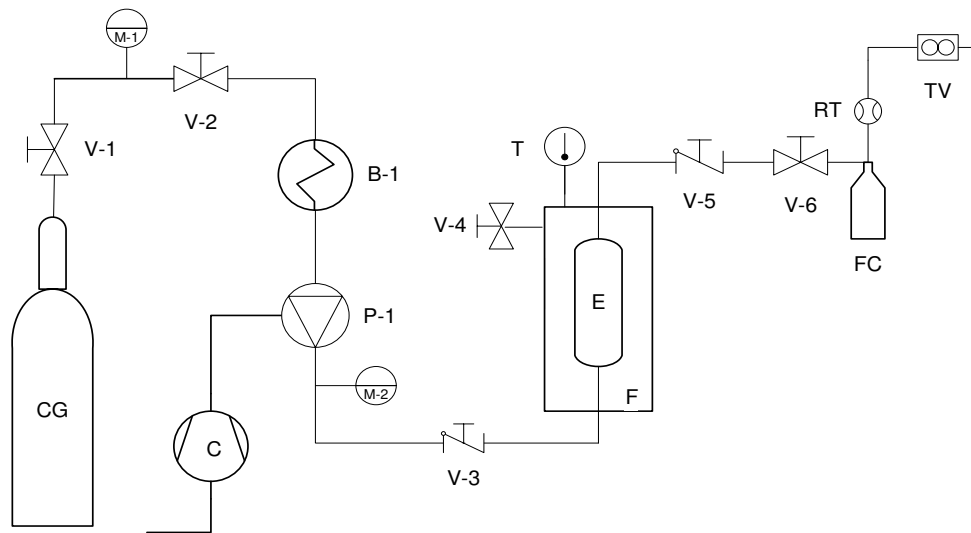
A quantidade total de material solúvel em CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O foi calculada como a razão entre a massa total do extrato e a massa total inicial de matéria-prima (base seca), sendo os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.1.1. EXTRAÇÃO UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO PURO COMO SOLVENTE

Foi utilizado o sistema de extração supercrítica Spe-ed (Applied Separations, Allentown, USA) equipado com uma célula de extração de 5 cm³ (Thar Designs, Pittsburgh, USA). Um esquema simplificado do sistema está representado na Figura 3.4.

Um banho termostático (B-1) ajustado em 263 K garante que o CO₂ esteja líquido antes de entrar na bomba. O sistema de pressurização é formado por uma bomba pneumática (P-1), onde o CO₂ é comprimido à pressão de extração. Em seguida, o solvente flui em um leito fixo (E) formado com a matéria-prima instalado dentro de um forno com aquecimento elétrico. A temperatura do processo é controlada por um termopar na parede exterior do extrator, sendo que esta temperatura é considerada ser igual à do interior do extrator. O extrato é coletado após a válvula de expansão micrométrica (V-6) em um separador, um frasco coletor de 50 cm³, à pressão atmosférica, que age como um separador flash, em intervalos de tempo predeterminados. Depois de passar através do rotâmetro (RT), o solvente passa através de um totalizador de vazão e é então liberado para o ambiente.

Ao final do processo de despressurização, o sistema passou por uma limpeza, na qual circulou etanol (Synth, Pureza > 99,5 %, lote 75474, Diadema, SP) pela tubulação de saída da célula de extração. Para eliminação do solvente, foi utilizado o evaporador rotativo (Laborota 4001, Heidolph, Viertrieb, Alemanha) para quantificar o extrato removido na limpeza.



CG - Cilindro de CO₂

C - Compressor

B-1 - Banho de resfriamento de CO₂

P-1 - Booster

F - Forno de aquecimento

E - Extrator

FC - Frasco coletor

RT - Rotâmetro

TV - Totalizador de vazão

Válvulas

V-1 - de bloqueio CO₂

V-2 - de retenção

V-3 - de entrada de CO₂

V-4 - de alívio

V-5 - de saída CO₂ + extrato

V-6 - micrométrica

M - Manômetros

T - Termopar

Figura 3.4. Esquema simplificado da unidade de extração Spe-ed (SFE-II).

Procedimento operacional da unidade:

- Ligou-se o banho de resfriamento (B-1) e esperou-se alcançar a temperatura entre 263 e 268 K;
- Verificou-se se todas as válvulas (V-1, V-2, V-3, V-4 e V-5) estavam fechadas e ligou-se o equipamento e o compressor (C);
- Conectou-se a linha de saída do CO₂ no frasco coletor (FC), previamente tarado, e depois se conectou o frasco coletor (FC) na linha de saída de CO₂ + extrato;
- Abriram-se as válvulas de bloqueio (V-1) e de retenção (V-2) de CO₂;
- Ligou-se a bomba de pressurização do CO₂ (P-1);
- Conectou-se o extrator (E), com a matéria-prima empacotada, no forno (F);

- Abriu-se lentamente a válvula de entrada de CO₂ (V-3) para pressurização do sistema e verificou-se que não havia vazamento, nem no extrator (E) nem na linha do sistema;
- Regulou-se vagarosamente a pressão na bomba (P-1) até a pressão de operação e verificou-se novamente se não havia vazamento;
- Configurou-se a temperatura do forno (F) para a temperatura de operação e a temperatura da válvula micrométrica (V-6) e ligaram-se os botões de temperatura do forno (F);
- Ajustou-se a pressão de operação (após alcance das temperaturas de operação) na bomba (P-1) e esperou-se 10 minutos para a estabilização do sistema;
- Colocou-se o frasco coletor (FC) em banho de gelo onde foi mantido parcialmente imerso para evitar degradação do extrato durante a extração;
- Abriu-se vagarosamente a válvula de saída de CO₂ + extrato (V-5) para iniciar a extração;
- Ajustou-se a vazão do CO₂ através da válvula micrométrica (V-6) que foi mantida constante durante o período de extração e medida pelo rotâmetro (RT) e pelo totalizador de vazão (TV);
- Após o tempo pré-estabelecido de extração, fechou-se a válvula de saída de CO₂ + extrato (V-5) e fechou-se a válvula de entrada de CO₂ (V-3);
- Diminuiu-se a pressão da bomba (P-1) até pressão do cilindro de CO₂ (CG) e desligaram-se os botões de temperatura do forno (F) e da válvula micrométrica (V-6);
- Retirou-se o frasco coletor (FC) de extrato acoplou-se frasco de coleta de limpeza, previamente tarado;
- Abriu-se vagarosamente a válvula de saída (V-5) para a total despressurização do sistema;
- Desconectou-se o extrator (E) das linhas e lavou-se, com auxílio de seringa, a linha de saída de CO₂ + extrato com álcool etílico, coletando-se no mesmo frasco da despressurização;

- Após o procedimento de limpeza, retirou-se o frasco de coleta de limpeza;
- Acoplou-se outra célula de extração no forno (F) e abriu-se a válvula de entrada (V-3) de CO₂, para que fosse passada, na linha, corrente de CO₂ para retirada total de resíduo de solvente;
- Desconectou-se a célula, usada para limpeza, da linha; desligou-se o equipamento, o banho ultratermostático (B-1) e compressor (C).

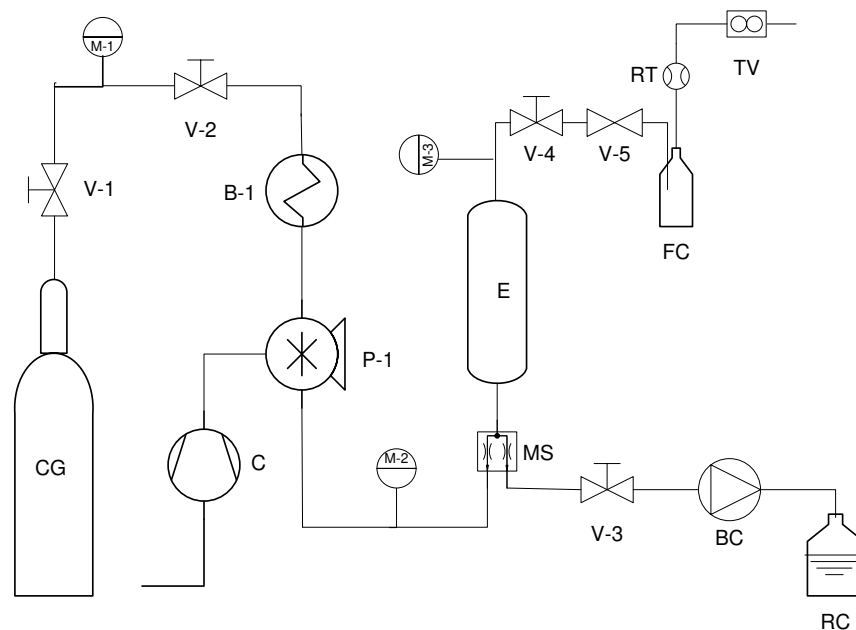
3.2.1.2. EXTRAÇÃO UTILIZANDO COMO SOLVENTE A MISTURA CO₂ + ETANOL

As extrações com a mistura CO₂ + EtOH (10 %, massa) foram realizadas em uma unidade de extração supercrítica com leito fixo.

O leito contém uma célula de extração de aproximadamente 415 cm³ (diâmetro interno de $3,4 \times 10^{-2}$ m e altura de $37,5 \times 10^{-2}$ m e suporta pressões de até 40 MPa. A unidade é equipada com dois banhos termostáticos que controlam as temperaturas: i) do CO₂ líquido (263 K) na entrada da bomba (Marconi, Modelo MA-184, Piracicaba, SP), responsável por manter o resfriamento e condensação do CO₂ e refrigerar o cabeçote da bomba e; ii) do leito de extração (PolyScience, modelo 9510, Niles, EUA) responsável pela manutenção da temperatura do extrator de aço inox. O equipamento é provido de duas bombas de solvente: i) bomba pneumática - booster (Maximator mod PP 111-VE MBR, Alemanha), destinada à circulação do dióxido de carbono e; ii) do modificador (Thermo Separation Products, ConstaMetric[®] 3200 P/F, Fremont, EUA). Em seguida, um totalizador de vazão (LAO, modelo G0,6, $\pm 0,001$ m³, São Paulo, SP), termopares e três manômetros (Record, 50 MPa $\pm 0,5$, São Paulo, SP).

Para a determinação do $X_{0, S/F=50}$, cada amostra foi empacotada em célula de *nylon* e completada com esferas de vidro, nas mesmas medidas do extrator, resultando em densidades aparentes diferentes para cada planta. Na base do extrator, foi inserida uma coluna de teflon perfurada equivalente a aproximadamente 70 % do volume do extrator com a finalidade de diminuir o seu volume, diminuindo o tempo de pressurização e a perda de carga do sistema (PEREIRA, 2005). Estas mesmas condições foram estabelecidas para as outras extrações de rendimento global (X_0).

O dióxido de carbono (99,0 % de pureza, Gama Gases Industriais, Campinas, SP) passa pelo banho termostático (B-1) mantendo sua temperatura a 263 K antes de passar pela bomba (P-1) garantindo assim que o CO₂ esteja líquido. O CO₂ e o etanol passam por um misturador antes de sua entrada no extrator previamente acondicionado com a matéria-prima. Desta forma, o solvente passa pelo leito de extração (E) empacotado e é coletado após a expansão na válvula micrométrica (V-6) em um frasco coletor de 100 cm³ imerso em banho de gelo à pressão ambiente. Por fim, o solvente passa através de um totalizador de vazão (TV) e é então liberado para o ambiente (Figura 3.5). O cossolvente foi eliminado em evaporador rotativo (Heidolph, Laborota 4001, Viertrieb, Alemanha) conectado a uma bomba a vácuo (Heidolph, Rotovac, Viertrieb, Alemanha).



CG - Cilindro de CO₂
 C - Compressor
 B-1 - Banho de resfriamento de CO₂
 P-1 - Booster
 E - Extrator
 FC - Frasco coletor
 RT - Rotâmetro
 TV - Totalizador de vazão
 RC - Reservatório de cossolvente

Válvulas
 V-1 - de bloqueio CO₂
 V-2 - entrada de CO₂
 V-3 - entrada de cossolvente
 V-4 - de saída CO₂ + extrato
 V-5 - micrométrica
 M - Manômetros
 MS - Misturador
 BC - Bomba de cossolvente

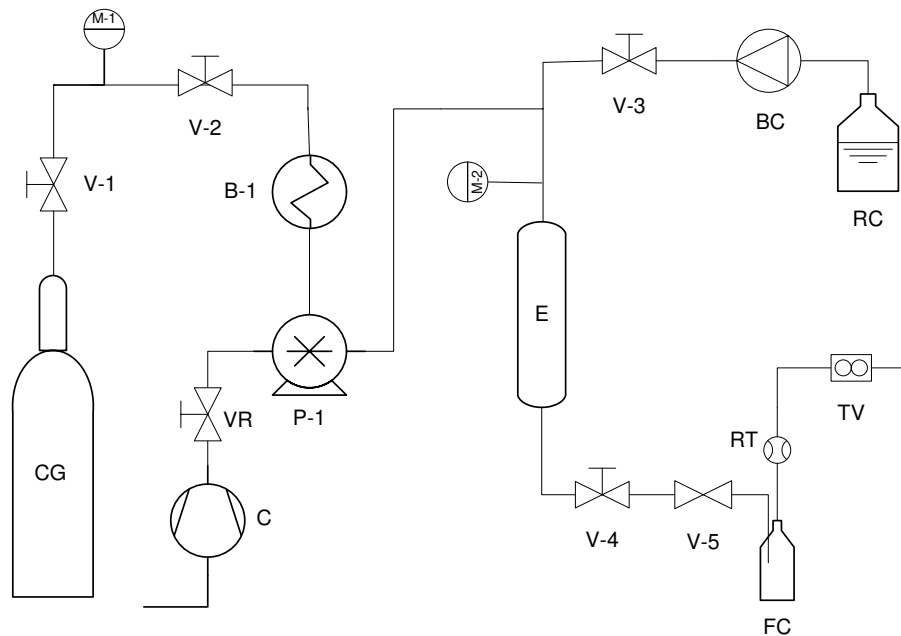
Figura 3.5. Diagrama da unidade SFE com cossolvente etanol (SFE-I).

Procedimento operacional da unidade:

- Liga-se o banho de resfriamento e aquecimento, e aguarda-se até que atinjam as temperaturas de operação 263 K para resfriamento dos cabeçotes da bomba B-1 e temperatura de operação selecionada para extrator E);
- Insere-se a amostra previamente empacotada em célula de nylon no extrator; no caso de ser necessário o uso da coluna de teflon e/ou esferas de vidro para completar o volume do leito, estes são inseridos na extremidade inferior do leito, na entrada de CO₂;
- Verifica-se que todas as válvulas estejam fechadas;
- Abre-se a válvula V-1 do cilindro de CO₂ (CG) e lê-se a pressão no manômetro M-1;
- Abre-se a válvula V-2 para regular a pressão do sistema;
- Abre-se a válvula V-3 para a utilização do cossolvente;
- Atingida a pressão de trabalho, o que pode ser observado no manômetro M-3, opta-se por realizar período estático, mantendo as válvulas de saída fechadas durante o mesmo, ou abrem-se as válvulas de saída V-4 e V-5 imediatamente;
- Ajusta-se a vazão do sistema através da válvula micrométrica (V-5) que é mantida constante durante o período de extração e medida pelo rotâmetro (RT) e pelo totalizador de vazão (TV);
- O extrato é recolhido em frasco de vidro de 100 cm³ (FC) imerso em banho de gelo;
- Após o fim da extração, fecham-se as válvulas V-2 e V-3, a do cilindro e desligam-se as bombas;
- Aguarda-se a despressurização do sistema e desligam-se os banhos termostáticos;
- Abre-se o extrator (E) retirando a célula;
- Procede-se à limpeza da linha entre o extrator e o frasco de coleta utilizando etanol como solvente e coletando em frasco de 50 cm³ o extrato diluído em etanol. O etanol é então evaporado, e o extrato recuperado.

3.2.1.3. EXTRAÇÃO UTILIZANDO COMO SOLVENTE A MISTURA CO_2 + ÁGUA

Para determinação do $X_{0, S/F=50}$ utilizando a unidade SFE-Ii (Figura 3.6), foram mantidas as mesmas condições e procedimentos das extrações com CO_2 + EtOH, exceto que o etanol foi substituído por água. O dióxido de carbono (99,0 % de pureza, Gama Gases Industriais, Campinas, SP) passa pelo banho termostático (B-1) mantendo sua temperatura a 263 K antes de passar pela bomba (P-1) garantindo assim que o CO_2 esteja líquido. O CO_2 e a água passam por um misturador antes de sua entrada no extrator previamente acondicionado com a matéria-prima. Desta forma, o solvente entra pela parte superior do leito de extração (E) empacotado e é coletado na parte inferior do extrator após a expansão na válvula micrométrica (V-5) em um frasco coletor de 100 cm^3 imerso em banho de gelo à pressão ambiente. Por fim, o CO_2 passa através do rotâmetro (RT) onde sua vazão é medida, e por um totalizador de vazão (TV) sendo então liberado para o ambiente.



CG - Cilindro de CO₂

C - Compressor

B-1 - Banho de resfriamento de CO₂

P-1 - Booster

E - Extrator

FC - Frasco coletor

RT - Rotâmetro

TV - Totalizador de vazão

RC - Reservatório de cossolvente

BC - Bomba de cossolvente

Válvulas

V-1 - de bloqueio CO₂

V-2 - entrada de CO₂

V-3 - entrada de cossolvente

V-4 - de saída CO₂ + extrato

V-5 - micrométrica

M - Manômetros

VR - Válvula reguladora de pressão do ar comprimido

Figura 3.6. Diagrama da unidade SFE com cossolvente água (SFE-Ii).

Procedimento operacional da unidade:

- Liga-se o banho de resfriamento e aquecimento, e aguarda-se até que atinjam as temperaturas de operação (263 K para resfriamento dos cabeçotes da bomba B-1 e temperatura de operação selecionada para extrator E);
- Insere-se a amostra previamente empacotada em célula de *nylon* no extrator; no caso de ser necessário o uso da coluna de teflon e/ou esferas de vidro para completar o volume do leito, estes são inseridos na extremidade inferior do leito, na saída do CO₂ + extrato;
- Verifica-se que todas as válvulas estejam fechadas;

- Abre-se a válvula V-1 do cilindro de CO₂ (CG) e lê-se a pressão no manômetro M-1;
- Abre-se a válvula V-2 e VR para regular a pressão do sistema;
- Abre-se a válvula V-3 para a utilização do cossolvente;
- Atingida a pressão de trabalho, o que pode ser observado no manômetro M-3, opta-se por realizar período estático, mantendo as válvulas de saída fechadas durante o mesmo, ou abrem-se as válvulas de saída V-4 e V-5 imediatamente;
- Ajusta a vazão do sistema através da válvula micrométrica (V-5) que foi mantida constante durante o período de extração e medida pelo rotâmetro (RT) e pelo totalizador de vazão (TV);
- O extrato é recolhido em frasco de vidro de 100 cm³ (FC) imerso em banho de gelo;
- Após o fim da extração, fecham-se as válvulas V-2 e V-3, a do cilindro e desligam-se as bombas;
- Aguarda-se a despressurização do sistema e desligam-se os banhos termostáticos;
- Abre-se o extrator (E) retirando a célula;
- Proceda-se à limpeza da linha entre o extrator e o frasco de coleta utilizando etanol como solvente e coletando em frasco de 50 cm³ o extrato diluído em etanol. O etanol é então evaporado, e o extrato recuperado.

3.2.2. ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL (IRG)

As isotermas de rendimento global foram determinadas para o jatobá (lote 2), matéria-prima selecionada, nas temperaturas de 323 e 333 K e pressões de 15, 25 e 35 MPa. As extrações foram realizadas com o sistema CO₂ + H₂O, na unidade SFE-Ii. Para determinação das IRG's, foram mantidas as mesmas condições de extração descritas na seção 3.2.1.3.

3.2.2.1. LIOFILIZAÇÃO

A remoção da água dos extratos aquosos foi realizada através da liofilização em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras, São Carlos, SP). Após seu completo congelamento, as amostras eram encaminhadas ao liofilizador, onde permaneciam até a

completa sublimação da água (aproximadamente 48 horas). As amostras liofilizadas foram acondicionadas em frascos plásticos opacos e armazenadas em freezer (Metalfrio, HC-4, São Paulo, SP) a 263 K.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DA EXTRAÇÃO

Os experimentos de cinética da extração foram realizados para o jatobá (lote 2) na condição selecionada de temperatura (T) e pressão (P) otimizada nos experimentos de IRG's.

Para a determinação da cinética de extração, foi utilizada a unidade SFE-Ii equipada com uma célula de extração de aproximadamente 415 cm³ (diâmetro interno de 3,40 cm e altura de 37,5 cm). A amostra foi acondicionada na célula através de pequenas alíquotas e empacotadas com a ajuda de um bastão cilíndrico para se evitar a formação de caminhos preferenciais. A parte superior da célula foi completada com esferas de vidro.

A coluna de extração foi preenchida com 50 g de matéria-prima, que resultou em uma densidade aparente igual a 404,0 kg/m³. A relação prolongou-se até um S/F de 60.

Após a pressurização e um período estático de 10 min, a mistura CO₂ + H₂O foi admitida no sistema a uma vazão de 1,11 × 10⁻⁴ kg/s de CO₂ e 0,66 cm³/min de água. A temperatura da válvula micrométrica foi mantida em 373 K.

3.2.3.1. AJUSTE DA CURVA GLOBAL DE EXTRAÇÃO

Os dados experimentais das curvas globais de extração foram ajustados a um *spline* usando três linhas retas. O ajuste foi realizado usando os procedimentos PROC REG do software SAS[®] Learning Edition 8.024 seguido pelo procedimento PROC NLIN do mesmo software, segundo RODRIGUES et al. (2002).

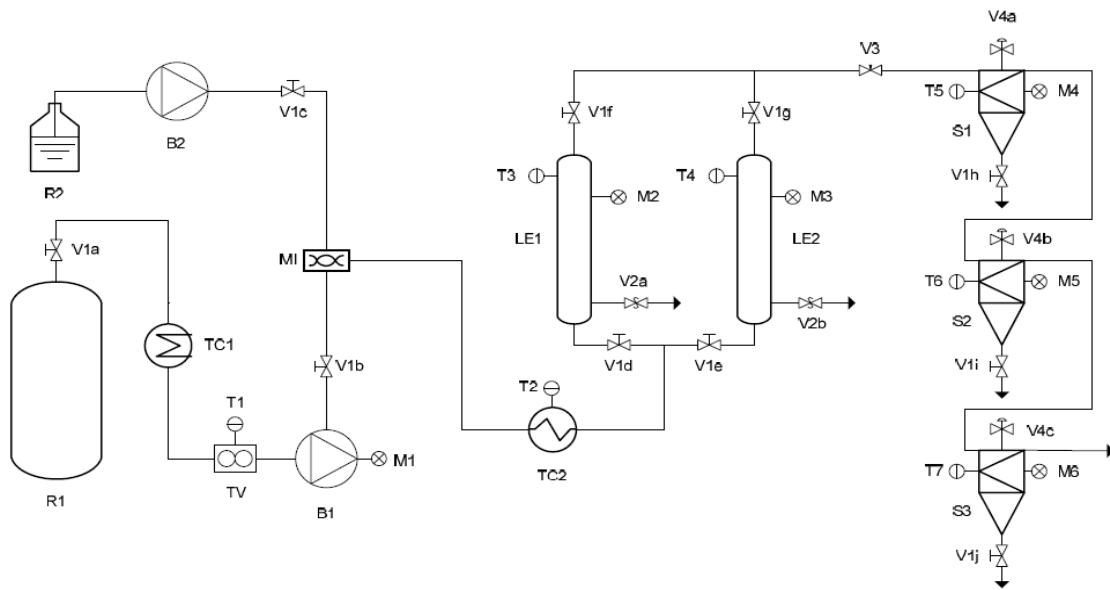
3.2.4. UNIDADE PILOTO (2 × 5 L)

O aumento de escala foi estudado na unidade Piloto (Thar Technologies, modelo SFE-2×5LLF-2-FMC, Pittsburgh, EUA), atualmente instalada no LASEFI e adquirida no âmbito do projeto PITE-FAPESP (05/60485-1). Na Figura 3.7 encontra-se o fluxograma da unidade de extração. O sistema consiste em dois extratores (LE1 e LE2)

com volume de 5 L cada, envoltos por uma manta de aquecimento de 2000 W de potência. Os extratores operam de forma alternada simulando um processo contínuo, assim, enquanto um extrator está em uso, o outro extrator passa pelo processo de despressurização, retirada da matriz vegetal, empacotamento e pressurização. O sistema possui duas bombas: B1 (bomba de CO₂), com capacidade máxima de bombeamento de 200 g/min, e B2 (bomba de cossolvente), com capacidade máxima de 50 g/min. O CO₂ é resfriado (previamente à entrada em B1) a 271 K em banho com etileno glicol e água, e em seguida passa por um medidor de vazão (TV) (Siemens, modelo Sitrans F C Mass 6000, Munique, Alemanha). Quando se utiliza cossolvente, este é misturado ao CO₂ no misturador estático (MI). A mistura de CO₂ + cossolvente (quando este é utilizado) é então aquecida no trocador de calor (TC2) até a temperatura de operação antes de sua entrada no extrator. A matéria-prima encontra-se empacotada dentro do extrator em célula de *nylon* de abertura 80 mesh (abertura 0,177 mm) e mesmas dimensões do extrator. Após a passagem pelo extrator o sistema solvente + extrato passa pelos três separadores (S2 a S3) que estão conectados em série, os quais podem ser operados em diferentes temperaturas e pressões de operação, com o objetivo de haver uma separação fracionada.

Todo o sistema de controle de pressão, vazão e temperatura é automatizado, com exceção das válvulas V1, V2 e V4. A válvula automática (V3) é responsável pelo controle de pressão do sistema, enquanto as bombas B1 e B2 controlam a vazão, e um sistema de termopares controla as temperaturas. Todos estes equipamentos estão conectados a um computador que controla os parâmetros a partir dos valores definidos pelo usuário. O banho de resfriamento do CO₂ e o medidor de vazão devem ser manipulados à parte do computador.

No entanto, como se trata de extração com CO₂ + H₂O, o sentido do escoamento também foi invertido após a verificação de que mesmo o sistema operando com vazão elevada de cossolvente, este não conseguiu alcançar a saída do extrator. Desta forma, a alimentação da mistura CO₂ + H₂O passou a ser na parte superior e a saída na parte inferior do extrator.



B1 – bomba de CO₂
 B2 – bomba de co-solvente
 LE – leitos de extração
 M – manômetros
 MI – misturador
 R1 – reservatório de CO₂
 R2 – reservatório de co-solvente
 S – separadores

T – termopares
 TC – trocador de calor
 TV – totalizador de vazão
 V1 – válvulas de bloqueio
 V2 – válvulas de segurança
 V3 – válvula micrométrica automática
 V4 – válvulas reguladoras de pressão

Figura 3.7. Diagrama da unidade SFE Piloto (PRADO, 2010).

Procedimento operacional da unidade:

- Conecta-se o cabo USB de comunicação entre os equipamentos e o computador;
- Liga-se o banho de resfriamento do CO₂ a 271 K;
- Insere-se a célula de extração previamente empacotada com a matéria-prima no interior do extrator LE1 (ou LE2), sendo que no caso de empacotamento parcial do leito, esferas de vidro são inseridas para completar seu volume;
- Certifica-se que as válvulas V1a, V1b, V1c, V1d (ou V1e) e V1f (ou V1g) estejam abertas e as demais válvulas fechadas;
- Inicia-se no computador o programa de controle do processo, determinando as condições operacionais (vazão das bombas, temperatura no TC, temperatura e pressão de extração, temperatura da V3 e temperaturas de S1, S2 e S3);

- Inicia-se o processo de pressurização pelo computador;
- Aguarda-se a estabilização do sistema para então iniciar a extração;
- Ao atingir a pressão de operação, a V3 abre automaticamente, liberando o escoamento para S1; abre-se então V4a regulando a pressão em S1, de maneira que a pressão em S1 seja menor do que no extrator;
- Procede-se da mesma maneira para regular a pressão em S2 e S3, utilizando V4b e V4c, respectivamente, de forma que a pressão em S2 seja menor do que em S1 e em S3 menor do que em S2;
 - ❖ Caso se deseje operar a unidade em modo contínuo, ao findar o processo em um dos extratores, B1 e B2 devem ter seu funcionamento interrompido pelo computador;
 - ❖ O extrator LE2 deve estar previamente empacotado e conectado ao equipamento;
 - ❖ Fecha-se V1d e V1f, enquanto abre-se V1e e V1g;
 - ❖ B1 e B2 são novamente ligadas através do computador, e regula-se o processo novamente;
 - ❖ O extrator LE1 deve ser despressurizado utilizando V2a, para ser então descarregado, novamente empacotado e conectado ao equipamento;
 - ❖ Este processo pode ser repetido quantas vezes forem necessárias;
- Ao findar o processo, despressurizam-se os separadores utilizando a regulagem manual de V4;
- Abrem-se os separadores utilizando V1h, V1i e V1j para coletar o extrato;
- Desliga-se o sistema;
- Procede-se à limpeza do equipamento, utilizando água. A água é então liofilizada, e o extrato recuperado.

Para o estudo de aumento de escala, teve-se como referência a cinética de extração realizada com vazão de $1,12 \times 10^{-4}$ kg/s, 323 K, 15 MPa e alimentação de 0,05 kg, seguindo o critério de aumento de escala em que se mantém constante a proporção entre a

massa de solvente e a massa de matéria-prima mantendo o tempo de processo constante é apresentada na Equação 3.4 (PRADO, 2010; ZABOT et al., 2012).

$$\frac{Q_{2,CO_2}}{Q_{1,CO_2}} = \frac{F_2}{F_1} = \frac{S_2}{S_1} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde:

Q_{i,CO_2} é a vazão mássica do solvente nas unidades 1 e 2;

F_i é a massa de alimentação de matéria-prima nas unidades 1 e 2;

S_i é a massa de solvente nas unidades 1 e 2.

Para a determinação da cinética de extração, apenas uma coluna de extração foi utilizada e empacotada com 1,5 kg de matéria-prima, resultando em uma densidade aparente de 404 kg/m³. De acordo com a equação acima, a vazão utilizada foi de $3,33 \times 10^{-3}$ kg/s (200 g/min) de CO₂ e $3,33 \times 10^{-4}$ kg/s (20 g/min) de cossolvente, resultando em um aumento de escala de 30 vezes. A temperatura da válvula foi de 333 K referente à máxima permitida.

Foram selecionadas as seguintes condições de operação: S1 (10 MPa/323 K); S2 (7 MPa/313 K) e S3 (4 MPa /303 K). Para o estudo do aumento de escala na unidade piloto, foram selecionados quatro tempos de processo: 40, 80, 110 e 140 minutos correspondente a um S/F de 50; assim em cada tempo da cinética o processo era interrompido, o extrator era mantido pressurizado e os separadores despressurizados para coleta de extrato.

3.2.5. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)

3.2.5.1. MACERAÇÃO

Um estudo preliminar foi realizado para determinar as condições ótimas de extração em relação a eficiência dos solventes e a razão massa de solvente/massa de alimentação (S/F), utilizando como resposta, o teor de polifenóis totais (PT).

Foram avaliados a eficiência dos solventes: H₂O, H₂O + EtOH (1:1, v/v), EtOH e tampão citrato-fosfato (pH 3,0); e a razão S/F: 20, 10 e 6,7, utilizando 1,5 e 2 g de

material seco em cada extração. Os experimentos foram realizados em agitador de placa magnética RT-10 (IKAMAG, Staufen, Alemanha) equipado com agitadores magnéticos durante 3 horas no escuro. As amostras foram filtradas em filtros de 0,45 μm antes das análises.

3.2.5.2. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)

Esta etapa do trabalho foi realizada na Universidade de Avignon na França, no período de março a julho de 2011, no laboratório GREEN (Groupe de Recherche en Eco-Extraction de produits Naturels).

As extrações foram conduzidas em reator PEX 1 (R.E.U.S., Contes, França). O reator consiste em um vaso de aço inox de forma cilíndrica, com dimensões internas de 10 cm de diâmetro e 14 cm de altura com máximo de capacidade de 1 L, equipado com um transdutor na base do vaso operando a uma frequência de 25 kHz, com máximo de potência de entrada (potência de saída do gerador) de 150 W (Figura 3.8).

De acordo com a Figura 3.8, o vaso de aço inox é constituído de duas camadas com circulação de água que permite o controle da temperatura de extração através do sistema aquecimento/resfriamento. A potência máxima dissipada no meio, medida por calorimetria, foi aproximadamente 60 W. Para o procedimento de extração, 300 cm^3 de água e 0,015 Kg de casca de jatobá seca foram misturados e extraídos sob pressão atmosférica. A fim de prevenir a degradação dos compostos fenólicos todos os experimentos foram conduzidos a 323 K.

A potência máxima e mínima do ultrassom, 60 e 20 W, foi utilizada na extração de fenóis durante 40 min. Os extratos aquosos foram previamente congelados e liofilizados; as amostras submetidas para análises de polifenóis foram filtradas em filtros de 0,45 μm antes de serem analisadas. Os experimentos foram realizados em duplicata. O rendimento do extrato foi calculado a partir do peso inicial da matéria-prima e expresso em porcentagem em base seca (% , b.s).

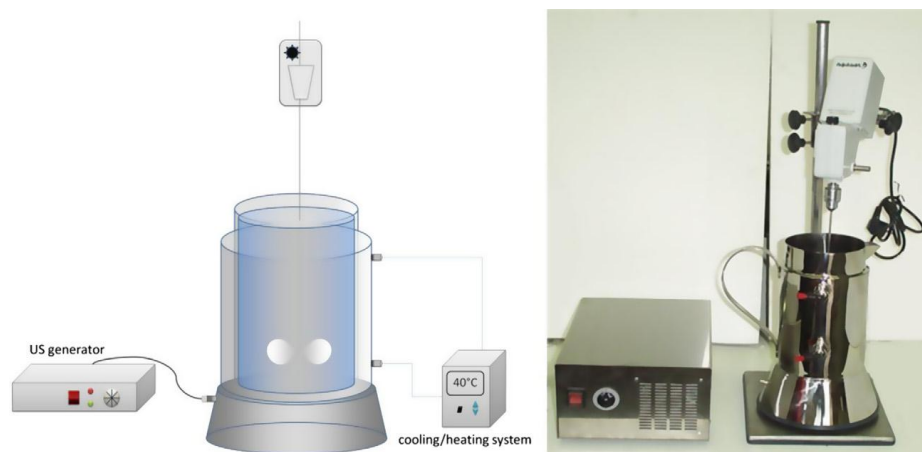


Figura 3.8. Dispositivo de ultrassom laboratorial usado para a UAE.

A fim de determinar a viabilidade do aumento de escala (E/US) para o processo de extração com ultrassom, os experimentos foram conduzidos em reator PEX 3 Sonifier (R.E.U.S., Contes, França) composto por um vaso de aço inox de forma cilíndrica, com dimensões internas de 13,7 cm de diâmetro e 23 cm de altura com máximo de capacidade de 3 L, e um transdutor na base do vaso operando a uma frequência de 25 kHz com máximo de potência de entrada (potência de saída do gerador) de 150 W². Estes experimentos foram conduzidos da mesma forma descrita anteriormente com equipamento de 1 L.

A fim de determinar a eficiência do ultrassom na extração de polifenóis de cascas de jatobá, extrações por agitação (AGE - agitated bed extraction) foram realizadas sob as mesmas condições, porém sem o uso do ultrassom, a fim de comparar os resultados obtidos nas extrações com UAE.

Ao mesmo tempo, outro tipo de equipamento foi utilizado como método comparativo, a sonda de ultrassom (UP). Uma microsonda de titânio de 6 mm de ponta (Ultrasonic Processor, Fisher Bioblock Scientific, França) operando a 20 kHz (potência máxima de 140 W) foi utilizada nos experimentos. Uma vez que este equipamento está em

² Ambos os reatores apresentam uma intensidade de 1W/cm², de forma a garantir a homogeneidade da difusão da energia do ultrassom em ambos os reatores de 1L e 3L.

contato direto com o meio de extração, os resultados da extração através da UP foram comparados com os de UAE realizados em 1 L e 3 L de capacidades.

3.2.5.3. EXTRAÇÃO EM CORRENTE CRUZADA EM TRÊS ESTÁGIOS

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de enriquecer o extrato de jatobá com o subproduto residual de uma extração anterior, foram realizadas extrações em três estágios em corrente cruzada.

Nesta extração, tanto a alimentação, no primeiro estágio, e o resíduo, nos estágios seguintes são tratados em estágios sucessivos com solvente fresco (TAKEUCHI et al., 2009). No primeiro estágio, a solução é a mesma que a extração em uma só fase. Na segunda etapa, a alimentação é R_1 , contendo o sólido inerte, o soluto não solubilizado e o solvente retido. A extração foi realizada como mostrado na Figura 3.9.

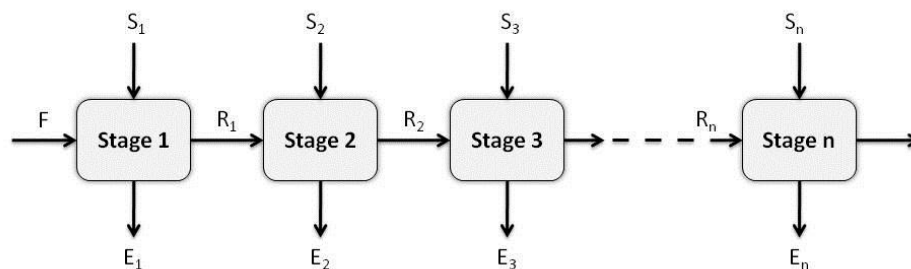


Figura 3.9. Esquema utilizado na extração de três estágios co-corrente para UAE e AGE.

3.2.5.4. ESTUDO CINÉTICO

Para estudar a cinética de extração de polifenóis da casca do jatobá, faz-se uso da Teoria Difusional baseado na Segunda Lei de Fick, onde o fluxo de massa é proporcional ao gradiente de concentração dentro do sólido. Logo, a segunda lei de Fick é a equação de transporte de massa que enfatiza a variação da concentração em função do tempo em determinado local.

Desta forma, um estudo comparativo foi realizado entre os processos de extração convencional por agitação (AGE) e com ultrassom (UAE), após a otimização das condições. Os resultados obtidos foram analisados utilizando um modelo matemático

derivado de segunda lei de Fick (HERODEZ et al., 2003). O modelo é baseado nas seguintes premissas:

- As partículas sólidas são consideradas como placas planas com espessura de $2L$;
- O composto ativo inicialmente é homogeneamente contido no sólido;
- O conteúdo do composto ativo no sólido varia com o tempo e a distância;
- A extração do composto ativo ocorre em duas etapas: estágio de fluxo constante e estágio de fluxo decrescente;
- Na interface, o equilíbrio termodinâmico é estabelecido;
- O sólido poroso é considerado como um meio pseudo-homogêneo.

A extração de polifenóis dos extratos de jatobá seguiu a cinética de primeira ordem (SPIRO e JAGO, 1982) e pode ser representada por:

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C_t}\right) = K \times t \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde C_t é a concentração de polifenóis totais no tempo t , C_{∞} é a concentração final de polifenóis (determinada em $t = 40$ min para UAE e AGE) e k é a constante de velocidade aparente de primeira ordem da extração. A teoria também mostra que a taxa constante k pode ser representada por:

$$\left(\frac{1}{k}\right)\left(\frac{A}{V} + \frac{K}{L}\right) = \frac{1}{K^{-1}} + \frac{KL}{2D} + \frac{\delta}{D_{sol}} + \frac{K\delta^2}{2D_{sol}L} \quad (\text{Equação 3.6})$$

onde A é a área total superficial e V é o volume de solvente. K é o coeficiente de partição do composto extraído entre o solvente e a matéria-prima. K e K^{-1} são as taxas constantes de primeira ordem para a transferência do composto através da interface da matéria-prima para a solução e vice-versa, respectivamente. O último termo a direita da Equação 3.6 geralmente pode ser negligenciado, uma vez que será sempre menor que o termo $\frac{\delta}{D_{sol}}$. Os outros três termos correspondem a três etapas que regulam o processo: infusão de superfície controlada, difusão do composto solúvel através da matéria-prima com um coeficiente de difusão D , e a difusão do composto através da espessura da camada de Nernst (δ) com o coeficiente de difusão D_{sol} . Se a segunda etapa é a única determinante da velocidade, então:

$$k = \frac{2D}{KL} \left(\frac{A}{V} + \frac{K}{L} \right) \quad (\text{Equação 3.7})$$

Uma equação semelhante pode ser derivada pela aplicação da segunda lei de Fick (CRANK, 1985):

$$Dj \left[\frac{\partial^2 Cj}{\partial x^2} \right] = \frac{\partial Cj}{\partial t} \quad (\text{Equação 3.8})$$

Considerando uma distribuição inicial uniforme, quando C indica a concentração dentro de uma placa plana, as condições iniciais e de contorno são:

$$\begin{aligned} t = 0 \quad -L \leq x \leq L \quad C &= C_0 \\ \forall t > 0 \quad x = \pm L \quad C &= C_i = 0 \quad (\text{Concentração constante na interface}) \\ \forall t > 0 \quad x = 0 \quad \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right) &= 0 \quad (\text{Simetria do sistema}) \end{aligned}$$

A solução geral da Equação 3.8, dada por CRANK (1975), é dada por:

$$\frac{C - C_0}{C_i - C} = 1 - \left[\frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi \cdot x}{2L} \exp \left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt \right) \right] \quad (\text{Equação 3.9})$$

Onde C é a concentração em qualquer momento dado a uma distancia x do centro da placa ($x = \pm L$). Integrando a concentração ao longo da espessura, a massa transferida a partir da placa em qualquer tempo (M) pode ser calculada (HERODEZ et al., 2003). A massa transferida no tempo t em relação à quantidade total transferida após o tempo infinito (M_∞) é expressa como:

$$\frac{M}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{n=\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left(-\frac{\pi^2 (2n+1)^2}{4L^2} Dt \right) \quad (\text{Equação 3.10})$$

Depois de um curto período de tempo, todos os termos exceto o primeiro tornam-se negligenciáveis. Assim, considerando que a massa transferida de uma placa no tempo t é igual à concentração na solução (C), a seguinte equação é obtida (SPIRO, 1988):

$$\ln\left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C_t}\right) = 0,210 + \frac{9,87Dt}{4L^2} \quad (\text{Equação 3.11})$$

Quando a Equação 3.5 é plotada em função do tempo, os pontos se interceptam em duas linhas retas. A primeira linha é relativamente inclinada, enquanto a segunda linha possui uma inclinação suave. Os pontos de intersecção de $\ln(C_{\infty}/[C_{\infty} - C_t])$ vs. t plotados para as etapas rápida e lenta foram denominados pontos de transição (KANDIAH e SPIRO, 1990; SPIRO e KANDIAH, 1989; SPIRO et al., 1990), e sabendo-se que dois processos de difusão paralelos ocorrem no interior do sólido, a rápida e a lenta. Estas análises podem ser bem aplicadas em extrações a partir de partículas planas.

3.3. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

3.3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise de cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com a finalidade de verificar as possíveis classes de compostos presentes nos extratos das plantas selecionadas para o estudo.

3.3.1.1. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS UTILIZANDO OS SOLVENTES CO_2 PURO E $CO_2 + ETANOL$

O perfil da composição dos extratos foi determinado qualitativamente através da técnica de separação por cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo a metodologia de WAGNER e BLADT (1996) com algumas modificações. Esta técnica consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. É considerada de fácil compreensão e execução, com separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo.

Para a verificação do perfil de composição dos extratos obtidos utilizou-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica gel F₂₅₄ (CCF-C/25, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha), a fase móvel foi composta de hexano (Merk, lote K38169674, Darmstadt, Alemanha) e acetato de etila P.A. (Merck KGaA, Lote:

K38466423, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 80:20. Utilizou-se solução reveladora de flavonoides (2-aminoetil-difenilborinato - NP), terpenóides (solução de anisaldeído - AS), alcalóides (AL - reativo de Dragendorff) e de antioxidante (2,2-difenil-1-picrilhidrazila - DPPH).

Foram utilizados extratos diluídos em acetato de etila na concentração de 10 mg/cm³. O padrão ácido gálico (Sigma Aldrich Inc, lote 023K01171, St. Louis, EUA), quercetina (Sigma Aldrich Inc, lote 034K3482, St. Louis, EUA) e β-sistoserol (Sigma Aldrich Inc, lote 107K3798, St. Louis, EUA) os quais foram diluídos em concentração de 2 mg/cm³ também em acetato de etila e aplicados na placa correspondente ao revelador NP, e codificados em AG, Q e β-S respectivamente. As placas cromatográficas foram colocadas em cuba contendo a fase móvel. Ao fim deste processo e após a secagem das placas, foram aplicados os reveladores. A revelação das substâncias submetidas ao revelador de flavonoides e alcalóides foi realizada através da exposição à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm); as submetidas ao revelador de terpenóides foram submetidas ao aquecimento a 373 K até a completa revelação dos compostos. Para o revelador DPPH, a placa permaneceu 30 minutos sob luz natural a fim de verificar a presença de manchas amarelas contra fundo púrpura, que indicam a presença de compostos antioxidantes na amostra.

3.3.1.2. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS UTILIZANDO COMO SOLVENTE A MISTURA CO₂ + ÁGUA

O perfil de composição dos extratos obtidos com CO₂ + H₂O foi determinado diluindo os extratos liofilizados em metanol na concentração de 10 mg/cm³. Os seguintes sistemas de solventes foram empregados: clorofórmio (Merck KGaA, Lote: K38554545, Darmstadt, Alemanha), metanol (Merck KGaA, Lote: K39405609, Darmstadt, Alemanha) e água na proporção de (60:30:10) em cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica gel F₂₅₄ (CCF-C/25, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se solução reveladora de flavonoides (NP), terpenóides (solução de anisaldeído (AS)), antioxidante (DPPH), alcalóides (AL - reativo de Dragendorff) e taninos (T - FeCl₃ 1%). Foi utilizado o padrão de ácido gálico (AG) (Sigma Aldrich Inc, lote 023K01171, St. Louis, EUA) diluído

em concentração de 2 mg/cm³ em metanol, nas placas com solução reveladora de taninos e DPPH.

O mesmo procedimento de preparo e revelação das placas descrito na seção 3.3.1.1 foi adotado. Porém, a revelação das substâncias submetidas ao revelador de terpenóides (AS) foi submetida ao aquecimento a 373 K por 10 min, as placas foram submetidas à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm). Com finalidade de intensificar a coloração das placas após a revelação das mesmas, foi borrifado o revelador PEG (solução etanólica com 5 % de polietilenoglicol) na placa de flavonoides, solução de ácido sulfúrico 10% na placa de alcalóides, FeCl₃ 1 % na placa de terpenóides e vanilina 1 % na de taninos.

3.3.1.3. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS POR UAE³

Para a determinação do perfil de composição dos extratos obtidos por UAE, o mesmo procedimento da seção 3.3.1.2 foi seguido. Porém, utilizando somente solução reveladora de antioxidantes (DPPH) e taninos (T - FeCl₃ 1%), e comparada aos padrões ácido gálico (AG) (Sigma Aldrich Inc, lote 023K01171, St. Louis, EUA) e rutina (R) (Sigma Aldrich Inc., lot 086K1245, St. Louis, EUA).

3.3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos SFE e UAE foi determinada utilizando o método do radical DPPH conforme descrito por RUFINO et al. (2007). O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H⁺ sendo então reduzido, resultando na porcentagem da atividade antioxidante (% AA), e a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração inibitória (IC₅₀). Portanto, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será seu IC₅₀ e maior será sua atividade antioxidante.

O DPPH (Sigma Aldrich Co, Steinheim, Alemanha) foi dissolvido inicialmente em metanol e completado volume com etanol até a concentração final de 0,06 mM. A curva

³ Etapa realizada no LASEFI/UNICAMP, Brasil.

padrão de calibração foi preparada em diferentes concentrações de DPPH: 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μM . As soluções referentes aos antioxidantes padrão (BHT e quercetina) foram preparadas nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 mg/cm^3 partindo-se da concentração de 0,5 mg/cm^3 . Os extratos foram preparados nas mesmas concentrações, porém partindo da concentração inicial de 1 mg/cm^3 para os extratos das plantas obtidos com CO_2 e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (diluídos em etanol) e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (diluídos em metanol). Em ambiente escuro, uma alíquota de 0,1 cm^3 de cada diluição dos extratos foi adicionada a 3,9 cm^3 do radical DPPH e homogeneizado em agitador de tubos. No preparo da solução de calibração, o mesmo procedimento foi empregado, porém utilizando-se 0,1 cm^3 do solvente (etanol ou metanol) utilizado nas diluições dos extratos. A redução da absorção foi medida a 517 nm imediatamente (0 min) e a cada 30 min até a estabilização da absorbância (90 min).

Todas as análises foram realizadas em duplicata. A queda na leitura da densidade ótica das amostras, BHT e quercetina foram correlacionadas com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH, conforme a Equação 3.12. Calculou-se também o valor IC_{50} (concentração da amostra necessária para inibir 50 % do radical).

$$\% \text{ de proteção} = (\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad (\text{Equação 3.12})$$

3.3.3. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

3.3.3.1. EXTRATOS OBTIDOS POR SFE

Para determinar a quantidade de fenóis totais nos extratos utilizou-se o método do reagente Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON e ROSSI (1965), com algumas adequações para extratos vegetais sugeridas por SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTÓS (1999).

Uma solução estoque foi preparada em balão volumétrico de 100 cm^3 dissolvendo 0,5 g de ácido gálico (Sigma-Aldrich, lote 023K01171, EUA) em 10 cm^3 de etanol e depois completando o volume com água destilada. Em seguida, foram preparadas as soluções de calibração para a construção da curva padrão em balões volumétricos de 10 cm^3 , diluindo com água destilada frações da solução estoque para conseguir concentrações

de ácido gálico iguais a 0,05, 0,10, 0,15, 0,25 e 0,50 mg/cm³. As amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 0,1 mg/cm³ para as análises envolvendo extratos obtidos com CO₂ e CO₂ + EtOH, e em metanol nas concentrações de 1 mg/cm³ para os extratos com CO₂ + H₂O, com exceção do extrato de jatobá, mantida a diluição final de 0,1 mg/cm³. Também foi feita uma diluição 1:10 do reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica, lote 35193, Diadema, SP) em água destilada. Para a solução de carbonato de sódio anidro (Ecibra, lote 18560, São Paulo, SP), a diluição foi feita com água destilada até uma concentração final de 75 mg/cm³. A água destilada foi utilizada como branco.

Previamente ao início das reações, novas diluições (1:10) das soluções de calibração foram feitas. As reações foram conduzidas misturando 2 cm³ destas novas diluições de calibração, das amostras e branco com 10 cm³ da solução do reagente Folin-Ciocalteu. Transcorrido 1 min e antes de 8 min adicionaram-se 8 cm³ da solução de carbonato de sódio. Deixou-se em banho térmico (Marconi modelo MA 127/BO, Piracicaba, SP) a 323 K por 5 min e imediatamente depois a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, modelo U-3010, Tóquio, Japão) usando comprimento de onda de 760 nm. O conteúdo de fenóis totais nos extratos é calculado em equivalentes de ácido gálico (EAG).

3.3.3.2. EXTRATOS OBTIDOS POR UAE⁴

O total de polifenóis foi medido utilizando um kit (SEPPAL, Isitec-lab, França) que inclui um reagente A (reagente de Folin-Ciocalteu modificado), reagente B (tampão alcalino) e uma solução de ácido gálico (3 g/L). Um pequeno volume (20 µL) de H₂O (branco), solução de ácido gálico (padrão) ou extrato (amostra) foram misturados com reagente A (2 cm³). Depois de 1 min, 1 cm³ do reagente B foi adicionado em cada mistura. As misturas permaneceram em repouso durante 30 min no escuro a temperatura ambiente antes de suas absorbâncias serem medidas a 760 nm. Os polifenóis totais das amostras foram calculados usando a seguinte Equação 3.12:

⁴ Etapa realizada no Laboratório GREEN/Universidade de Avignon, França.

$$TP = 3 \times (\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}) / (\text{absorbância do padrão} - \text{absorbância do branco}) \quad (\text{Equação 3.13})$$

As análises foram realizadas em triplicatas, e os valores médios, expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG).

3.3.4. DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES

Os flavonoides totais foram determinados através do método colorimétrico desenvolvido por ZHISHEN, MENGCHENG e JIANMING (1999), descrito por KIM et al. (2003).

As amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 0,1 mg/cm³ para as análises envolvendo CO₂ e CO₂ + EtOH, e em metanol nas concentrações de 1 mg/cm³ para os extratos CO₂ + H₂O, com exceção do extrato de jatobá, mantida a diluição final de 0,1 mg/cm³. Uma alíquota de 1 cm³ de amostra adequadamente diluída era adicionada a um balão volumétrico de 10 cm³ contendo 4 cm³ de água destilada. Foi preparado um branco substituindo-se a amostra por água destilada. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: i) inicialmente adicionava-se 0,3 cm³ de NaNO₂ (Ecibra, 99,9 %, Lote 16.999, Santo Amaro, SP); ii) após 5 minutos adicionava-se 0,3 cm³ de AlCl₃ (10 %) (Ecibra, 99,9 %, Lote 17.439, Santo Amaro, SP); iii) depois de 1 minuto adicionava-se 2 cm³ de NaOH (1M) (Ecibra, 99,9 %, Lote 17.439, Santo Amaro, SP) e iv) imediatamente completava-se o volume do balão volumétrico com água destilada (2,4 cm³) e a mistura era vigorosamente agitada. A absorbância das amostras foi lida a 510 nm. O teor de flavonoides foi expresso em equivalente de quercetina (EQ). As amostras foram analisadas em duplicata.

3.3.5. TANINOS TOTAIS

Devido a relatos na literatura quanto à presença de taninos nos extratos de jatobá, foi adotada a metodologia de identificação e determinação de taninos.

3.3.5.1. IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS DOS EXTRATOS DE JATOBÁ OBTIDOS UTILIZANDO CO₂ + ÁGUA

A confirmação quanto à presença de taninos nos extratos da casca de jatobá foi realizada primeiramente por meio de reações qualitativas. Estes ensaios são realizados quase sempre em soluções extrativas aquosas, compreendem reações de identificação geral e reações para identificação de grupos específicos. Desta forma, realizaram-se duas reações de caracterização:

- Reação com sais de ferro: 2 cm³ da solução de extrato foram adicionados a 10 cm³ de água destilada e 2-4 gotas de solução de FeCl₃ (Synth, Lote 70399, Diadema, SP) a 1 % em metanol. Foi necessário que se observasse a formação de um precipitado ou o aparecimento de colorações: preta, verde, azul, conforme o tipo de estrutura química (SIMÕES et al., 1999).
- Reação com vanilina clorídrica: 2 cm³ da solução de extrato foram adicionados a 0,5 cm³ da solução de vanilina (Synth, Lote 79588, Diadema, SP) a 2 % e 1 cm³ de HCl (Synth, Lote 33566, Diadema, SP). Foi necessário que se observasse a formação de cor vermelha intensa o que indica a presença de taninos condensados (catequinas) (BARBOSA, 2004).

3.3.5.2. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS DE JATOBÁ OBTIDOS UTILIZANDO CO₂ + ÁGUA

Os teores de polifenóis totais dos extratos de jatobá, foram determinados empregando o método colorimétrico de Folin-Denis descrito por CAMPOS et al. (2005). Esta metodologia foi aplicada nos extratos obtidos nos experimento de rendimento global (X₀) como método de avaliação na seleção da melhor condição de temperatura e pressão de extração.

Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino com uma solução saturada de carbonato de sódio.

Uma solução estoque foi preparada em balão volumétrico de 100 cm³ dissolvendo 0,2 mg de ácido tânico (Sigma-Aldrich, lote 06817CJ, St. Louis, EUA) em 1 cm³ de água destilada e depois completado o volume. Em seguida, para construção da curva padrão, foram preparadas as soluções de calibração em balões de 10 cm³, diluindo com água destilada frações da solução estoque para conseguir concentrações de ácido tânico iguais a 0,004, 0,01, 0,02, 0,04, 0,1 e 0,2 mg/cm³.

A solução de carbonato de sódio saturado (Ecibra, lote 18560, São Paulo, SP) foi preparada dissolvendo aproximadamente 34 g em 100 cm³ de água destilada, até se formasse uma solução saturada. Os extratos liofilizados foram diluídos em metanol (Merck KGaA, Lote: K39405609, Darmstadt, Alemanha) até uma concentração final de 0,5 mg/cm³. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra de extrato.

Para determinação dos polifenóis, em alíquotas de 0,4 cm³ de cada amostra, foi adicionado a 7 cm³ de água destilada e 0,5 cm³ de reagente Folin-Denis (Sigma-Aldrich, lote BCBC3042, St. Louis, MO, EUA) em tubos de ensaio. A mistura foi agitada em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56, Araraquara, São Paulo) e deixada em repouso por 3 minutos. Exatamente após este tempo, adicionou-se 1 cm³ da solução de carbonato de sódio saturado e o volume final foi ajustado para 10 cm³ adicionado água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão) em 730 nm exatamente 30 minutos após a adição da base. A determinação foi realizada em duplicata para cada amostra.

O teor de polifenóis totais foi calculado com base na curva de calibração, previamente construída, de ácido tânico (AT) sendo expressos em mg de ácido tânico equivalentes (ATE).

3.3.5.3. DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE JATOBÁ OBTIDOS UTILIZANDO CO₂ + ÁGUA

O teor de taninos foi determinado baseado no método descrito por MARTINS (1998) e na FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (2002), e validada por BOTT (2008). O método baseia-se na precipitação de taninos com a caseína e na medida da coloração azul

devido à redução do reagente Folin-Denis pelos polifenóis. Após a separação do complexo precipitado, determina-se a absorção da solução a 730 nm. O teor de taninos totais é calculado de forma indireta, pela subtração da fração não-tanante (polifenóis não precipitados pela caseína) da fração de polifenóis totais (sem caseína).

A curva de calibração foi determinada tendo o pirogalol como substância de referência. Cinquenta miligramas de pirogalol foram diluídos em 100 cm³ de água destilada. As concentrações finais foram 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 µg/cm³. Após 30 min de descanso no escuro desta solução, 0,5 cm³ do reagente Folin-Denis foram adicionados a 0,5 cm³ da solução padrão e posteriormente 4 cm³ de uma solução saturada de carbonato de sódio. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro em 730 nm exatamente 2 min após a adição da base. A água foi utilizada como branco.

Para a determinação dos polifenóis totais, 0,5 cm³ do extrato previamente diluído em uma concentração de 0,1 mg/cm³ em metanol, foi adicionado em um tubo de ensaio, sendo adicionados 0,5 cm³ do reagente Folin-Denis e posteriormente 4 cm³ de uma solução saturada de carbonato de sódio. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão) em 730 nm exatamente 2 min após a adição da base. A água foi utilizada como branco.

Para a determinação da fração não-tanante, uma suspensão formada de 20 cm³ da solução de extrato diluído com 0,3 g de caseína foi mantida em agitação durante 60 min. Após este tempo, suspensão foi mantida em repouso para que houvesse a precipitação do complexo caseína-tanino e filtrada posteriormente em papel de filtro. 0,5 cm³ deste filtrado foi adicionado em um tubo de ensaio, sendo adicionados 0,5 cm³ do reagente Folin-Denis e posteriormente 4 cm³ de uma solução saturada de carbonato de sódio. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro (modelo U-3010, HITACHI, Tóquio, Japão) em 730 nm exatamente 2 min após a adição da base. A água foi utilizada como branco.

Os teores de polifenóis e taninos totais foram calculados de acordo com as equações:

$$A^{1\%} = \frac{A_3 \times 10}{C} \quad (\text{Equação 3.14})$$

$$PT = \frac{FD \times A_1}{(p - m) \times A^{1\%}} \quad (\text{Equação 3.15})$$

$$FNT = \frac{FD \times A_2}{(p - m) \times A^{1\%}} \quad (\text{Equação 3.16})$$

$$TT = PT - FNT \quad (\text{Equação 3.17})$$

Em que:

$A^{1\%}$ = Absorbância específica da solução de referência;

A_3 = Absorbância medida para a substância de referência;

C = Concentração (mg/cm^3);

PT = Polifenóis totais (% p/p);

FD = Fator de diluição;

A_1 = Absorbância medida para taninos precipitáveis;

A_2 = Absorbância medida para taninos não precipitáveis e;

TT = Taninos totais (%).

3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SFE

3.4.1. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS EM SÉRIE (UPLC-MS/MS)

A análise de identificação dos extratos da casca de jatobá foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp para os extratos obtidos por SFE. Foi avaliado o perfil de composição de uma amostra contendo uma mistura de extratos obtidos a partir de experimentos de IRG's, OEC's e piloto.

A metodologia analítica utilizou um cromatográfico líquido de ultra eficiência (UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography), com coluna Waters (Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm) acoplado a um espectrômetro de massas Waters (Quattro Micro API). A metodologia utilizada está de acordo com ORTEGA et al. (2010).

A amostra foi dissolvida em metanol e injetada no UPLC-MS/MS, nas seguintes condições cromatográficas: Vazão de 1 cm³/min. Eluição por gradiente com fase móvel binária composta por água/ácido acético 2,5 % (v/v) (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Programação do gradiente: 3 - 9 % de B (0 - 0,6 min); 9 - 16 % de B (0,6 - 2,6 min); 16 - 50 % de B (2,6 - 8,6 min); 50 - 90 % de B (8,6 - 9,2 min); 90 % de B (9,2 - 10,0 min); 90 - 3 % de B (10,0 - 10,6 min), 3 % de B (10,6 - 15 min). T = 303 K. A inserção direta, no modo positivo e negativo foi dissolvida em metanol e inserida diretamente no MS/MS.

3.4.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (IES – MS/MS)

As análises de identificação dos extratos da casca de jatobá foram realizadas no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Unicamp para os extratos obtidos por SFE. Foi avaliado o perfil de composição dos extratos de todas as condições trabalhadas nos experimentos de IRG's, OEC's e piloto.

Para a análise por espectrometria de massas, as amostras foram diluídas em 1000 µL de metanol com 0,1 % de ácido fórmico para a obtenção dos espectros no modo positivo e com 0,1% de hidróxido de amônio para a obtenção dos espectros no modo negativo.

As amostras foram analisadas usando a primeira geração do Synapt HDMS (High Definition Mass Spectrometry; Waters Corp., Manchester, Inglaterra), sendo constituído de uma fonte de ionização por *electrospray* e um analisador de massas híbrido do tipo Q-oaTOF (quadrupole and orthogonal acceleration time-of-flight geometry). Para a aquisição dos espectros de massas foi utilizado o *software* MassLynx 4.1 (Waters Corp., Manchester, Inglaterra). Para ambos os modos, as condições de análise foram: voltagem do capilar: 3,0 kV; voltagem do cone: 30 V; voltagem extrator: 3,0 V; temperatura da fonte: 373 K; temperatura de dessolvatação: 373 K. As soluções foram injetadas por inserção direta em com vazão de 10 µL min⁻¹. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* de 50 a 2000.

Para as análises de ESI-MS/MS, os íons de interesse foram selecionados no analisador quadrupolo e transferidos para o *trap*, na qual a energia de colisão foi ajustada entre 10 e 60 eV, dependendo da fragmentação do íon de interesse. No oa-TOF, a varredura de íons produtos foi realizada a partir de m/z 50 até um valor acima do íon em estudo.

Para a obtenção da massa molecular exata dos íons de interesse, as amostras foram também analisadas por espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier, que apresenta altíssima resolução e exatidão. As análises foram realizadas em um equipamento LTQ FT Ultra (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com um magneto supercondutor de 7,0 T e uma bomba de seringa para a injeção. Para a aquisição dos espectros de massas foi utilizado o *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). As condições de análise utilizadas são as mesmas citadas anteriormente.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR UAE

3.5.1. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ASSOCIADA A UM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE/DAD)

A metodologia analítica para identificação dos compostos dos extratos da casca de jatobá obtidos na extração assistida por ultrassom (UAE) utilizando cromatografia de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD - High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection) foi realizada na França. Os polifenóis foram avaliados por CLAE após a tioacidólise, como descritos por LE BOURVELLEC et al. (2012).

O grau médio de polimerização (n) das procianidinas foi medido através do cálculo da razão molar de todas as unidades de flavan-3-ol (adutos de tioéter mais unidades terminais) de (-)-epicatequina e (+)-catequina correspondentes a unidades terminais. As análises de CLAE/DAD foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido ultrarrápido Shimadzu Prominence system (Kyoto, Japão) incluindo duas bombas LC-20AD, um desgaseificador DGU-20A5, um amostrador automático SIL-20ACHT, um forno para colunas CTO-20AC, um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, um

controlador de sistemas CBM-20A e controlados pelo *software* LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan). As separações foram conseguidas usando coluna Licrospher PR-18 5 μm (250 \times 4 mm i.d.; Merck, Darmstadt, Alemanha) com uma coluna de guarda (Licrospher PR-18 5 μm column, Merck, Darmstadt, Alemanha) em 303 K.

A fase móvel composta por uma mistura água/ácido acético 2,5 % (v/v) (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A vazão foi de 1 cm^3/min , com programação do gradiente: 3 - 9 % de B (0 - 5 min); 9 - 16 % de B (5 - 15 min); 16 - 50 % de B (15 - 45 min); 50 - 90 % de B (45 - 48 min); 90 - 90 % de B (48 - 52 min); 90 - 3 % de B (52 - 55 min); 3 - 3 % de B (55 - 60 min). Os extratos de jatobá obtidos em UAE, AGE, E/US e UP, assim como a casca do jatobá, foram analisados. Amostras com 20 μl foram injetadas no sistema. O efluente da coluna foi monitorado em 280, 320 e 350 nm. A quantificação foi realizada por meio de soluções-padrão de concentrações conhecidas.

Os resultados são apresentados como os valores médios, e a reprodutibilidade dos resultados são expressos como o desvio padrão combinado (pooled). Os desvios padrões combinados foram calculados para cada série de repetições usando a soma dos desvios individuais ponderados pelos graus de liberdade individuais (LORIMER et al., 2001).

A variabilidade da composição entre os extratos foi expresso pela média dos valores médios para cada extrato e o desvio padrão da média. Análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando o pacote Excelstat do Microsoft Excel.

3.6. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

O custo de manufatura do extrato (COM) foi estimado para os extratos obtidos nos experimentos de rendimento global (X_0) nos três processos estudados, CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$; e para os extratos obtidos na cinética de extração da condição otimizada, utilizando o processo de extração SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

O COM foi obtido utilizando o simulador SuperPro Designer[®]. A metodologia desenvolvida por PRADO (2009) foi empregada para estimar o COM dos processos utilizando CO_2 e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (Figuras 3.10 e 3.11) como solventes da extração. Porém,

para o processo SFE utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, foi adicionada a etapa de remoção da água, a liofilização (Figura 3.12).

Os processos consistem de etapas de extração, separação, recuperação do extrato, reciclo de solvente (CO_2) e do cossolvente (EtOH ou H_2O quando aplicado) do sistema contendo dois extratores trabalhando em modo semi-contínuo. Os parâmetros econômicos de entrada do programa estão apresentados na Tabela 3.2.

Os custos de manufatura foram estimados para três escalas com volume de extratores de 5, 50 e 500 L. O preço das unidades SFE utilizadas foram de fabricantes chineses devido ao menor preço, e portanto mais viáveis para o mercado brasileiro.

A unidade industrial foi considerada operando 24 h em três turnos durante 330 dias por ano, totalizando 7920 h de operação por ano; os outros 30 dias serão destinados à manutenção da planta (ROSA e MEIRELES, 2005). O número de operadores foi calculado de acordo com a capacidade da planta SFE (Tabela 3.2). Os gastos com matéria-prima se referem à matriz vegetal, ao CO_2 e ao cossolvente (EtOH e H_2O quando aplicado) perdidos durante o processo de extração. A perda de CO_2 se deve principalmente à despressurização do extrator ao final de cada batelada (PERRUT, 2007). Os custos de pré-processamento envolvem secagem e cominuição da matéria-prima.

Os custos de utilidades envolvem a produção de agentes trocadores de calor e a energia elétrica utilizados no processo. As utilidades necessárias para o funcionamento de cada equipamento foram estimadas pelo balanço de energia realizado pelo simulador.

O custo de tratamento de resíduos pode ser desprezado, uma vez que o resíduo do processo SFE é uma matriz vegetal sólida seca que pode ser incorporada ao solo ou ainda comercializada como subproduto (LI et al., 2008). O mesmo acontece com o cossolvente etanol, já que se trata de um solvente GRAS.

Tabela 3.2. Parâmetros econômicos utilizados para estimar o COM.

| | |
|--|-----------------|
| Unidades industriais de SFE ^a | Mercado Chinês |
| 2 extratores de 5 L | US\$ 95,000 |
| 2 extratores de 50 L | US\$ 380,000 |
| 2 extratores de 500 L | US\$ 1,500,000 |
| Taxa de depreciação | 10 %/ano |
| Liofilizadores industriais ^a - Área secagem (m ²) | Mercado Chinês |
| 20 | US\$ 38,000 |
| 200 | US\$ 150,000 |
| 300 | US\$ 192,000 |
| 1500 | US\$ 500,000 |
| 2000 | US\$ 590,000 |
| 3000 | US\$ 750,000 |
| Operadores ^b | US\$ 4.00/h |
| 2 extratores de 5 L | 1 operador |
| 2 extratores de 50 L | 2 operadores |
| 2 extratores de 500 L | 3 operadores |
| Matéria-prima | |
| Cipó-de-são-joão ^c | US\$ 20.70/kg |
| Ingá-cipó ^c | US\$ 50.00/kg |
| Feijão ^d | US\$ 2.20/kg |
| Nó-de-cachorro ^e | US\$ 26.00/kg |
| Jatobá ^f | US\$ 13.00/kg |
| Pré-processamento | US\$ 40.00/ton |
| CO ₂ (2 % perda) ^a | US\$ 2.30/kg |
| Etanol | US\$ 0.716/L |
| Água | US\$ 0.04/kg |
| Salmoura (CaCl ₂) | US\$ 200.00/ton |
| Utilidades | |
| Eletricidade ^g | US\$ 0.091/kWh |
| Água de resfriamento | US\$ 5.15/ton |
| Vapor | US\$ 20.00/ton |

^a quotação direta; ^b PRADO et al. (2009); ^c SUPEREXTRA BRASIL (2012); ^d AGROLINK (2012), ^e SANTOSFLORA (2012), ^f ERVAS-BRASIL (2012), ^g CPFL (2011).

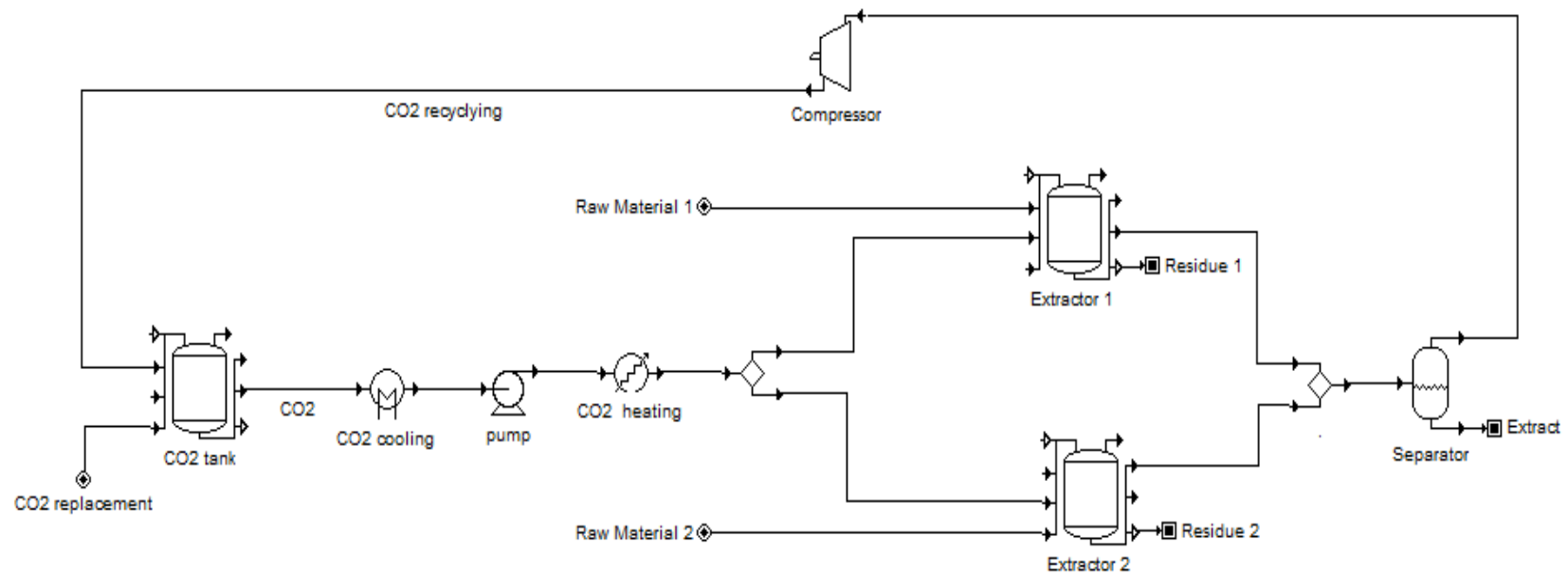


Figura 3.10. Fluxograma do processo SFE (CO₂) montado pelo simulador SuperPro Designer[®] (Adaptado de PRADO, 2009).

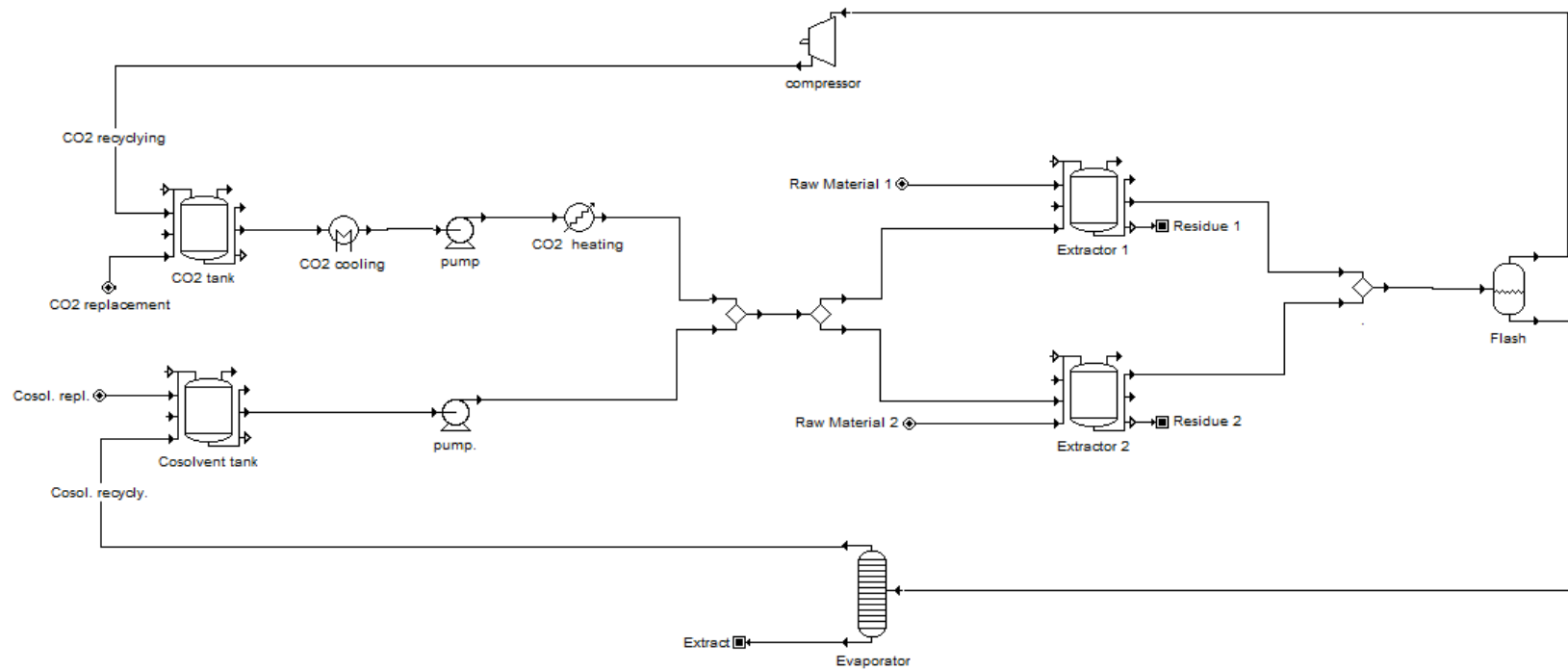


Figura 3.11. Fluxograma do processo SFE (CO₂ + EtOH) montado pelo simulador SuperPro Designer[®] (Adaptado de PRADO, 2009).

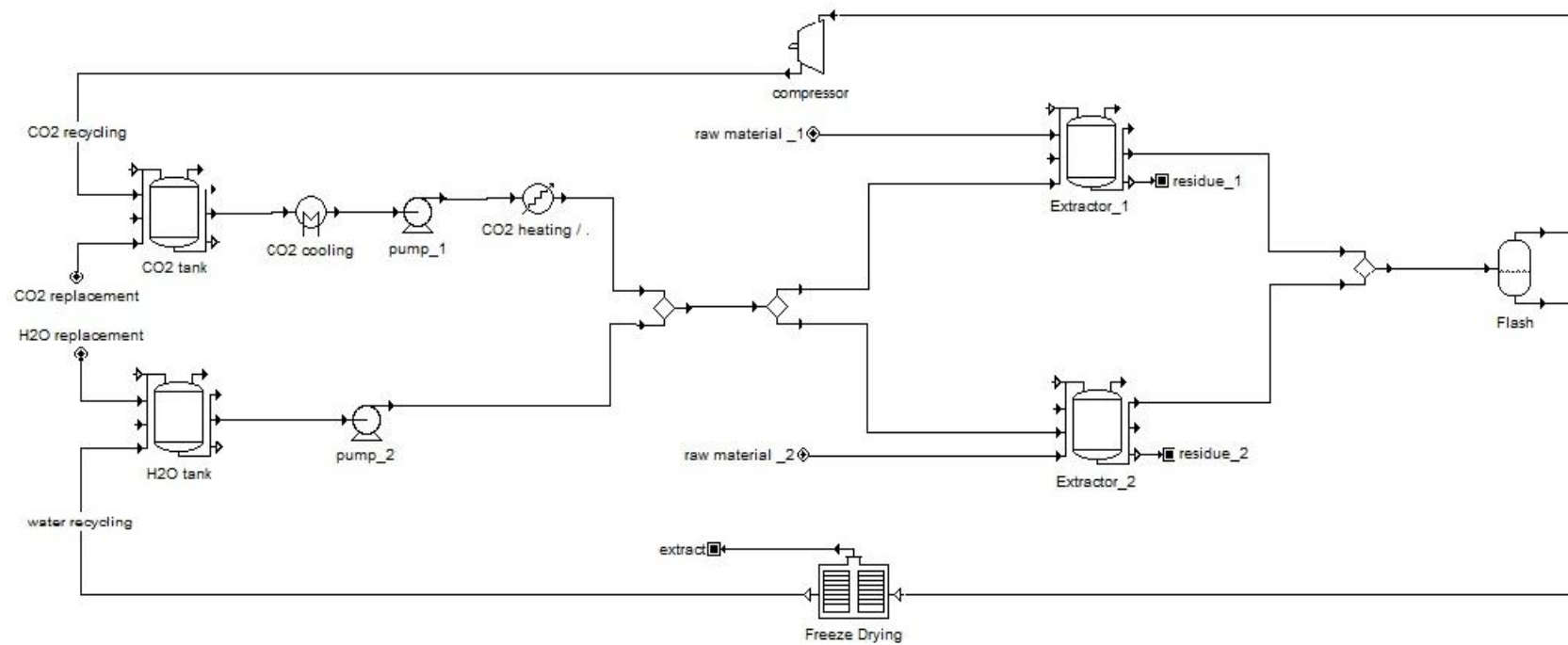


Figura 3.12. Fluxograma do processo SFE (CO₂ + H₂O) montado no simulador SuperPro Designer[®].

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Os valores de umidade, diâmetro médio das partículas, densidade real e aparente para as matérias-primas podem ser observados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização da matéria-prima.

| | Cipó-de-são-joão | Inga-cipó | Nó-de-cachorro | Jatobá (lote 1) | Jatobá (lote 2) | Feijão |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Umidade (%) | 9,55 | 10,62 | 12,62 | 9,21 | 10,26 | 13,29 |
| d_{mg} (m) | $9,97 \times 10^{-4}$ | $9,96 \times 10^{-4}$ | $9,97 \times 10^{-4}$ | $9,92 \times 10^{-4}$ | $9,92 \times 10^{-4}$ | $9,91 \times 10^{-4}$ |
| ρ_r (kg/m ³) | 1240 | 1420 | 1200 | 1540 | 1400 | 1450 |
| ρ_a (kg/m ³) ^a | 426,20 | 506,90 | 490,10 | 619,15 | 619,15 | 845,00 |
| ρ_a (kg/m ³) ^b | 352,26 | 370,30 | 414,15 | 404,00 | 404,00 | 721,30 |

d_{mg} - diâmetro médio geométrico das partículas; ρ_r - densidade real das partículas; ρ_a - densidade aparente das partículas; ^aCO₂; ^bCO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O.

4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1. RENDIMENTO GLOBAL (X_0)

Os valores de rendimento global (X_0 , $S/F=50$) obtidos na condição de 323 K e 35 MPa, expressos em média de dois experimentos \pm amplitude para as cinco plantas estudadas utilizando CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O podem ser observados na Tabela 4.2.

As condições operacionais fixadas de temperatura e pressão tiveram como finalidade avaliar a potencialidade do dióxido de carbono supercrítico puro e associado à cossolventes em extrair compostos fenólicos de elevado potencial antioxidante das cinco plantas selecionadas, já que não era conhecido nenhum dado até então na literatura utilizando esta tecnologia. Normalmente o CO₂ supercrítico a uma temperatura moderada (cerca de 323 K) e pressão elevada (cerca de 35MPa), devido a sua alta densidade como solvente da extração, pode promover a solubilização de diferentes compostos normalmente encontrados nos extratos SFE (BRUNNER, 1994).

Tabela 4.2. Rendimento global (X_0 , $S/F=50$; 323 K; 35 MPa), obtido por SFE das matérias-primas pré-selecionadas.

| Matéria-prima | Rendimento (% , b.s.) | | |
|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|
| | CO ₂ | CO ₂ + EtOH | CO ₂ + H ₂ O |
| Cipó-de-são-joão | 1,18±0,08 | 2,39±0,06 | 18±2 |
| Inga-cipó | 1,51±0,01 | 2,75±0,02 | 1,31±0,02 |
| Nó-de-cachorro | 0,78±0,02 | 2,44±0,02 | 12±2 |
| Jatobá (lote 1) | 0,28±0,04 | 0,58±0,03 | 24±3 |
| Feijão | 0,53±0,01 | 1,54±0,01 | 2,67±0,09 |

O comportamento da solubilidade de cada composto específico presente no extrato não é o mesmo (SALDANA et al., 1999). Desta forma, após a etapa de caracterização dos extratos quanto aos compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante, para a matéria-prima selecionada foram realizados outros experimentos a fim de avaliar o efeito das condições operacionais na composição do extrato.

Nas extrações envolvendo o CO₂ puro como solvente, os rendimentos foram inferiores aos obtidos para as extrações com a adição de cossolvente. Nesta condição, o jatobá apresenta o menor rendimento (X_0 , $S/F=50$ = 0,28 %, b.s.) enquanto que o ingá-cipó apresenta maior rendimento (X_0 , $S/F=50$ = 1,51 %, b.s.). Portanto, pode-se dizer que há maior quantidade de compostos extraíveis no extrato das folhas de ingá-cipó, seguido dos extratos de cipó-de-são-joão, nó-de-cachorro, feijão e jatobá.

Os extratos obtidos utilizando CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O como solventes da extração apresentaram maiores rendimentos, com exceção do ingá-cipó quando extraído com CO₂ + H₂O. Ainda para este solvente, os extratos de jatobá, cipó-de-são-joão e nó-de-cachorro apresentaram rendimentos bastante elevados. Segundo MARQUES et al. (2007) a água foi o melhor líquido extrator das substâncias presentes nas raízes de nó-de-cachorro no que se refere ao teor de sólidos extraíveis, demonstrando a presença de substâncias de alta polaridade em grande quantidade em suas raízes.

Comparando os cossolventes água e etanol, a água possui maior constante dielétrica comparada a outros cossolventes geralmente utilizados na extração supercrítica,

apresentando assim maior polaridade, o que pode ter causado o aumento no rendimento global dos extratos.

A mudança no sentido do fluxo do processo de extração $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ para descendente (seção 3.2.1.3) influenciou na recuperação dos extratos. Este comportamento foi discutido por CASAS et al. (2007). Quando compararam a extração SFE em escala analítica (fluxo descendente) e piloto (ascendente), os autores descreveram que no fluxo descendente, a água é forçada a deixar o extrator aumentando o arraste das substâncias e, portanto, o rendimento. Por outro lado, a passagem do solvente sendo ascendente, grande parte da água não solubiliza no CO_2 e permanece no extrator.

Segundo alguns estudos, a água tem sido muito utilizada como cossolvente para isolamento de compostos polares. No estudo realizado por IHEOZOR-EJIOFOR e ESTERA SZWAJECER (2009) o uso da água como cossolvente da extração resultou em maior rendimento do composto de interesse devido à habilidade da água interagir com as partes polares localizadas nas extremidades da molécula. Além disso, a água pode aumentar a densidade da mistura fluida (DE LUCAS et al., 2007) ou até mesmo amolecer, e posteriormente inchar a matriz alterando o processo de difusão matriz-analito favorecendo a penetração do CO_2 supercrítico, provocando uma melhor solubilização (LI et al., 2003). MARTINEZ-CORREA et al. (2012) encontraram maiores concentrações de flavonoides quando a água foi utilizada como cossolvente na extração de folhas de alecrim do campo. No estudo de SANTOS et al. (2012) a mistura $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ resultou em maior teor de polifenóis, rendimento global e atividade antioxidante. Portanto, devido à polaridade dos polifenóis, é de se esperar maior recuperação destes com a adição do cossolvente.

4.2.1.1. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SFE UTILIZANDO CO_2 PURO COMO SOLVENTE

Com o objetivo de avaliar a composição química dos extratos das plantas obtidos nos ensaios de rendimento global utilizando somente CO_2 , foram realizadas análises por CCD (cromatografia em camada delgada) dos extratos. A Figura 4.1 mostra o comportamento das cromatofolhas em relação à composição dos extratos após o uso do revelador de DPPH, ocorrendo uma mudança da coloração violeta (característica do

radical) para a amarela. Na Figura 4.1-A é possível observar o aparecimento de algumas bandas amarelas após 10 minutos da revelação da placa. Já na Figura 4.1-B, somente após 1 hora de revelação da placa, foi possível observar as bandas amarelas completas indicando a presença de compostos antioxidantes nos extratos. O extrato de ingá-cipó foi o que apresentou maior concentração de antioxidantes, seguido dos extratos de cipó-de-são-joão, feijão, nó-de-cachorro e jatobá. Ainda, a fase móvel escolhida foi adequada para a análise, uma vez que permitiu uma boa resolução e consequente separação de diversas substâncias.

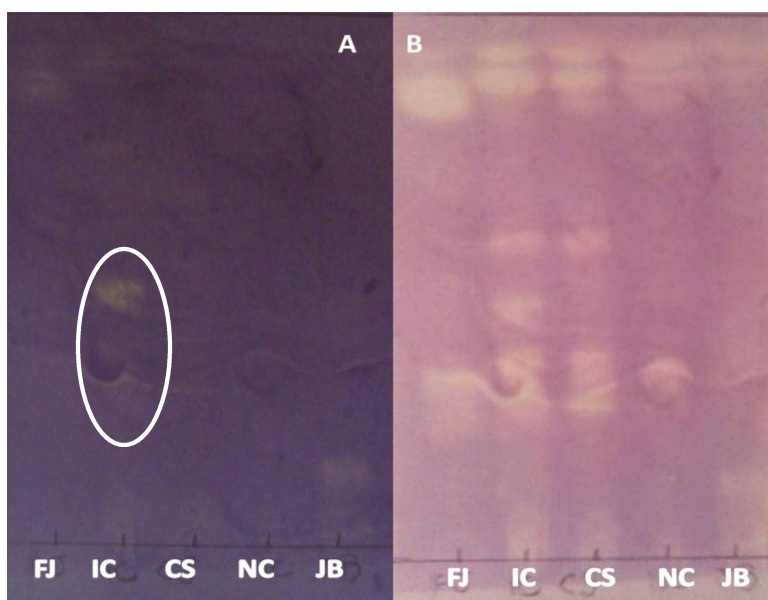


Figura 4.1. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 10 minutos de revelação (A) e após 1 hora de revelação (B) utilizando revelador DPPH e CO₂ como solvente.

Na Figura 4.2 é possível detectar a presença de alcalóides nos extratos de ingá-cipó e cipó-de-são-joão. De acordo com WAGNER e BLADT (2001), a presença de bandas amarelas na Figura 4.2-A caracteriza os alcalóides, e na Figura 4.2-B, as bandas amarelas fluorescentes, violeta-avermelhada escura e fluorescente, também caracterizam os alcalóides. Ainda, de acordo com estudo realizado por GRANATO et al. (2005), não foi possível detectar a presença de alcalóides no extrato da casca de jatobá na análise com CCD.

O perfil de composição dos extratos quanto à presença de terpenóides (revelador de anisaldeído) pode ser observado na Figura 4.3. Na Figura 4.3-A, bandas das cores azul forte, violeta-azul e cinza são características de alcoóis terpenos e éster

terpenos. Ainda, sabe-se que a presença das cores cinza-azul e violeta-azul podem ser características de saponinas glicosiladas. Já na Figura 4.3-B, podem ser observadas bandas fluorescentes das cores vermelho-marrom, violeta e violeta-azul característico de alcoóis terpenos e também de saponinas glicosiladas. De acordo com estudo de ABDEL-KADER et al. (2002), as resinas de jatobá são caracterizadas pela elevada fração de ácidos diterpênicos.

Utilizando o revelador de flavonoides (Figura 4.4) foram detectadas bandas amarelas após a revelação da placa no visível (A) e bandas azuis e vermelhas fluorescentes sob luz UV de 365 nm (B). Pode-se observar que para o extrato do feijão nenhum composto foi detectado. O extrato de jatobá apresentou fluorescência intensa na cor azul, de acordo com estudo de PETTIT et al. (2003) mostrando a presença de estruturas variadas de flavonoides no extrato metanólico desta planta. No extrato de nó-de-cachorro, a banda em azul destacada refere-se à mesma daquela detectada na Figura 4.1 com revelador DPPH, comprovando a atividade antioxidante do composto fenólico. O mesmo comportamento pode ser observado para os extratos de ingá-cipó, cipó-de-são-joão e jatobá, em que as mesmas bandas azuis e vermelhas são as apresentadas na Figura 4.1. As bandas azuis fluorescentes são caracterizadas pelos ácidos carboxílicos fenólicos. Não foi detectada nenhuma banda para o padrão de quercetina como o identificado por SOUZA et al. (2007) para o extrato de ingá-cipó e β -sitosterol no extrato de cipó-de-são-joão obtido por KRISHNA et al. (2002). Portanto, sob luz UV-254 (C) as manchas pretas destacadas, principalmente para os extratos de feijão, ingá-cipó, cipó-de-são-joão e nó-de-cachorro, confirmam a presença de flavonoides. O comportamento observado contradiz o sugerido por MENAKER et al. (2004), CATCHPOLE et al. (2004) e de DE MARIA et al. (1997) em que compostos polares como flavonoides são dificilmente extraídos utilizando somente CO₂ no processo SFE, havendo a necessidade de adição do modificador.

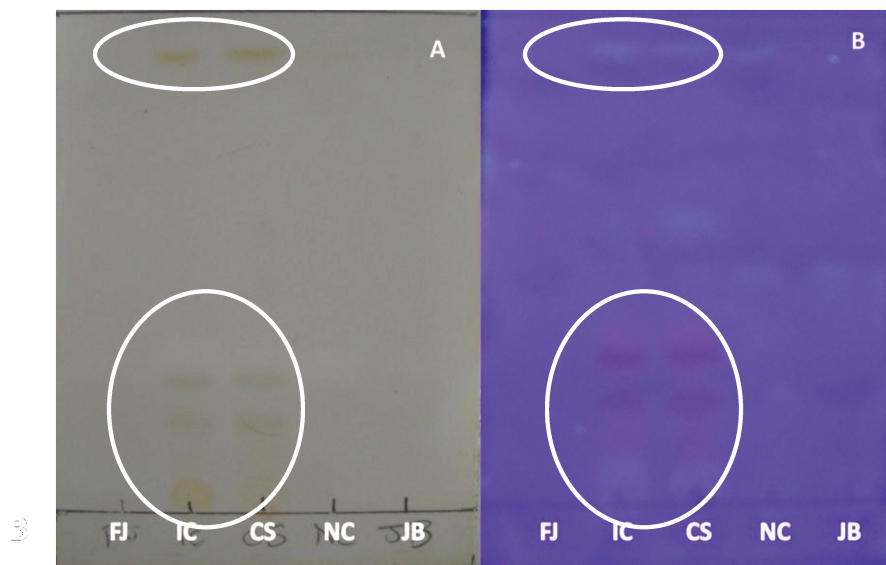


Figura 4.2. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), depois de revelado (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador alcalóides e CO₂ como solvente.

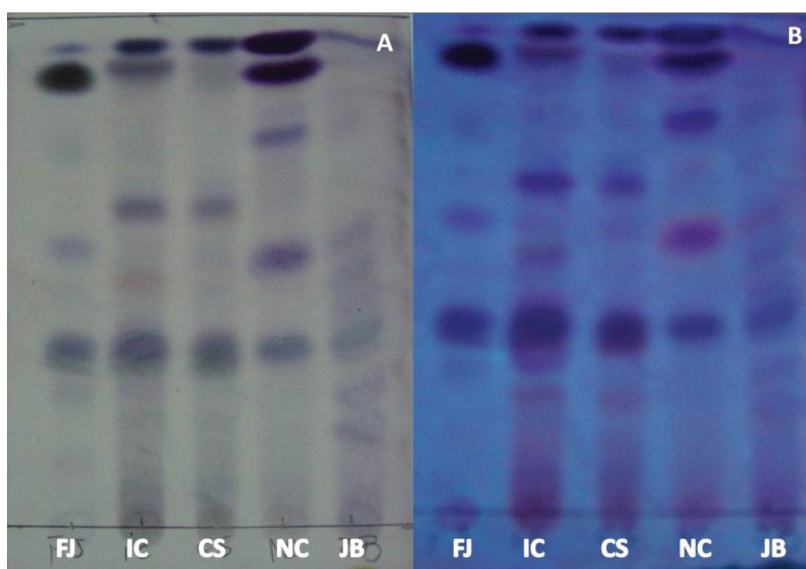


Figura 4.3. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e CO₂ como solvente.

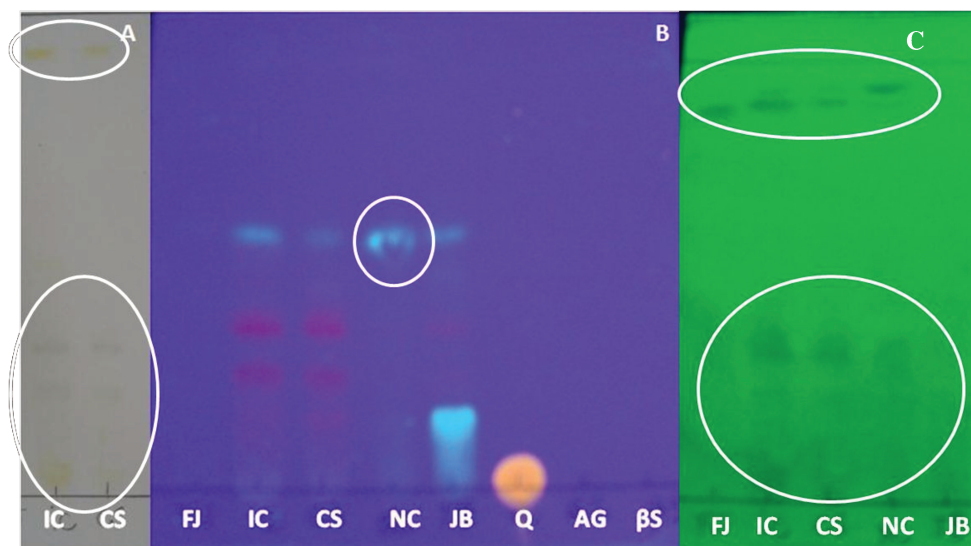


Figura 4.4. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC), jatobá (JB); padrões quercetina (Q), ácido gálico (AG) e β -sitosterol (BS), no visível (A), em UV-365 nm (B) e em UV-254 nm (C) utilizando revelador de flavonoides e CO_2 como solvente.

4.2.1.2. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SFE UTILIZANDO COMO SOLVENTE A MISTURA CO_2 + ETANOL

A Figura 4.5 mostra o comportamento das cromatofolhas em relação à composição dos extratos após aplicação do revelador DPPH, ocorrendo uma mudança da coloração violeta (característica do radical) para a amarela. Foi possível observar o clareamento das bandas indicando a presença de compostos antioxidantes nos extratos de ingá-cipó e cipó-de-são-joão com maior intensidade seguido do extrato de jatobá e feijão. Ainda, a fase móvel escolhida foi adequada para a análise, uma vez que permitiu uma boa resolução e conseqüente separação de diversas substâncias. Porém, detectaram-se maior intensidade de clareamento nas placas características de compostos antioxidantes para os extratos obtidos com CO_2 (Figura 4.1) quando comprado aos obtidos com CO_2 + EtOH.

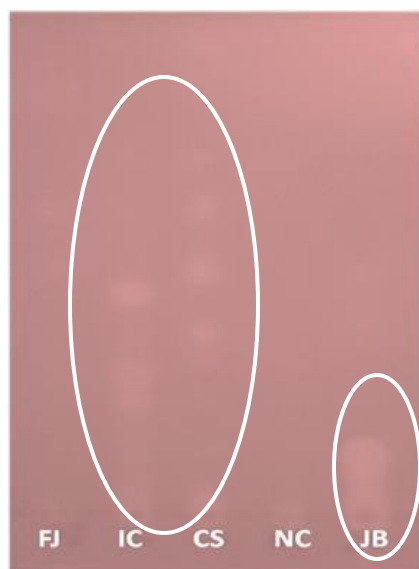


Figura 4.5. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 30 minutos de revelação utilizando revelador DPPH e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ como solvente.

O perfil de composição dos extratos quanto à presença de terpenóides (revelador de anisaldeído) pode ser observado na Figura 4.6. Na Figura 4.6-A, bandas das cores azuis forte, violeta-azul, verde, marrom e cinza são características de alcoóis terpenos e éster terpenos. Ainda, sabe-se que a presença das cores cinza-azul e violeta-azul podem ser características de saponinas glicosídeos. Já na 4.6-B, podem ser observadas bandas fluorescentes das cores laranja-marrom e vermelho-marrom característico de alcoóis terpenos e também de saponinas glicosídeos. De acordo com estudo de ABDEL-KADER et al. (2002), as resinas de jatobá são caracterizadas pela elevada fração de ácidos diterpenos. Apesar das bandas obtidas para as placas dos extratos de $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ apresentarem perfil diferente daquela observada na Figura 4.2, as colorações são características da mesma classe de compostos.

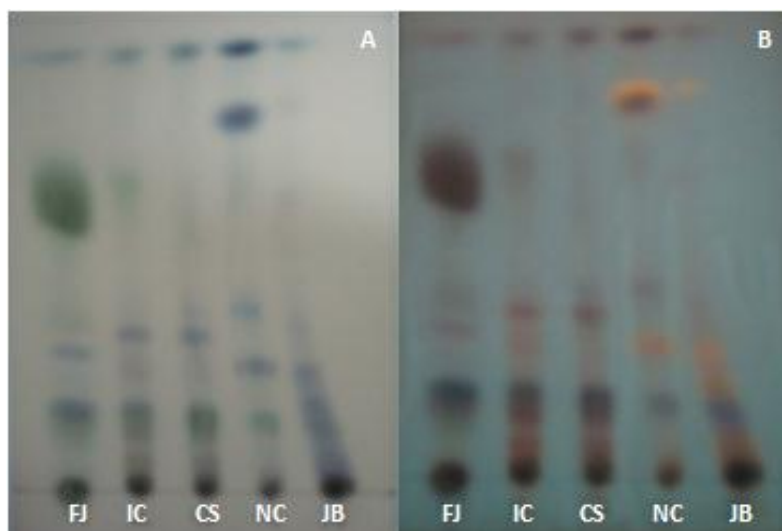


Figura 4.6. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ como solvente.

Utilizando o revelador de flavonoides (Figura 4.7) foram detectadas bandas amarelas e cinzas após a revelação da placa no visível (A) e bandas azuis, vermelhas e verdes fluorescentes sob luz UV de 365 nm (B). Pode-se observar um comportamento diferente do observado para os extratos obtidos somente com CO_2 ; para o extrato do feijão, foi detectada uma fluorescência verde clara. O extrato de jatobá apresentou fluorescência intensa nas cores azul, verde e violeta. De acordo com estudo de PETTIT et al. (2003), a cor azul é característica de ácidos carboxílicos fenólicos. Os autores detectaram a presença de estruturas variadas de flavonoides no extrato metanólico do jatobá. A cor verde caracteriza a presença do flavonóide canferol glicosilados, e uma banda violeta forte entre as duas bandas azuis, que de acordo com WAGNER e BLADT (2001) e com a literatura caracteriza o flavonol quercetina. No entanto, neste caso o padrão apresentou coloração amarela. O mesmo comportamento pode ser observado para os extratos de ingá-cipó e cipó-de-são-joão, porém, para este último foi observado uma banda verde no início caracterizando o canferol. As bandas azuis fluorescentes são caracterizadas pelos ácidos carboxílicos fenólicos e as vermelhas por flavonoides agliconas.

No extrato de nó-de-cachorro, podem-se observar inflorescências nas cores azuis e verde. A banda em azul é a mesma daquela detectada na Figura 4.5 com revelador

DPPH, comprovando a atividade antioxidante do composto fenólico. Não foi detectada nenhuma banda para o padrão de quercetina (laranja) como o identificado por SOUZA et al. (2007) para o extrato de ingá-cipó, e de β -sitosterol no extrato cipó-de-são-joão como o obtido por KRISHNA et al. (2002). Ainda, as bandas encontradas nas cromatofolhas de $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ foram as mesmas das obtidas com CO_2 . As bandas nas cores azul e vermelha dos extratos de ingá-cipó, cipó-de-são-joão e nó-de-cachorro apresentam o mesmo perfil e ainda, no extrato de jatobá, a coloração verde observada refere-se a azul obtida com CO_2 , sendo a cor azul acima aparecendo somente nesta placa.

Na cromatofolha correspondente ao revelador de alcalóides pode-se observar o mesmo comportamento para os extratos de ingá-cipó e cipó-de-são-joão como apresentado anteriormente para extrações somente com CO_2 . Ainda, foi detectada uma banda de cor violeta fluorescente para o extrato da casca de jatobá, a mesma observada com revelador de flavonoides, confirmando a presença de alcalóides de acordo com estudo realizado por GRANATO et al. (2005), o que não ocorreu para extratos obtidos somente com CO_2 . De acordo com WAGNER e BLADT (2001), a presença de bandas amarelas fluorescentes e violeta-vermelho escura caracterizam os alcalóides.

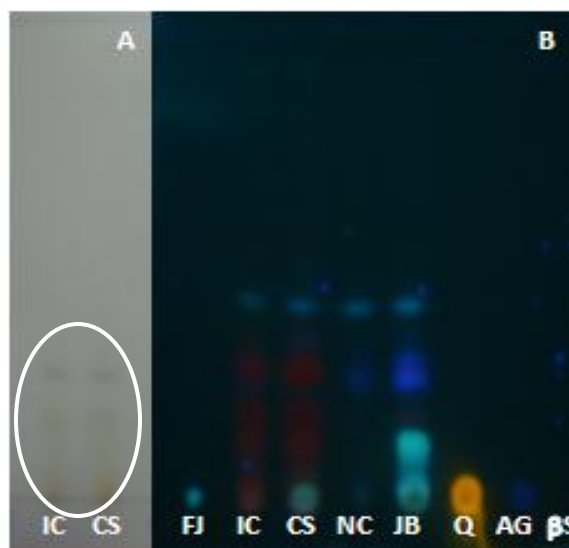


Figura 4.7. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC), jatobá (JB); padrões quercetina (Q), ácido gálico (AG) e β -sitosterol (BS), no visível (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de flavonoides e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ como solvente.

4.2.1.3. CCD DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SFE UTILIZANDO COMO SOLVENTE A MISTURA $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

O comportamento das cromatofolhas em relação à composição dos extratos após aplicação do revelador DPPH pode ser observado na Figura 4.8. Foi possível observar o clareamento das bandas indicando a presença de compostos antioxidantes, principalmente no extrato de jatobá. Além disso, nos extratos de feijão, cipó-de-são-joão e ingá-cipó foram observadas manchas amareladas, porém, de menor intensidade. Comparando o comportamento dos três extratos (CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) para o revelador DPPH, pode-se verificar um intenso clareamento da banda do extrato de jatobá, confirmando a elevada AA deste quando a água é empregada como cossolvente.

Na Figura 4.9 pode-se observar o perfil das cromatoplasmas quanto à presença de alcalóides. No visível, nó-de-cachorro e jatobá apresentaram bandas laranja-marrom caracterizando os alcalóides. A mancha azul para o feijão observada sob luz UV-365 é também característica de alcalóides.

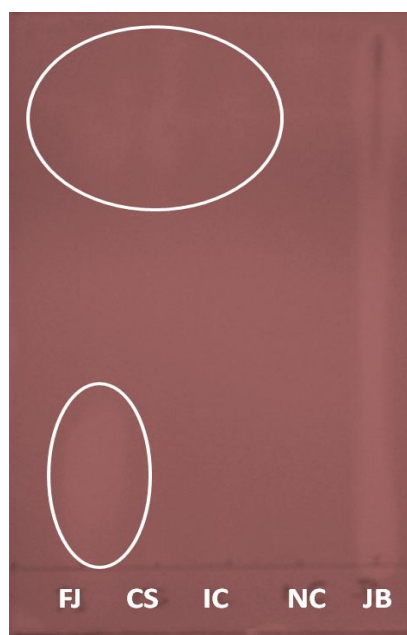


Figura 4.8. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), após 30 minutos de revelação utilizando revelador DPPH e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente.

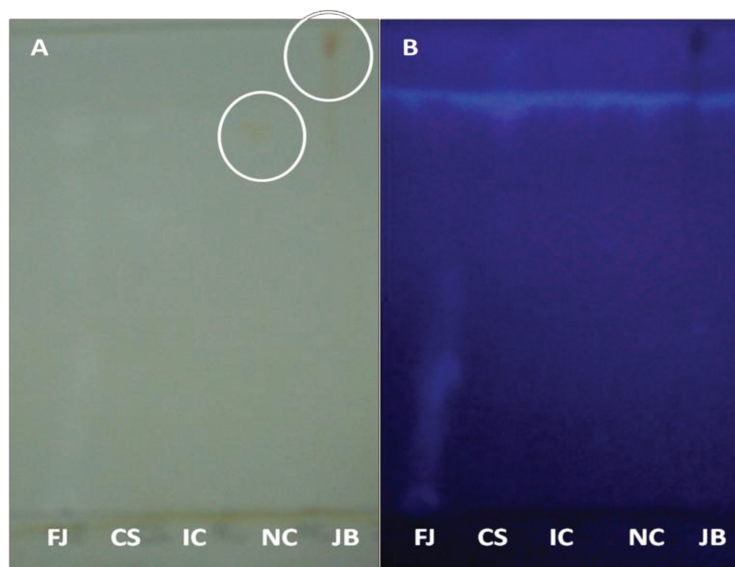


Figura 4.9. CCD dos extratos de feijão (FJ), ingá-cipó (IC), cipó-de-são-joão (CS), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), depois de revelado (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador alcalóides e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente.

Na placa de flavonoides (Figura 4.10) é possível observar sob luz UV-365 em A, a presença de uma banda azul fluorescente para o feijão e uma amarela fluorescente para o cipó-de-são-joão. No visível, para o jatobá é possível observar uma mancha amarela, característica de flavonoides. O perfil de composição para os extratos de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ foi bem diferente ao observado para CO_2 e $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$, não sendo possível a caracterização de grande variedade de compostos nestes extratos.

Na cromatoplaça A da Figura 4.11 para terpenóides, pode-se observar as cores fortes cinza, verde e marrom no visível. Quando submetidas em UV-365 nm, estes compostos desenvolvem fluorescência nas cores marrom e violeta forte caracterizando os terpenos. Também, foi feito uma cromatoplaça de antocianinas, porém, não foi possível a visualização de bandas que caracterizassem as antocianinas.

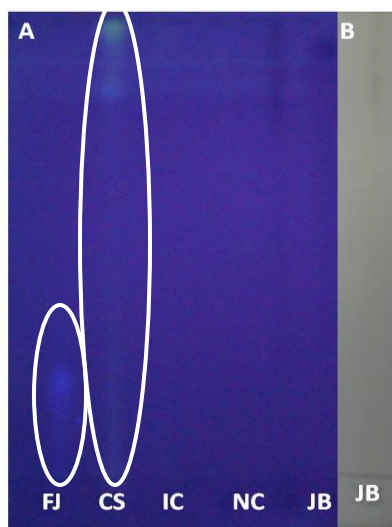


Figura 4.10. CCD dos extratos de feijão (FJ), cipó-de-são-joão (CS), ingá-cipó (IC), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB) em UV-365 nm (A) e no visível (B) utilizando revelador de flavonoides e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente.

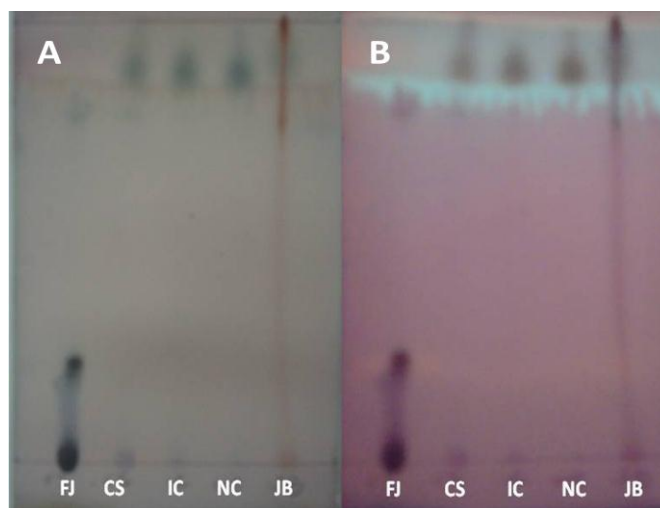


Figura 4.11. CCD dos extratos de feijão (FJ), cipó-de-são-joão (CS), ingá-cipó (IC), nó-de-cachorro (NC) e jatobá (JB), no visível depois do aquecimento em 373 K (A) e em UV-365 nm (B) utilizando revelador de terpenóides e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente.

4.2.1.4. POLIFENÓIS TOTAIS

A Figura 4.12 apresenta as concentrações de polifenóis totais nos extratos de SFE obtidos com CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, em relação ao rendimento global (X_0) nas condições de 323 K e 35 MPa.

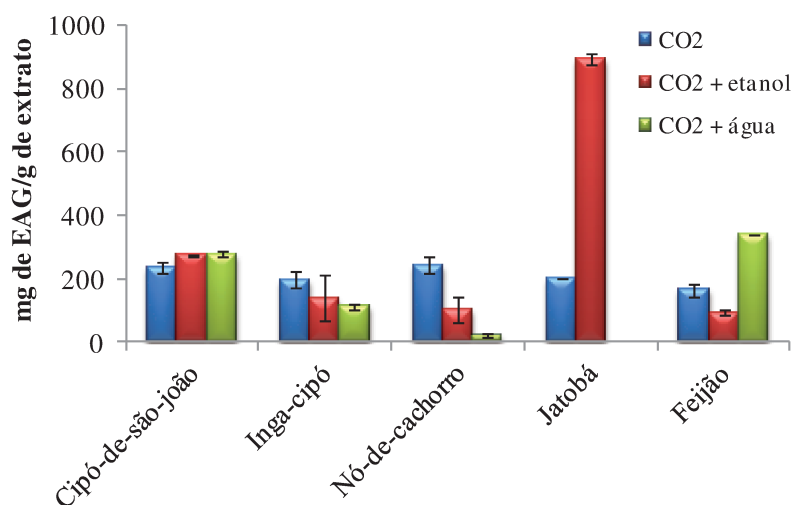


Figura 4.12. Concentração dos compostos fenólicos totais nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O.

Em relação ao comportamento do extrato de jatobá obtido com CO₂ + H₂O, a metodologia adotada pode não ter sido adequada para determinação dos teores de fenóis. De acordo com a literatura, é possível a existência de fenóis que dão origem aos taninos, substâncias polifenólicas que possuem atividades antioxidantes (FERNANDES, 2005). Os taninos são compostos solúveis em água com elevada massa molecular (300 a 3000 Dalton) e apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água. Segundo BRAVO et al. (1998), essa insolubilidade é fonte de erros na quantificação de polifenóis de plantas em alguns métodos empregados, pois os extratos negligenciam a fração insolúvel. Os extratos de jatobá obtidos com CO₂ + EtOH, apresentaram alto índice de fenóis. Neste caso, um extrato com mistura complexa de compostos pode ter sido extraído com a adição do etanol, conduzindo a um falso resultado.

De acordo com os resultados, pode-se verificar que para os extratos de ingá-cipó e nó-de-cachorro, o teor de fenóis diminuiu com o uso dos cossolventes etanol e água. Foi constado na literatura a presença de taninos condensados em ingá-cipó (ARCURI et al., 2003; DIAS et al., 2010), porém neste estudo, o comportamento dos extratos em relação aos fenóis não foi eficiente na presença de cossolventes. Possivelmente, classes diferentes de compostos podem ter sido extraídas quando adicionado os cossolventes. No estudo

realizado por DIAS et al. (2010), frações enriquecidas em polifenóis nas folhas de ingá-cipó foram obtidas a partir de extrações líquido-líquido e em fase sólida (SPE-C₁₈) com acetona, água e ácido acético em diferentes polaridades. O mesmo comportamento foi observado por SILVA et al. (2007a) e SILVA et al. (2007b) avaliando os teores de fenóis das folhas de ingá-cipó. MARQUES et al. (2007) avaliaram o teor de fenóis das raízes de nó-de-cachorro com diferentes líquidos extratores em extração a baixa pressão. Segundo os autores, a água foi o que levou a maior rendimento (média de 45 %) e maior teor de polifenóis totais (10,2 %), contrário do obtido nesse estudo.

Para o extrato de feijão, o sistema CO₂ + H₂O (338,21 mg EAG/g de extrato) mostrou-se mais eficiente comparado ao CO₂ + EtOH (93,1 mg EAG/g de extrato) e CO₂ (163,41 mg EAG/g de extrato). O alto teor de fenóis encontrado no feijão utilizando água também pode ser explicado pela presença de taninos condensados. Segundo RANILLA et al. (2007), cascas de feijão de cores escuras como o utilizado neste estudo, tendem a ter níveis mais elevados de compostos fenólicos totais e taninos condensados do que outros grupos de cores claras.

Comportamento similar pode ser observado para o extrato de cipó-de-são-joão. Os teores de fenóis foram superiores quando empregado o solvente etanol e água, 273,77 e 277,38 mg EAG/g de extrato respectivamente. DOS SANTOS e BLATT (1998) reportaram a análise quantitativa de fenóis totais, flavonoides e taninos originários das folhas de cipó-de-são-joão da mata e do cerrado; os teores de fenóis obtidos foram considerados baixos devido à ausência de taninos e baixo teor de flavonoides.

Muitos trabalhos descrevem a influência dos métodos de extração na obtenção de compostos fenólicos. PAREJO et al. (2004) compararam o teor de compostos fenólicos analisadas por CLAE com o método de FC. Medindo o teor de compostos fenólicos do funcho, os valores obtidos pelo método de FC foram superestimados devido à interferência de substâncias não fenólicas, e também da falta de especificidade na medição espectrofotométrica do método de FC.

WU et al. (2004) relatam que o conteúdo de fenólicos totais medidos pelo procedimento de Folin-Ciocalteu não dão um quadro completo da qualidade e da quantidade de compostos fenólicos nos extratos. Dentro deste contexto, a utilização do

método FC possibilitou a verificação do comportamento dos extratos das diferentes matérias-primas quanto ao emprego de diferentes solventes.

4.2.1.5. FLAVONOIDES

As concentrações dos flavonoides dos extratos obtidos por SFE com CO_2 , CO_2 + EtOH e CO_2 + H_2O , em relação ao $X_{0, S/F=50}$ nas condições de 323 K e 35 MPa podem ser observadas na Figura 4.13.

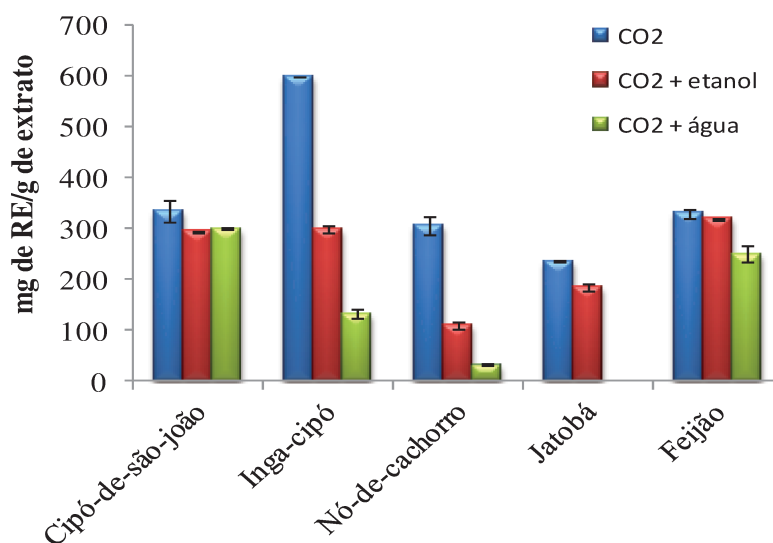


Figura 4.13. Concentração dos flavonoides nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO_2 , CO_2 + EtOH e CO_2 + H_2O .

Da mesma forma como descrito para os polifenóis, a metodologia adotada para flavonoides não foi adequada para o extrato de jatobá obtido com CO_2 + H_2O ; o emprego da água pode ter levado a precipitação de alguns compostos insolúveis em água.

Pode-se observar que menores teores de flavonoides foram obtidos quando empregado cossolventes, etanol e água. Dos extratos obtidos, o de cipó-de-são-joão foi o que apresentou menor variação na quantidade de flavonoides. O extrato de feijão não apresentou diferença significativa entre o CO_2 e CO_2 + EtOH, apenas para CO_2 + H_2O (249,44 mg de EQ/g de extrato).

Para os extratos de ingá-cipó e nó-de-cachorro, essa diferença foi bem perceptível. Em relação ao CO_2 puro, com o emprego do cossolvente etanol a quantidade de

flavonoides para o extrato de ingá-cipó caiu pela metade (598,40 para 298,94 mg de EQ/g de extrato), enquanto para o extrato de nó-de-cachorro esta diferença foi praticamente três vezes menor (305,88 para 110,42 mg de EQ/g de extrato). Quando se empregou a água como cossolvente, estas quantidades foram ainda mais reduzidas. Para o extrato de ingá-cipó e nó-de-cachorro, o teor de flavonoides obtidos foi de 132,54 e 31,3 mg de EQ/g de extrato, respectivamente, com CO₂ + H₂O. Sabe-se que os flavonoides são uma classe de fenóis, portanto, seria coerente que os teores de flavonoides fossem menores que os obtidos nos fenóis. Porém, não foi o observado para as plantas estudadas. A única exceção foi para o extrato de feijão utilizando CO₂ + H₂O (338,21 mg de EAG/g de extrato para fenóis e 249,44 mg de EQ/g de extrato para flavonoides).

RANILLA et al. (2007) constataram a presença dos flavonoides quercetina, canferol e antocianinas nos extratos de feijão extraídos com metanol e água. PADILHA et al. (2007) cita a presença dos flavonoides glicosilados (astilbina, neoastilbina e isoastilbina) no extrato de nó-de-cachorro obtidos com água e etanol.

A escolha da substância de referência para construção da curva padrão e cálculo do teor de flavonoides pode ter influenciado nos resultados. Desta forma, se a capacidade de redução da substância selecionada como padrão não é precisamente a mesma do extrato analisado, a concentração calculada a partir da curva padrão não refletirá, obviamente no teor de flavonoides da amostra, sendo os valores sub ou superestimados (APPEL et al., 2001).

4.2.1.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A partir da curva de calibração obtida por regressão linear dos valores de concentração do radical DPPH e de suas absorbâncias a 517 nm, foi determinado o IC₅₀ (mg de extrato/cm³), ou seja, a porcentagem de amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH (Figura 4.14).

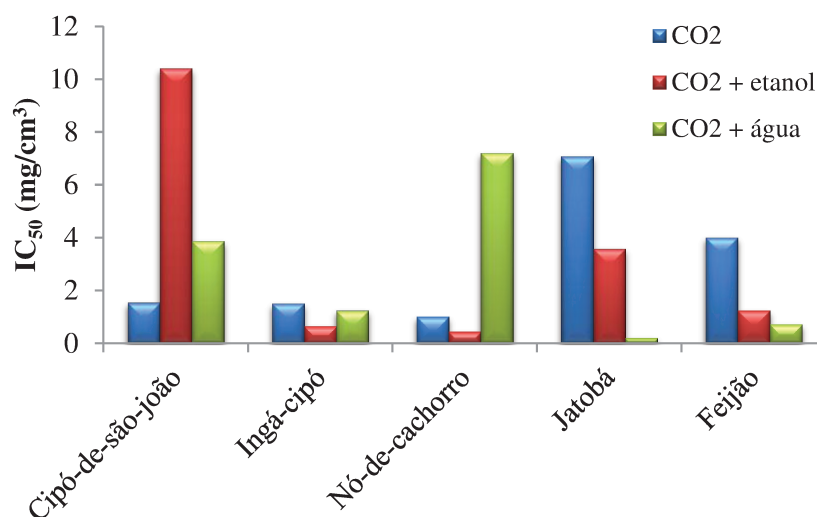


Figura 4.14. Atividade antioxidante nos extratos SFE obtidos a 323 K e 35 MPa com CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O.

Considerando-se que quanto menor o valor de IC₅₀ maior será a atividade antioxidante do extrato analisado, pode-se observar que com o uso da água como cossolvente foi possível obter uma maior AA (atividade antioxidante) para os extratos de jatobá (0,20 mg/cm³) e feijão (0,72 mg/cm³). Este comportamento pode ser explicado devido ao alto poder antioxidante das proantocianidinas (taninos), altamente solúveis em água, sendo estas maiores que todos os compostos fenólicos naturais (SHAN et al., 2005). SUZUKI et al. (2008) obtiveram resultado similar quando analisaram a AA do extrato da casca de jatobá, IC₅₀ de 0,22 mg/cm³. Menores AA dos extratos de jatobá e feijão foram obtidos com CO₂ (7,08 e 4,00 mg/cm³) e CO₂ + EtOH (3,58 e 1,24 mg/cm³). Os resultados obtidos por RANILLA et al. (2007) indicam que os principais compostos fenólicos nas cascas do feijão são taninos condensados, e estes seriam responsáveis pela capacidade antioxidante. Comparando os resultados obtidos para fenóis, flavonoides e AA deste extrato, é possível verificar uma relação direta quando empregado CO₂ + H₂O.

Os extratos de ingá-cipó e nó-de-cachorro apresentaram maiores AA quando o etanol foi utilizado como cossolvente (0,64 e 0,44 mg/cm³). Porém, com o emprego da água, o extrato de nó-de-cachorro apresentou menor AA comparado as outras plantas (7,2 mg/cm³). Os extratos de nó-de-cachorro apresentaram menores teores de flavonoides,

fenóis e AA utilizando o sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Segundo MATTEI et al. (2001), os extratos hidroalcolicos de nó-de-cachorro apresentaram fortes propriedades antioxidantes. Em relação ao ingá-cipó, o extrato de suas folhas é considerado fonte de antioxidantes (SILVA et al., 2007b).

Para o extrato de cipó-de-são-joão, maior AA foi obtida na extração com CO_2 (1,54 mg/cm³), e menor AA foi obtido com $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ (10,41 mg/cm³).

Sabe-se que a utilização do método DPPH para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos está diretamente relacionada com a capacidade de doação de prótons da amostra. Desta forma, extratos mais polares tendem a possuir maior capacidade de captação do radical livre (MENSOR et al., 2001). Por este motivo, a aplicação deste método pode não ter sido viável para determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos com o solvente CO_2 , devido a sua baixa polaridade. Ainda, segundo GORDON et al. (2001) a polaridade não consiste em um único parâmetro que influencia na atividade antioxidante. As características estruturais dos antioxidantes são mais importantes que a polaridade dos extratos, sendo também influenciado pela composição complexa dos extratos.

Apesar de o estudo estar focado no potencial de polifenóis da planta de interesse, trata-se de cinco plantas possuindo compostos fenólicos de diferentes classes. Portanto não cabe a comparação entre as matérias-primas. O comportamento dos cinco extratos perante todas as análises realizadas e sob influência da adição de cossolvente foi importante para avaliar a relação entre os conteúdos de flavonoides, fenóis e a atividade antioxidante destes. Observou-se que nem sempre uma matéria-prima de elevado rendimento necessariamente será rica nos compostos de interesse.

4.2.1.7. IDENTIFICAÇÃO DE TANINOS

Diante de relatos na literatura da presença de taninos nos extratos de jatobá, realizaram-se testes químicos de identificação deste grupo. Desta forma, foi avaliada a presença de taninos condensados e hidrolisáveis. Para isto, selecionaram-se dois métodos para identificação e a verificação da classe presente no tanino, se identificado.

A Figura 4.15 mostra o resultado dos testes químicos aos quais os extratos da casca de jatobá foram submetidos. Em 1, pode-se observar a coloração vermelha, correspondente à análise com vanilina clorídrica. No momento que o HCl foi adicionado, ocorreu a formação instantânea de coloração vermelha, característica de taninos condensados. Quando o extrato foi submetido à análise com sais de ferro, ao serem adicionadas as gotas de FeCl_3 (1 % em metanol), a solução foi precipitando e tornando-se esverdeada (2 e 3). A reação com o cloreto férrico baseia-se na mudança de cor, pela reação dos taninos com este reagente. Segundo a literatura, a formação de precipitado e/ou aparecimento das colorações preta, verde ou azul caracterizam os taninos (MOUCO et al., 2003; DA SILVA et al., 2010). O resultado é positivo para taninos condensados em caso de formação de coloração verde (COSTA e CHAVES, 2001). Portanto, os experimentos confirmam a presença de taninos no extrato de jatobá, o que pode interferir nas demais análises. O próximo passo foi caracterizar os extratos por CLAE para a identificação dos compostos.

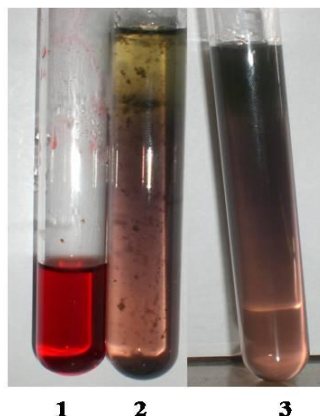


Figura 4.15. Identificação de taninos nos extratos de jatobá obtidos por SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$: reação com vanilina clorídrica (1), reação com sais de ferro (2) e (3).

4.2.2. ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL (IRG)

Os experimentos de rendimento global utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ variando duas temperaturas e três pressões foram refeitos para o lote 2 de jatobá (Figura 4.16). Desta forma, foi possível visualizar o comportamento do extrato diante as condições empregadas, facilitando a seleção das condições operacionais de extração.

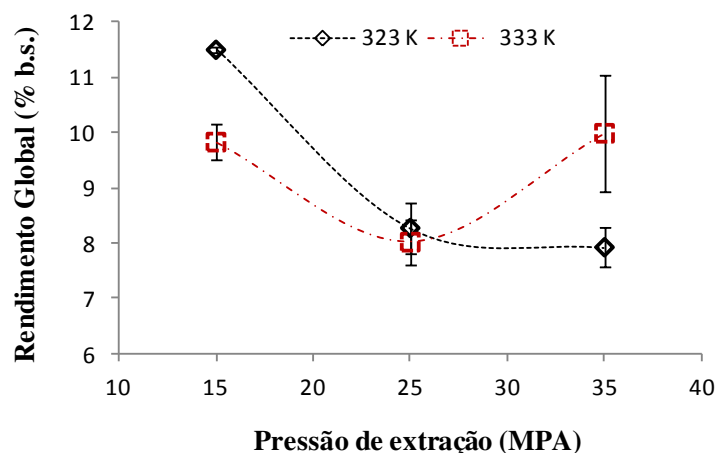


Figura 4.16. Isotermas de rendimento global dos extratos de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (lote 2).

A densidade da mistura do solvente de extração ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) é uma das propriedades que mais afetam no rendimento global. Comparando-se as duas isotermas obtidas, é evidente um ponto de inversão nas proximidades de 25 MPa. Esta característica indica que na pressão acima deste ponto (35 MPa), a influência da pressão de vapor dos compostos extraídos é predominante sobre a influência da densidade. Desta forma, em 35 MPa, o rendimento global aumentou (10 %) com a temperatura devido ao aumento na pressão de vapor do soluto.

Pode ser observado que sob temperatura constante de 323 K, o aumento na pressão provocou uma diminuição no rendimento da extração. O rendimento para esta temperatura nas pressões de 25 e 35 MPa apresentou pequena diferença, 8,2 e 7,9 % respectivamente; e o maior rendimento foi em 15 MPa (11,5 %). Este comportamento se deve à modificação da matriz da planta e a maior dessorção dos compostos menos polares com a presença de água. Além disso, nessa mesma pressão (15 MPa), o aumento da temperatura acarretou na diminuição da solubilidade no solvente, induzindo ao menor rendimento em 333 K (9,8 %).

A isoterma a 333 K mostra que houve uma redução na recuperação do extrato quando a pressão foi aumentada de 15 MPa (9,8 %) para 25 MPa (8,0 %), e voltou a aumentar quando se elevou a pressão a 35 MPa. Portanto, pode ter ocorrido diminuição da solubilidade de parte dos compostos extraíveis a 15 MPa com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ao se aumentar a

pressão para 25 MPa, passando a aumentar novamente em pressões mais elevadas. Seria importante avaliar além da composição dos extratos, a sua solubilidade em uma mistura de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, porém, trata-se de uma mistura complexa, ou seja, sistema pseudo-quartenário (CO_2 , água, material celulósico inerte e extrato).

MARKOM et al. (2007) ressalta que uma das maiores vantagens de se utilizar $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ é que os compostos menos polares como flavonoides, voláteis, lipídeos e clorofila podem ser extraídos e fracionados antes dos taninos. O rendimento da extração, no entanto, não é apenas influenciado pelo tipo de solvente (características químicas), mas também pela força de diluição, relação solvente/sólido (S/F), tempo de contato (características físicas) em diferentes condições de extração e até da granulometria do material (MARKOM et al., 2007).

LEAL et al. (2008) avaliaram o efeito da quantidade de cossolvente (1, 10 e 20 % (w/w)) utilizando o sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ na obtenção de compostos antioxidantes de manjeriço. Segundo estes autores, utilizando 10 % de cossolvente em 303 K e 10 e 15 MPa foi obtido maior rendimento (21 %).

4.2.2.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O comportamento das cromatofolhas em relação à composição dos extratos após revelador de taninos pode ser observado na Figura 4.17(A). Pode-se confirmar a presença de substâncias fenólicas da classe dos taninos devido a coloração azul escura. Após serem reveladas com DPPH (B) foi possível observar em todas as condições de extração a intensidade de bandas amarelas sobre fundo violeta, conforme o padrão ácido gálico, indicando a presença de compostos antioxidantes. Todos os extratos apresentaram manchas amarelas referentes às manchas de derivados de taninos reveladas anteriormente, confirmando a elevada AA deste extrato quando o sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ é empregado como solvente. O mesmo comportamento foi obtidos no estudo de SOUZA et al. (2007) e LIONÇO et al. (2001).

A presença de manchas alaranjadas na placa pulverizada com o reagente de Dragendorff confirma a presença de alcalóides (C) (WAGNER e BLADT, 2001).

Na cromatoplaça A da Figura 4.18 para terpenóides, pode-se notar a cor marrom no visível. Quando submetidas em UV-365 nm (B), estes compostos desenvolvem fluorescência nas cores marrom e violeta forte caracterizando os terpenos. E na placa de flavonoides (Figura 4.19) observou-se sob luz UV-365 nm (A) a presença de bandas azuis fluorescentes. Em UV-254 nm (B), as bandas pretas confirmam a presença de flavonoides.

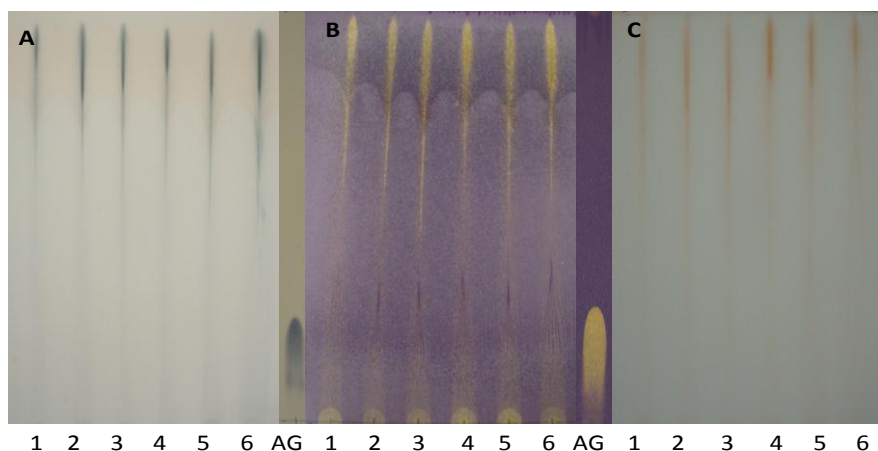


Figura 4.17. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) e padrão ácido gálico (AG) utilizando revelador taninos (A), DPPH (B) e alcalóides (C).

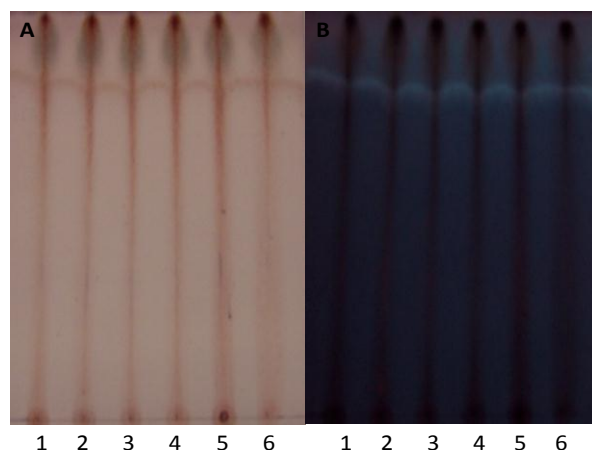


Figura 4.18. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) utilizando revelador terpenóides no visível (A) e em UV-365 nm (B).

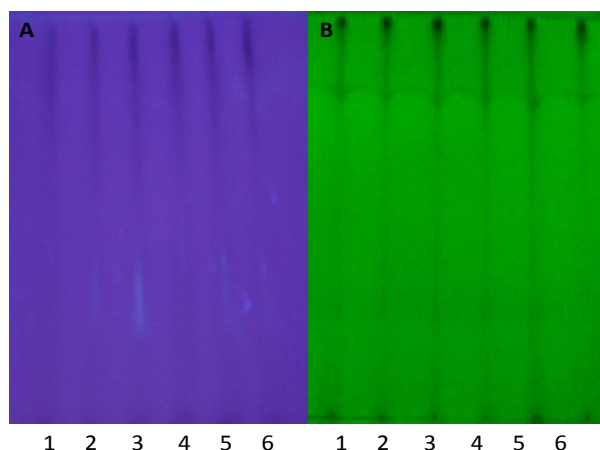


Figura 4.19. CCD dos extratos de jatobá obtidos do rendimento global a 323 K (15 MPa (1), 25 MPa (2), 35 MPa (3)) e a 333 K (15 MPa (4), 25 MPa (5), 35 MPa (6)) utilizando revelador flavonoides em UV-365 nm (A) e em UV-254 nm (B).

4.2.2.2. POLIFENÓIS TOTAIS

Os extratos obtidos a partir dos experimentos de rendimento global da casca de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ foram analisados quanto à presença de polifenóis totais. A Figura 4.20 apresenta o comportamento do extrato quanto à presença de polifenóis ao variar pressão (P) e temperatura (T).

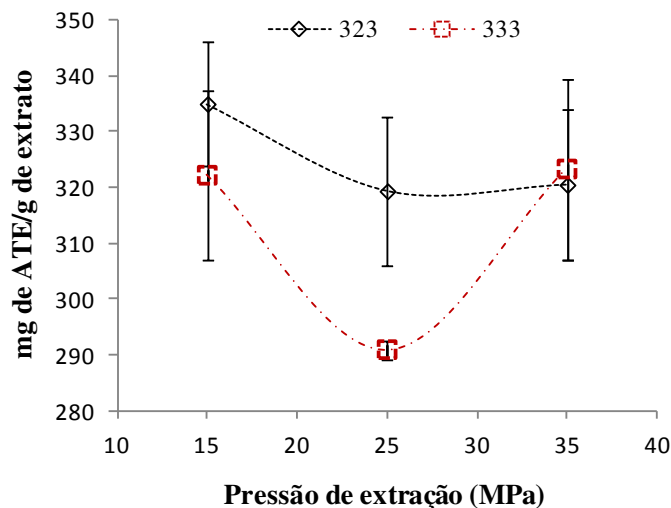


Figura 4.20. Concentração de polifenóis totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ para as diferentes condições de T e P.

Pode-se observar que o comportamento do teor de polifenóis com a T e P foi análogo ao obtido no rendimento global (Figura 4.16). Os resultados indicaram que para a temperatura de 333 K, a variação de polifenóis não foi significativa em 15 e 35 MPa (322,26 e 323,27 mg de ATE/g de extrato). Na pressão de 25 MPa os polifenóis apresentaram menor solubilidade em CO₂ + H₂O; e maior teor de polifenóis foi obtido quando se trabalhou a 323 K com pressão de 15 MPa (335,00 mg de ATE/g de extrato).

Sabe-se que a solubilidade da água em CO₂ é baixa, desta forma, duas fases podem coexistir e resultar em um fracionamento, a fase vapor governada principalmente por CO₂ que extraiu os compostos menos polares e fase líquida governada principalmente por água que extraiu os polifenóis (taninos) (MARKOM et al., 2007).

Segundo REIS et al. (2012), os extratos de bagaço de maçã extraídos com água apresentaram grandes quantidades de compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante. ÇAM e HIŞIL (2010) avaliaram o total de polifenóis de cascas de romã obtidos por extração com água pressurizada e na extração convencional com metanol. Foram determinados teores de 264,3 e 258,2 mgATE/g de extrato, respectivamente, menores que o obtido com SFE neste estudo.

4.2.2.3. TANINOS TOTAIS

A Figura 4.21 apresenta o comportamento dos extratos quanto à presença dos taninos totais ao variar pressão (P) e temperatura (T).

De acordo com os resultados, foram observados maiores teores de taninos nos extratos obtidos a 15 MPa 1,8 % e 1,76 % em 323 e 333 K. O mesmo comportamento foi observado para os extratos obtidos a 25 MPa também nas duas temperaturas de extração, com teores de 1,66 % e 1,62 % em 323 e 333 K. Na condição de 35 MPa, nota-se maiores diferenças dos teores de taninos nas duas temperaturas, 1,57 % e 1,22 % em 323 e 333 K.

Como pode ser observado, maior conteúdo de taninos foi obtido para a condição onde se apresentou maior recuperação de extrato no rendimento global (X₀), 15 MPa e 323 K. O mesmo comportamento é observado a 25 MPa nas duas temperaturas estudadas, e contrário ao ocorrido a 35 MPa. A maior massa de compostos extraíveis na condição de 35 MPa a 333 K (Figura 4.16), pode ser formada de um novo grupo de

compostos, apresentando deste modo uma menor fração de taninos. O aumento da temperatura com a pressão constante em 35 MPa, provocou uma menor recuperação de taninos, o que é provavelmente, devido a degradação destes compostos.

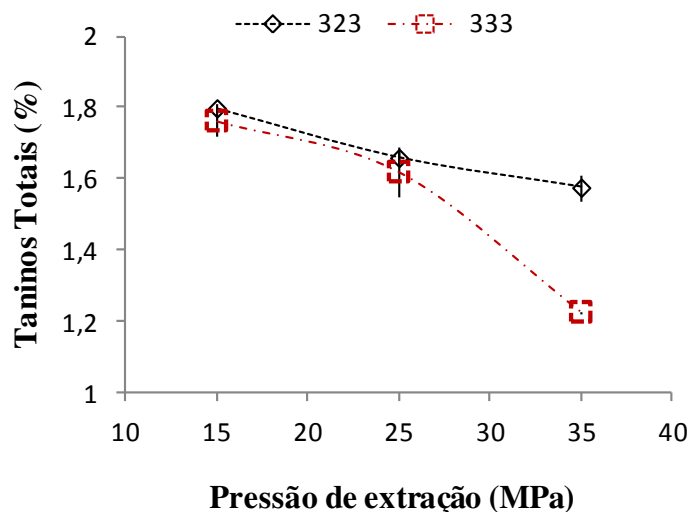


Figura 4.21. Concentração de taninos totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ para as diferentes condições de T e P.

A relação entre a variação da pressão e a recuperação de taninos neste estudo foi contrário ao observado por MURGA et al. (2000), YILMAZ et al. (2011) e BERNA et al. (2001). Segundo estes autores, a solubilidade no solvente aumentou com o aumento da pressão, o que ocasionou maior recuperação de taninos em pressões mais elevadas.

MARKOM et al. (2007) mostram a eficiência da SFE mediante as extrações por soxhlet e água pressurizada na extração de taninos de *Phyllanthus niruri* L. Segundo os autores, apesar da SFE apresentar maior tempo de extração, houve uma menor demanda de solvente (S/F) e obteve-se maior recuperação dos compostos de interesse.

Dentro desse contexto, alguns estudos mostram ainda a eficiência na extração de taninos em diferentes tipos de solventes. Segundo TERRIL et al. (1990) o solvente mais eficiente na extração de taninos foi a acetona (70 % em meio aquoso), principalmente das proantocianidinas. Já para os taninos de baixa massa molecular, o metanol é reportado como melhor solvente. Em relação aos taninos hidrolisáveis, água e metanol mostraram-se melhores que a acetona (MUELLER-HARVEY, 2001). Porém, no trabalho realizado por

MARKOM et al. (2007), semelhante ao rendimento de extração, o maior teor de taninos totais foi encontrado nos extratos obtidos com água e etanol aquoso. O mesmo foi observado por COSTA et al. (2011), em que a água foi a solução extratora que apresentou maior quantidade de taninos. PANSERA et al. (2004) estudaram a obtenção de taninos da casca de *Acacia mearnsii* utilizando a SFE com adição de cossolventes e avaliando as melhores condições de temperatura e pressão de operação. A água (5 %) mostrou ser mais eficiente em 333 K e 20 MPa. Segundo RONDEAU et al. (2013), os taninos condensados representam um valor quantitativamente importante da composição de bagaço de uva, em torno de 21 - 52 % quando extraídos em meio aquoso. CHAVAN et al. (2001) estudaram o efeito de diferentes solventes na extração de taninos condensados de vários tipos de ervilhas. O sistema acetona-água acidificada serviu como um eficiente sistema de recuperação de taninos condensados de diferentes tipos de ervilhas. Este comportamento confirma também o trabalho de outros autores, em que a água e os solventes à base de água são preferencialmente usados na extração de taninos e polifenóis (CHOI et al., 2002; YANG et al., 2002).

Como se trata de matéria-prima rica em taninos, a temperatura tem grande efeito sobre o processo de extração. Muito embora temperaturas elevadas sejam necessárias para superar as interações soluto-matriz (PALMA e TAYLOR, 1999), os taninos são instáveis em altas temperaturas e podem facilmente sofrer reações de oxidação e perder sua atividade antioxidante (MURGA et al., 2000). Como as cascas de jatobá são ricas em taninos, se pode dizer que o aumento da temperatura foi evidente apenas na condição de 35 MPa, podendo ter ocasionado a degradação de alguns destes compostos. Segundo YILMAZ et al. (2011), devido a instabilidade das proantocianidinas em temperaturas elevadas, não é indicado que se trabalhe com temperaturas superiores a 323 K.

É importante destacar que os taninos são quimicamente muito heterogêneos. Desta forma, é possível que haja diferenças consideráveis no conteúdo do tanino relatado de um trabalho científico para outro, tanto entre plantas de gêneros diferentes quanto entre plantas de mesma espécie. Principalmente porque esta variação está diretamente ligada a sua composição, método de análise, período de colheita, localização, condições climáticas dentre outros fatores (PALICI et al., 2005). Tem-se como exemplo o estudo de

MONTEIRO et al. (2005) mostrando que em indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, os teores de taninos nas cascas variam de acordo com o local de origem da amostra. Ainda, alguns taninos são extraídos facilmente com águas e solventes aquosos, enquanto outros são ligados firmemente às fibras ou às proteínas (SANTOS et al., 2010; SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2010).

4.2.3. CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Após os experimentos de X_0 e as análises dos extratos foi possível selecionar a melhor condição operacional para produção de extrato do jatobá. Desta forma, a cinética de extração (OEC) foi construída a 323 K e 15 MPa.

A Figura 4.22 apresenta a OEC do jatobá em função do rendimento e do tempo da extração. Em 450 min, 18 % (b.s) de extrato foram recuperados. Pode-se observar que para o X_0 nesta mesma condição, o rendimento foi menor (11,5 %).

Uma vez que a extração de solutos a partir de matrizes vegetais com fluidos supercríticos não é uma função linear do tempo de extração, a OEC apresenta três períodos de extração característicos da SFE (FERREIRA et al, 2002): as etapas CER (período de taxa de extração constante), FER (período de taxa de extração decrescente) e DC (período difusional). Através da construção da OEC, além de descrever o comportamento cinético da extração, é possível obter informações necessárias para o cálculo de parâmetros cinéticos, os quais serão utilizados na modelagem matemática e para o cálculo do custo de manufatura.

A inclinação da primeira reta representa a taxa de transferência de massa da etapa CER. O tempo que corresponde à interseção das duas primeiras retas é o t_{CER} , que, em geral, representa o tempo mínimo de duração de um processo SFE; o tempo de interseção entre a segunda e a terceira retas é o t_{FER} , que em geral, representa a duração máxima que um processo SFE pode ter para manter a viabilidade econômica do processo (MEIRELES, 2008). R_{CER} é o rendimento da extração obtida na etapa CER; e Y_{CER} corresponde à razão mássica de soluto na fase solvente na saída do extrator.

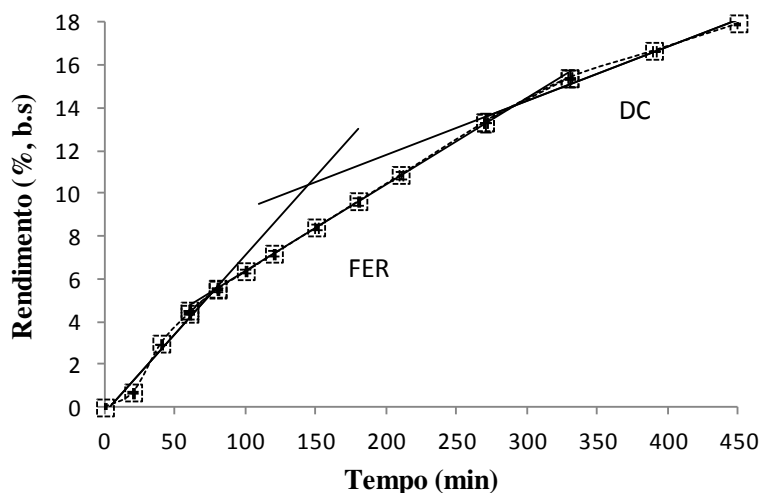


Figura 4.22. OEC da casca do jatobá com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração.

Os parâmetros cinéticos ajustados para os três períodos foram: t_{CER} (64 min), t_{FER} (310 min), R_{CER} (4,93 %), M_{CER} ($5,42 \times 10^{-7}$ kg extrato/s) e Y_{CER} ($4,48 \times 10^{-3}$ kg extrato/ CO_2). A fração de extrato recuperado no período CER de extração foi baixa (27,5 %), apresentando maior resistência a transferência de massa, o que caracteriza um processo mais lento, provavelmente devido à baixa solubilidade do extrato no solvente. No t_{FER} a quantidade de extrato recuperado chega a 82,5 %. Para o ajuste com três retas, pode-se ainda definir o $t_{\text{CER}2}$, sendo este o ponto de interseção entre a primeira e a terceira retas. Assim, quando o t_{CER} é curto, este pode não ser um tempo de processo viável, sendo que apenas 27,5 % do extrato foi recuperado. Neste caso, um tempo de processo igual a $t_{\text{CER}2}$ de 135 minutos e 7,8 %, pode ser mais adequado, tendo em vista que neste período cerca de 43,5 % do extrato é recuperado.

É importante ressaltar que o tempo de processo referente não é determinado considerando-se unicamente sua duração, mas também a composição do extrato, que é uma variável de igual importância na otimização do processo. Desta forma, após a análise de custo será possível verificar a viabilidade do processo através do tempo de processo, permitindo assim estabelecer uma melhor relação entre o menor custo de manufatura, maior rendimento de extração e composto de interesse.

4.2.3.1. TANINOS TOTAIS

A cinética de extração dos taninos totais é mostrada na Figura 4.23. O comportamento foi similar ao da OEC para o rendimento (Figura 4.22), as linhas paralelas fazem referência ao t_{CER} (64 min) e t_{CER2} (135 min) ajustados na OEC. Observando a inclinação da curva, é notável uma baixa recuperação de taninos no período CER. Se consegue extrair 26,8 % (0,717 mgPE/gMP, b.s) e 45,5 % (1,22 mgPE/gMP, b.s) do total de taninos extraídos nos períodos t_{CER} e t_{CER2} respectivamente.

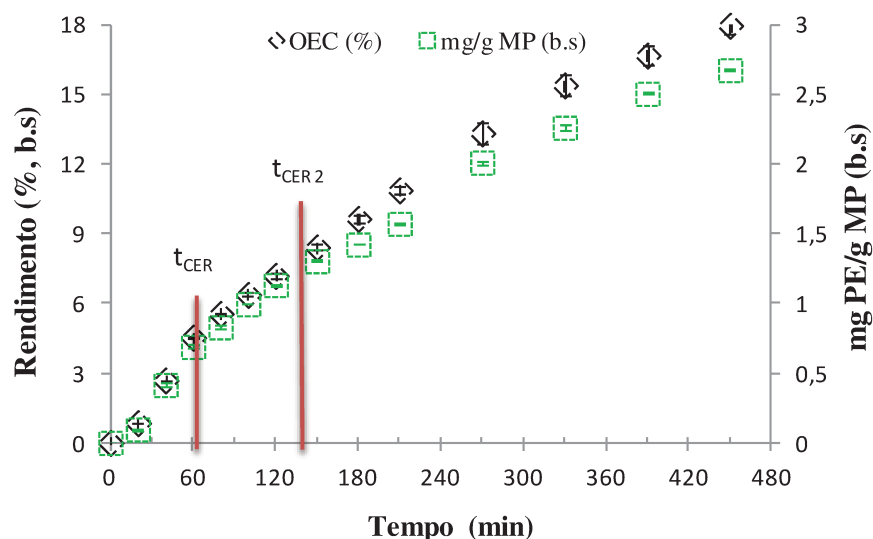


Figura 4.23. Taninos Totais (mg PE/g MP, b.s) e OEC (%) da casca de jatobá obtido a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração.

Na Figura 4.24 são apresentados os teores de taninos totais (%) e a massa de extrato obtida em relação à OEC a cada tempo durante o processo. Nota-se que até o t_{CER2} (135 min), o comportamento do teor de taninos totais em relação a massa de extrato recuperado a cada ponto varia da mesma forma, deste modo, nos tempos que se apresentaram maior quantidade de extrato recuperado, se obteve maiores quantidades de taninos. Considerando o tempo total de extração (450 min), o total de taninos recuperados antes e após o tempo t_{CER2} são equivalentes. Além disso, a partir de 270 min a quantidade de taninos recuperados torna-se decrescente. Desta forma, justifica-se o tempo de extração de taninos até a etapa t_{FER} , tempo necessário para manter a viabilidade econômica do processo.

SAAD et al. (2012) determinaram os teores de polifenóis e taninos obtidos em meio aquoso para diferentes cultivares de romã. Os polifenóis variaram de 77,5 a 174,5 mg EAG/g, b.s, e os teores de taninos de 1,5 a 7,7 mg CE/g, b.s, em equivalentes de catequina. Porém, ÇAM e HIŞIL (2010) utilizando a extração com água pressurizada na extração de romã, obtiveram maiores teores de taninos (9,5 mg CE/g b.s).

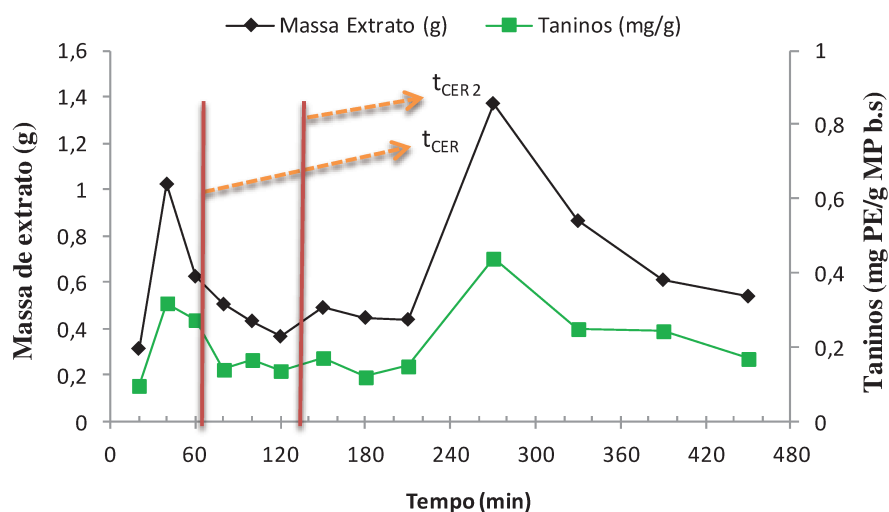


Figura 4.24. Taninos Totais (mg PE/g MP, b.s) e Massa de extrato (g) da casca de jatobá obtido a 323 K/15 MPa em função do tempo de extração.

4.2.4. ESTUDO DO AUMENTO DE ESCALA

A curva global de extração obtida na unidade piloto para o estudo do aumento de escala está apresentada na Figura 4.25. O valor médio da massa de extrato para os ensaios realizados nas unidades SFE Ii e piloto foram apresentados.

Inicialmente, a primeira extração na unidade piloto foi realizada na configuração original do equipamento, ou seja, entrada de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ no sentido ascendente, respeitando um período estático de 15 min. Porém, foi notado que mesmo aplicando a vazão máxima do equipamento, a mistura de solventes não superava o leito empacotado com a matriz vegetal. Diante deste comportamento, o sentido do fluxo de solvente do equipamento foi alterado para descendente.

Portanto, a curva de extração foi construída na condição selecionada na cinética de extração, 15 MPa e 323,15 K, com vazão de CO_2 de 200 g/min e H_2O de 20 g/min. O

aumento de escala correspondeu a um aumento de 30 vezes em relação à escala de laboratório. Os experimentos foram realizados em duplicata, e o rendimento médio das extrações na unidade piloto foi de 12,8 %. De acordo com os resultados, em apenas 140 min de extração, houve um aumento de 62 % no rendimento da extração em relação à OEC.

O critério de aumento de escala aplicado por PRADO (2010) foi eficiente, já que foi observado um incremento no rendimento em escala piloto em extrações envolvendo apenas o solvente CO₂ puro. Porém, com o uso de cossolvente, este comportamento foi modificado. Por este motivo, o critério de aumento de escala não pode ser usado para prever o comportamento do processo quando a água é usada como cossolvente da extração.

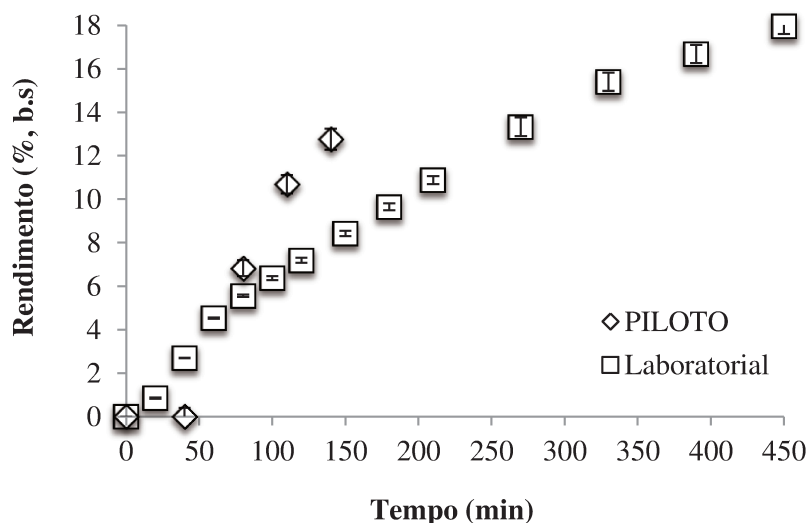


Figura 4.25. Curvas de aumento de escala obtidas no equipamento de laboratório e na unidade piloto.

A Figura 4.26 apresenta o rendimento para o separador S1, condição em que praticamente todo o extrato foi recuperado (aproximadamente 99 %). Na condição de S1 (10 MPa e 313 K) a solubilidade dos compostos presentes nos extratos da casca de jatobá foi menor na mistura de CO₂ + H₂O, provocando a separação dos compostos pesados, característicos de taninos. A sucessiva queda de pressão nos demais separadores pode não ter sido significativa para que ocorresse a precipitação de compostos pesados, apenas dos mais leves. Além disso, provavelmente, 40 min de extração não foram suficientes para que a matriz vegetal conseguisse absorver toda a água, ou seja, encharcar o leito.

Deste modo, as condições de separação podem ser otimizadas a fim de promover o fracionamento do extrato de acordo com características físico-químicas desejadas para as amostras. Segundo PRADO (2010), o estudo da etapa de separação é complexo, e esta etapa deve ser estudada e otimizada de maneira independente da etapa de extração, já que devido aos diferentes sistemas envolvidos, as etapas de extração e separação se comportam de maneira diferente. Embora, neste estudo, a complexidade é aumentada devido a mistura $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

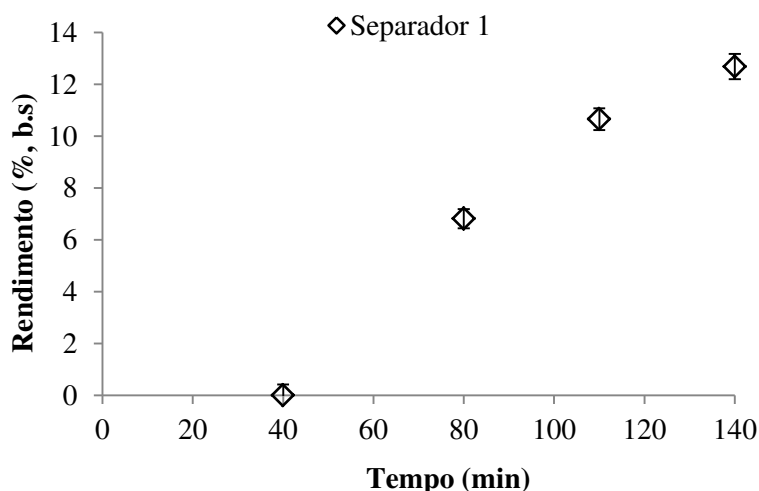


Figura 4.26. Rendimento do separador S1 obtido na unidade piloto.

Na Figura 4.27 pode-se observar a coloração dos extratos da casca de jatobá obtidos em 80 e 110 min de extração nos três separadores. Os extratos obtidos em 180 min apresentaram a mesma coloração dos extratos obtidos em 110 min. Durante a extração, todos os extratos coletados apresentaram coloração marrom, exceto para o extrato de S2 em 80 min de extração, com coloração amarela clara. A coloração marrom é característica dos taninos de alta massa molar, e a amarela é característica de óleo volátil. Em S3, houve somente água em pequena quantidade. Importante ressaltar que apesar das colorações fortes dos extratos, os obtidos em S1 apresentaram maior viscosidade, ou seja, com alto teor de sólidos em relação aos extratos obtidos em S2. Este comportamento justifica a maior recuperação de extratos após o processo de liofilização em S1, e conseqüentemente, maior rendimento da extração.

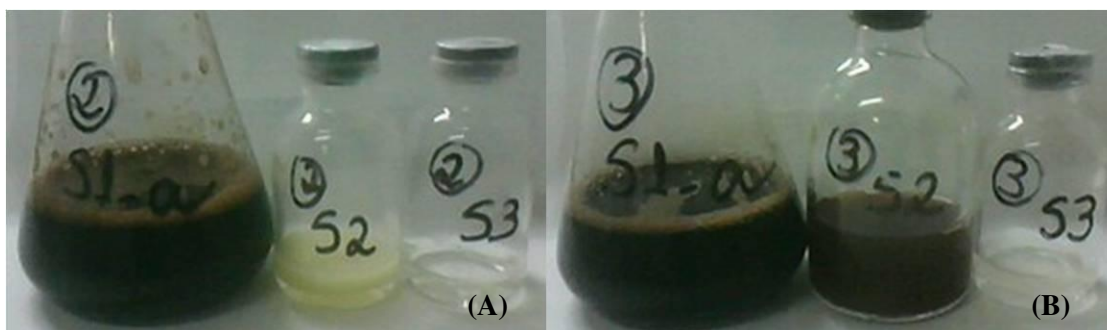


Figura 4.27. Extratos aquosos da casca de jatobá obtidos ao longo da cinética em unidade piloto em 80 min (A) e 110 min (B) de extração.

4.2.4.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Com o objetivo de avaliar a composição química dos extratos de jatobá obtidos durante a cinética de extração e no aumento de escala, foi realizada análise CCD dos mesmos. Na Figura 4.28 pode-se confirmar a presença de substâncias fenólicas da classe dos taninos devido à coloração azul escura. E na Figura 4.29 confirma-se a presença de compostos antioxidantes devido à intensidade das bandas amarelas sobre fundo violeta, conforme padrão de ácido gálico. Como discutido anteriormente, o emprego da água como cossolvente permitiu a extração de taninos com elevada atividade antioxidante, conforme os estudos de SOUZA et al. (2007) e LIONÇO et al. (2001).

Utilizando o revelador de flavonoides (Figura 4.30) sob luz UV-254, as manchas pretas destacadas, confirmam sua presença. Ainda, sua presença é esperada, por se tratar de compostos mais pesados. Na Figura 4.31 após revelação com anisaldeído para detecção de óleos essenciais, a presença da coloração vermelho-marrom clara na parte superior da banda P2.2 (extrato obtido em S2 em 80 min de extração) e azul clara confirma a presença de terpenos (sesquiterpenos e diterpenos) (NOGUEIRA et al., 2001; CASTRO et al., 2004).

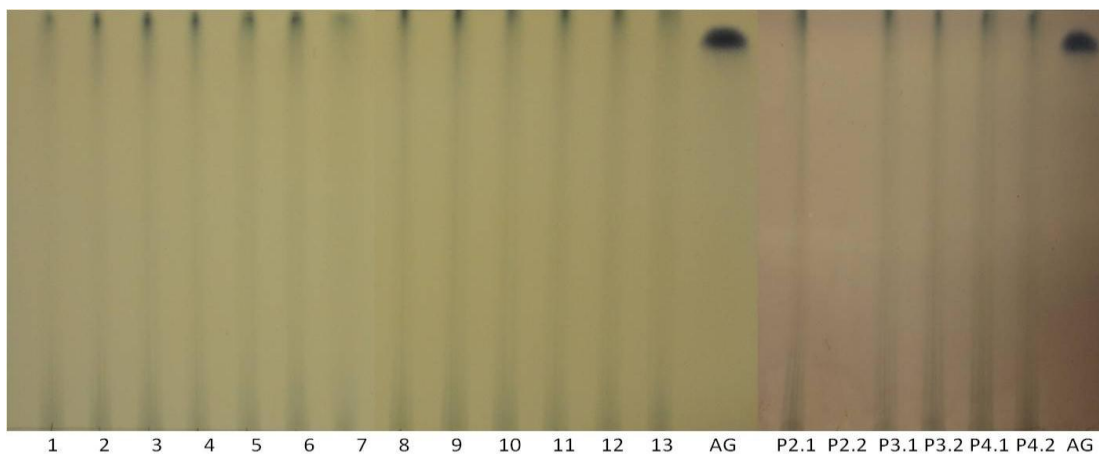


Figura 4.28. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração (1 a 13), na unidade piloto (P2.1 a P4.2) em 323 K e 15 MPa utilizando revelador taninos.

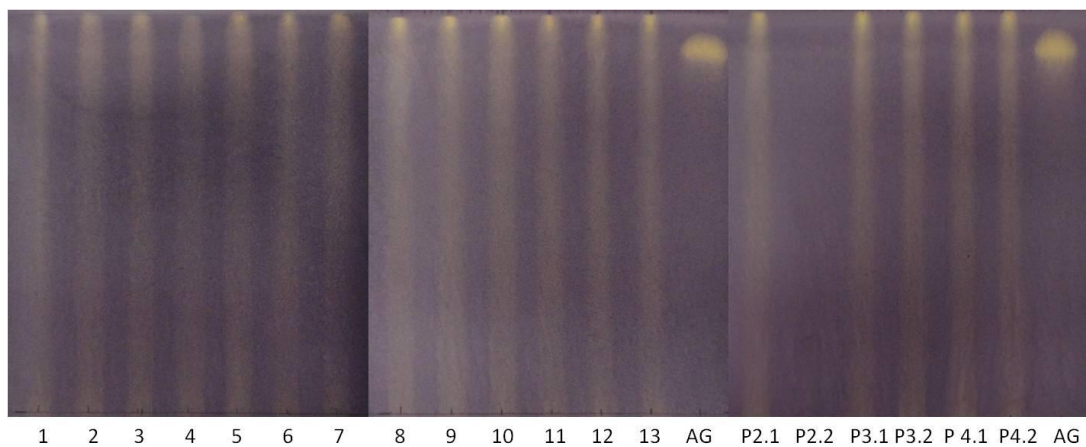


Figura 4.29. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração (1 a 13), na unidade piloto (P2.1 a P4.2) e padrão ácido gálico (AG) em 323 K e 15 MPa utilizando revelador DPPH.

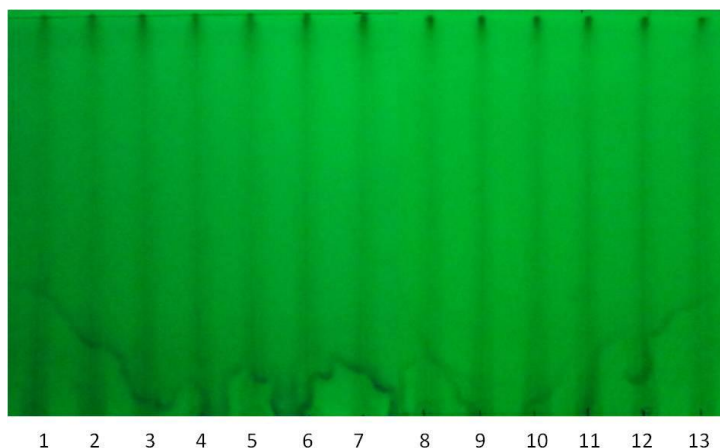


Figura 4.30. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração em 323 K e 15 MPa utilizando revelador de flavonoides em UV-254 nm.

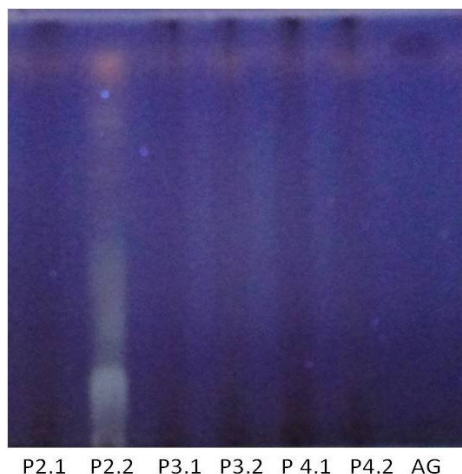


Figura 4.31. CCD dos extratos de jatobá obtidos na cinética de extração em 323 K e 15 MPa utilizando revelador de terpenóides em UV-365 nm.

4.2.4.2. TANINOS TOTAIS

O teor de taninos totais obtidos na unidade piloto nos separadores S1 e S2 em relação ao tempo de extração está apresentado na Figura 4.32.

Maior concentração de taninos foi alcançada em S1, na mesma condição onde houve praticamente todo o extrato recuperado, como discutido anteriormente. Em apenas 80 min de extração, conseguiu-se extrair 60 % do total de 99 % dos taninos presentes em S1. Ao abrir os separadores no final da extração, na etapa de limpeza (SI_L e S2_L), foi observada menor quantidade de extrato com menor viscosidade. Estes extratos

apresentaram baixíssimos teores de taninos totais. Os teores de taninos presentes nestes extratos foram os mesmos obtidos em S2, ou seja, 1 %. Com base nestes resultados, a extração em equipamento piloto utilizando o sistema CO₂ + H₂O foi mais eficiente na recuperação dos extratos e na obtenção de taninos a partir da casca do jatobá.

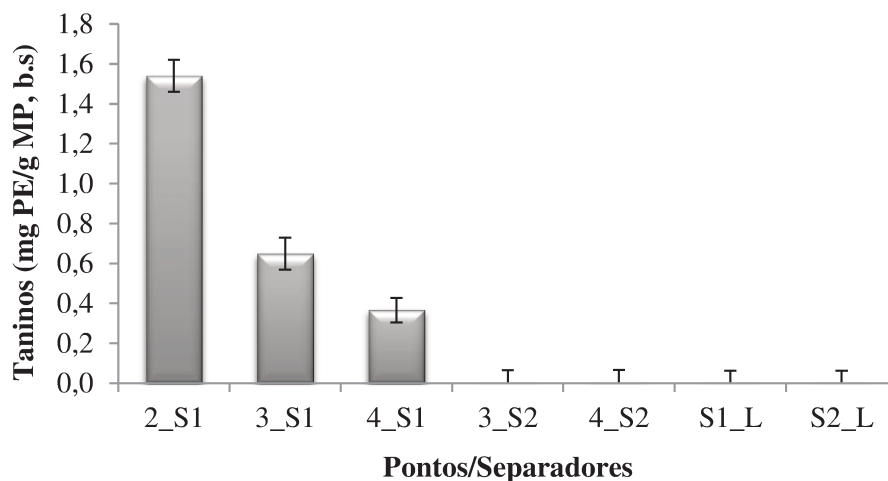


Figura 4.32. Concentração de taninos totais nos extratos de jatobá obtidos na unidade piloto com CO₂ + H₂O nos separadores S1 (2: 80 min, 3: 110 min, 4: 140 min, L: limpeza) e S2 (3: 110 min, 4: 140 min, L: limpeza).

4.2.3. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (UAE)

Uma observação comum da literatura é a maneira em que os fabricantes referem o quanto de energia é fornecido ao sistema. No entanto, devido à perda de energia de ultrassons durante seu trajeto, a potência real dissipada (P_{diss}) no meio não é a mesma que a potência referida e raramente é reportada.

Um dos métodos mais comuns para medir a P_{diss} , foi apresentado por LORIMER et al. (1991). O método baseia-se na calorimetria e assume que toda a potência fornecida ao sistema é dissipada na forma de calor, como mostrado na seguinte equação:

$$P_{diss} = \frac{dT}{dt} \sum m_i C_{pi} \quad (\text{Equação 3.17})$$

Onde m_i e C_{pi} são a massa e a capacidade calorífica do solvente, respectivamente, e dT/dt é a variação da temperatura durante 900 segundos de exposição ao ultrassom. Graficando P_{diss} contra ΔT verificou-se que a potência dissipada no sistema foi de 60 W (Figura 4.33).

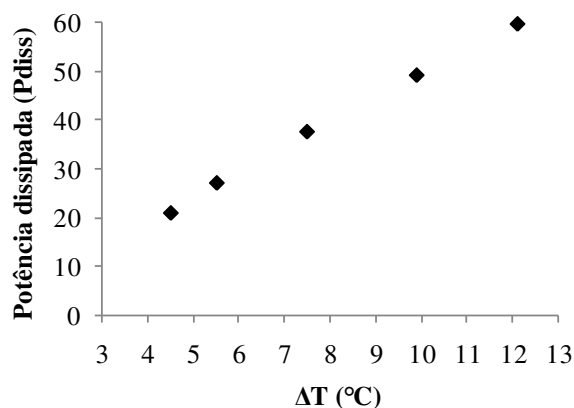


Figura 4.33. Potência dissipada do ultrassom em função da variação de temperatura.

4.2.3.1. MACERAÇÃO

Experimentos preliminares foram realizados a fim de avaliar a influência de alguns fatores durante a extração das cascas de jatobá. Para determinar a melhor relação de matéria-prima/solvente (S/F) e o solvente mais eficiente da extração, foi considerado o total de polifenóis (TP). A Figura 4.34 mostra o rendimento (% b.s) e o total de polifenóis (mg EAG/g MP, b.s) dos extratos. Maiores rendimentos foram obtidos na maior proporção de S/F. Desta forma, maior volume de solvente permitiu a transferência do extrato da matriz vegetal aumentando a eficiência da extração. Comparando os efeitos do solvente no rendimento da extração, o tampão (pH 3.0) (T_20) foi o mais eficiente, seguido da água (w_20), etanol + água (1:1, v/v) (Ew_20) e etanol (E_10).

No entanto, quando se considera o teor de fenóis, a água parece ser o solvente mais eficiente em extrair esses compostos. Assim, a água não somente aumenta a eficiência da extração de compostos fenólicos, mas também é o solvente mais adequado por ser ecologicamente seguro e ter baixo custo. Os polifenóis totais diminuíram em menores S/F, semelhante ao rendimento. Portanto, levando em consideração o maior teor de polifenóis extraídos, o melhor solvente da extração foi à água em uma razão S/F igual a 20.

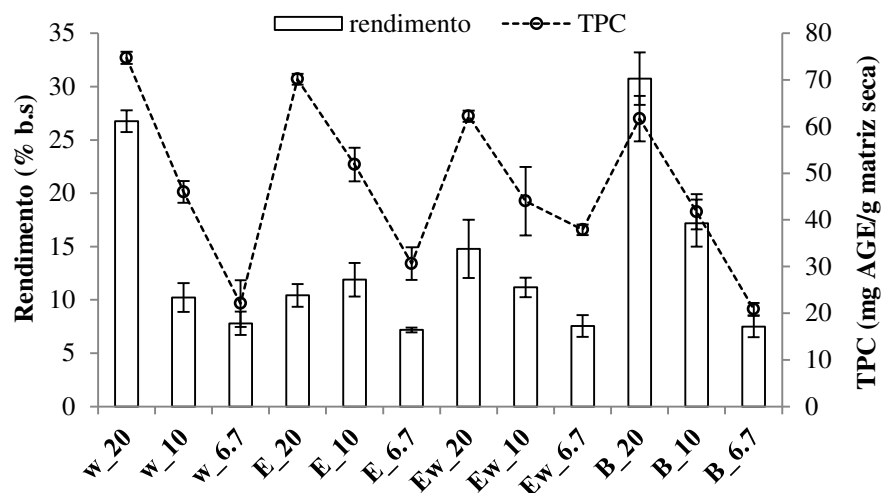


Figura 4.34. Rendimento da extração (% b.s) e compostos fenólicos totais (mg AGE/g matriz seca) dos extratos de jatobá obtidos por maceração utilizando: w (H_2O), E (etanol), Ew (etanol+ H_2O) e T (tampão, pH 3.0) em S/F iguais a 20, 10 e 6,7.

4.2.3.2. COMPARAÇÃO ENTRE UAE E AGE

De acordo com os resultados, a quantidade de compostos fenólicos totais (TPC) extraídos em 60 W foi aproximadamente 20 % maior quando utilizado 20 W no mesmo tempo e temperatura de extração. Deste modo, de acordo com as condições estudadas para UAE, a temperatura de 323 K, potência de 60 W e tempo de extração de 40 min foram selecionados. As mesmas condições foram aplicadas nas extrações por AGE (Figura 4.35).

Nos primeiros 15 minutos de extração foi obtido elevado teor de TPC devido ao efeito do gradiente de concentração de polifenóis entre o solvente e a matriz vegetal. Adicionalmente, o maior teor de TPC na superfície das partículas facilitou a liberação destes compostos, diminuindo em seguida devido ao menor gradiente de concentração; sendo os polifenóis remanescentes localizados no interior das partículas. Adicionalmente, a intensidade de cavitação do ultrassom foi maior devido ao emprego da água como solvente. A água desempenhou um papel importante na extração de polifenóis, especificamente os taninos, permitindo a alargamento da matriz vegetal e aumentando a eficiência de extração. Além disso, o ultrassom facilitou o processo de hidratação da matriz seca (VINATORU, 2001).

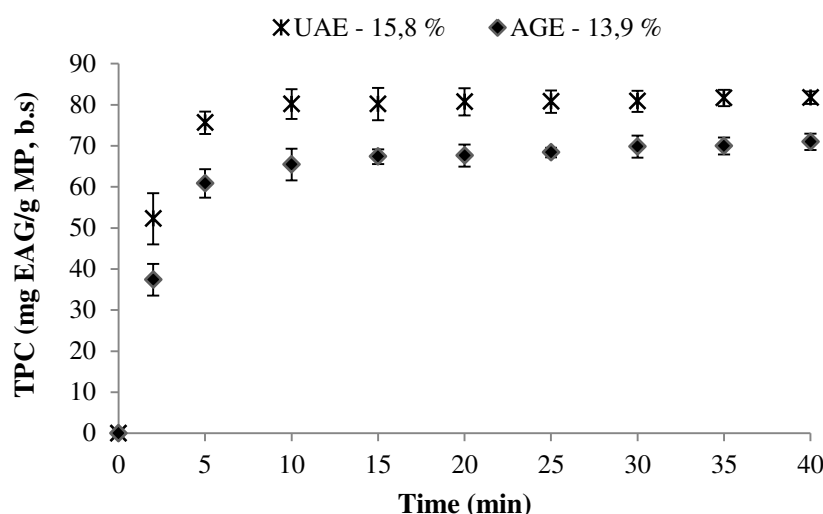


Figura 4.35. Estudo cinético da UAE e AGE. Teor de polifenóis totais (mg EAG/g b.s) dos extratos de jatobá.

O total de polifenóis no extrato obtido por UAE foi 15,12 % maior que o obtido por AGE (81,42 e 71 mg EAG/g MP, b.s), devido à cavitação do ultrassom ocasionando efeitos mecânicos nas paredes das células. Adicionalmente, o UAE produziu maiores rendimentos de extração em períodos mais curtos de tempo, reduzindo a energia consumida. A comparação mostra uma clara melhoria da extração, o que é atribuído à cavitação ultrassônica, uma vez que esta é a única variável que difere de tratamento em ambos os processos. O rendimento da extração foi de $15,8 \pm 0,7$ % e $13,9 \pm 0,5$ % para a UAE e AGE, respectivamente, indicando uma melhora significativa no desempenho da extração devido à aplicação de ultrassom. Outros estudos apontaram a eficiência do ultrassom frente às extrações convencionais (JERMAN et al., 2010; VIROT et al., 2010; VALACHOVIC et al., 2001; CARRERA et al., 2012; D’ALESSANDRO et al., 2012; PINGRET et al., 2012).

A UAE tem sido empregada na extração de taninos, uma classe de polifenóis largamente presente nos extratos de jatobá. ALEXE et al. (1964) relatou um aumento na extração de taninos de um material usado em tingimento utilizando o ultrassom a uma frequência de 8.000 kHz, durante 15 min em comparação com agitação a 1400 rpm, durante 8 h. SIVAKUMAR et al. (2007) também utilizou o ultrassom para a extração de taninos da

fruta de mirobálano (*Terminalia chebula*) e observaram uma melhora no rendimento de (3 a 5 vezes mais elevada), com níveis de potência de 20 a 100 W. RAO et al. (1984) estudaram a influência da frequência de ultrassom, tempo e intensidade na extração de taninos de torta desengordurada da semente de sal (*Shorea robusta*) empregando diferentes solventes. Segundo estes autores, o rendimento da extração foi superior em baixas frequências (43 kHz, 30 min).

A extração por ultrassom acelera o processo de hidratação e inchamento da matriz, acarretando uma dilatação dos poros das paredes celulares vegetais, resultando em uma maior transferência de massa do soluto a partir de constituintes do material da planta para o solvente, melhorando assim o rendimento da extração e a recuperação de compostos fenólicos. O rompimento das células da planta após o colapso da bolha de cavitação por microjet pode ter aumentado a velocidade de entrada do solvente no tecido da planta (TOMA et al., 2001). Além disso, o elevado rendimento da extração assistida por ultrassom pode ser atribuída à sonicação, conduzindo à ruptura das paredes das células e a coleta de seu conteúdo (VINATORU, 2001).

Para confirmar a eficiência do UAE, uma comparação com outro equipamento de ultrassom foi realizada. Os experimentos foram feitos utilizando uma sonda de ultrassom (UP) seguindo a mesma cinética como na UAE. De acordo com os resultados, 40 min foi suficiente para obter um rendimento de $14,2 \pm 0,5$ %, com 79,49 mg EAG/g MP (b.s), valores inferiores aos obtidos por UAE. Este equipamento funciona a uma frequência mais baixa do que os reatores PEX1(1 L) e PEX3 (3 L) utilizados na UAE, o que poderia explicar a diferença nos rendimentos obtidos.

4.2.3.3. EXTRAÇÃO EM CORRENTE CRUZADA EM TRÊS ESTÁGIOS

Foi avaliado o efeito da extração em série em três estágios no rendimento da extração das cascas de jatobá para o processo de UAE e AGE. Os parâmetros anteriormente otimizados foram mantidos constantes, e as extrações em corrente cruzada foram realizadas utilizando o mesmo material, extraindo novamente o sólido após filtração e adicionando solvente fresco nas mesmas condições de extração a cada etapa. O teor de polifenóis e o rendimento foram avaliados após cada etapa para os extratos de UAE e AGE (Figura 4.36).

Comparando os processos, a diferença no teor de polifenóis entre os dois extratos no primeiro e segundo estágio foi 15 % e 10 %, respectivamente, e similares no terceiro estágio. O rendimento variou da mesma forma, apresentando uma diferença de 12 % entre os extratos dos dois processos obtidos na primeira etapa, provando a reprodutividade das extrações. O rendimento dos dois processos foi similar no segundo e terceiro estágio. No primeiro estágio, as vibrações do ultrassom podem ter aumentado o número de células rompidas, acelerando a remoção do soluto dessas células pelo solvente (BALACHANDRAN et al., 2006).

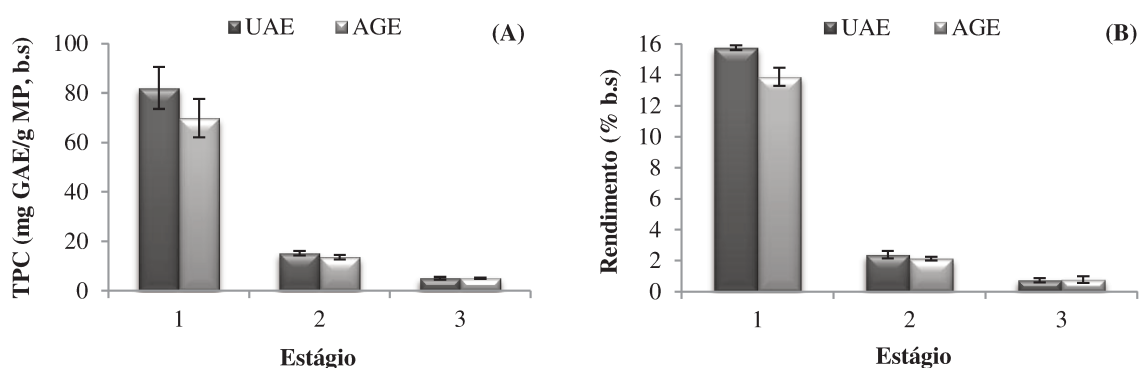


Figura 4.36. Extração em corrente cruzada em três estágios do jatobá por UAE e AGE: (A) teor de polifenóis totais (mg EAG/g MP, b.s) e (B) rendimento (% b.s).

ADAM et al. (2012) estudaram a morfologia dos extratos das células de *N. oculata* extraídas ou não com ultrassom. As células se mostraram similares, sendo nítido o rompimento da parede celular após o tratamento com ultrassom. Em contrapartida, as células não extraídas permaneceram intactas.

JERMAN et al. (2010) estudaram o efeito da extração em série no rendimento da extração de fenóis da azeitona. Segundo estes autores, três estágios foram suficientes na recuperação dos principais fenóis da azeitona, já que somente a rutina (2 % do total) foi detectada no quarto estágio. ASPÉ e FERNÁNDEZ (2011) utilizaram três estágios na extração de taninos de *Pinus radiata*. De acordo com os resultados, foi pequeno o incremento no rendimento no segundo e no terceiro estágios da extração.

4.2.3.4. AUMENTO DE ESCALA

As condições otimizadas anteriormente foram empregadas no experimento de aumento de escala para a UAE em extrator de 3 L.

A Figura 4.37 mostra o teor de polifenóis e o rendimento obtido no experimento de aumento de escala. O aumento de três vezes no volume (1 L para 3 L) para uma planta semi-piloto produziu o rendimento ($15,8 \pm 0,7$ e $15,5 \pm 0,5$ % em escala laboratorial e semi-piloto, respectivamente) e teor de polifenóis foram similares para os extratos ($81,42$ e $81,37$ mg EAG/g MP, b.s). Além disso, os polifenóis totais dos extratos do extrator piloto foi 15 % maior do que aquele obtido no processo de extração por agitação (AGE).

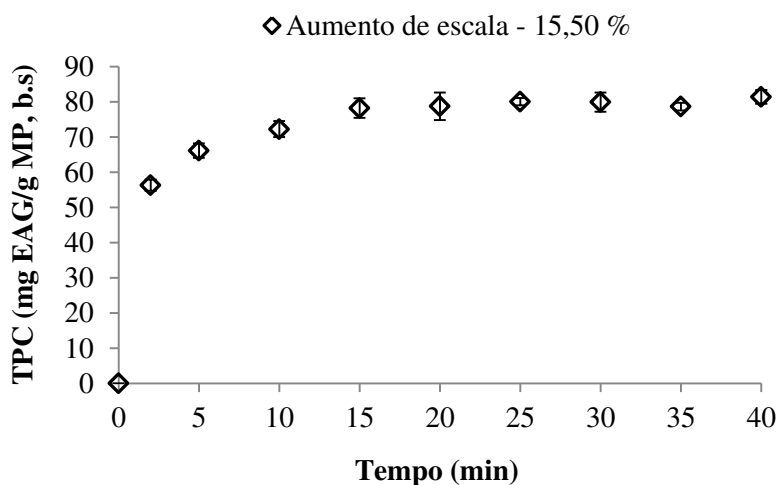


Figura 4.37. Cinética de extração para o extrator de 3L. Polifenóis totais (mg EAG/g MP, b.s) dos extratos de jatobá em função do tempo de extração.

Estudando o aumento de escala (30 L) para o resíduo da maçã, PINGRET et al. (2012) obtiveram um total de polifenóis utilizando a extração por ultrassom comparável aos resultados obtidos em escala laboratorial e 15 % maior do que o obtido na extração convencional por maceração. O mesmo comportamento foi observado por ACHAT et al. (2012) utilizando o mesmo aumento de escala (30 L) e o mesmo extrator. Os autores acharam teores de polifenóis similares para os extratos obtidos em escala piloto e laboratorial.

A extração por ultrassom tem demonstrado ser uma tecnologia de processamento de alimentos que possui aplicações em larga escala com retorno em potencial de investimento de capital sendo promissora em extrações em escalas industriais. Portanto, o aumento de escala usado neste estudo pode ser empregado para estimar dados a partir de experimentos em escala laboratorial. Ainda, a extração assistida por ultrassom pode ser utilizada para tratar grandes quantidades de matéria-prima, utilizando equipamentos já existentes em escala industrial de ultrassom nas indústrias químicas e alimentícias.

4.2.3.5. ESTUDO CINÉTICO

Os dados equivalentes da função $\ln(C_{\infty}/[C_{\infty} - Ct])$ contra o tempo de extração para as etapas rápida e lenta dos processos de extração por ultrassom e agitação são mostrados na Figura 4.38.

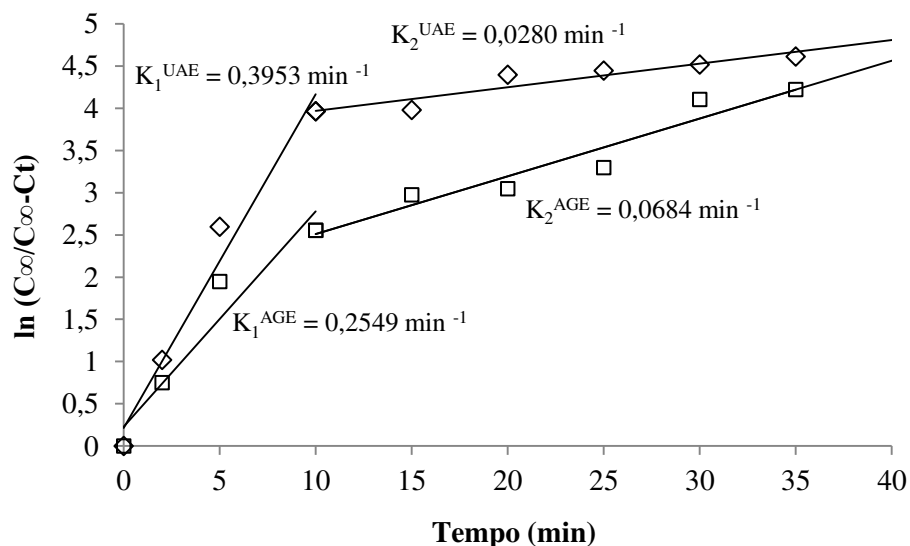


Figura 4.38. Cinética e constantes de extração obtidas com agitação (K^{AGE}) e ultrassom (K^{UAE}).

A concentração dos compostos extraíveis aumentou com o tempo para ambos os processos devido à interação da água com soluto ao longo do tempo. A extração dos compostos fenólicos com o ultrassom foi mais rápida ($k_1^{UAE} = 0,3953 \text{ min}^{-1}$) comparada à agitação ($k_1^{AGE} = 0,2549 \text{ min}^{-1}$) na etapa de extração rápida (de 0 a 10 min) devido à

cavitação do ultrassom. No entanto, na etapa lenta (de 10 a 40 min), como observado pela inclinação, a extração com agitação foi mais rápida ($k_2^{AGE} = 0,0684 \text{ min}^{-1}$) comprada com o ultrassom ($k_2^{UAE} = 0,0280 \text{ min}^{-1}$).

Durante as etapas de extração rápida da UAE e AGE, os valores do coeficiente de difusão foram de uma ordem de magnitude mais elevada em comparação com os determinados na etapa lenta da extração. Os coeficientes de difusão correspondentes as etapas de taxa de extração constante e decrescente, D_1 e D_2 , respectivamente, foram determinados para UAE e AGE. Para a extração com ultrassom, os valores de D_1^{UAE} e D_2^{UAE} foram $2,63 \times 10^{-9}$ e $1,86 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, respectivamente; para extração com agitação, os valores de D_1^{AGE} e D_2^{AGE} foram $1,69 \times 10^{-9}$ e $4,54 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, respectivamente. O maior coeficiente de difusão foi registrado na etapa rápida da extração assistida por ultrassom. Em contrapartida, a agitação aumentou a transferência de massa do soluto, particularmente durante a etapa lenta da extração.

SLOBODAN et al. (2012) compararam os coeficientes de difusão para a extração com fluido supercrítico (SFE), extração com ultrassom (UAE) e soxhlet para o timol. O maior coeficiente de difusão foi relatado na fase inicial do processo SFE, enquanto o ultrassom particularmente afetou a transferência de massa durante a etapa lenta da extração.

4.2.3.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os potenciais antioxidantes dos extratos de UAE e AGE são mostrados na Figura 4.39. Os testes de DPPH forneceram informações sobre as atividades dos compostos com radicais livres estáveis, o efeito DPPH é assumido como sendo sua habilidade em doar hidrogênio. Os valores mais elevados IC_{50} significam menor atividade antioxidante e vice-versa.

As atividades antioxidantes dos extratos obtidos com UAE em potência máxima (condição otimizada) e mínima foram avaliadas. De acordo com os resultados, os extratos obtidos com UAE máx (60 W) apresentaram maiores AA em comparação com os de AGE e UAE mín (20 W), e ligeiramente menor do que os extratos de UP. Além disso, a AA do extrato obtidos com UAE mín (20 W) foi ligeiramente melhor do que os extratos

obtidos por AGE. Comparando somente os extratos obtidos por UAE, o extrato referente ao aumento de escala (E/US) apresentou maior AA. Logo, os resultados provam que a UAE é um método eficiente para obter extratos ricos em AA e compostos fenólicos.

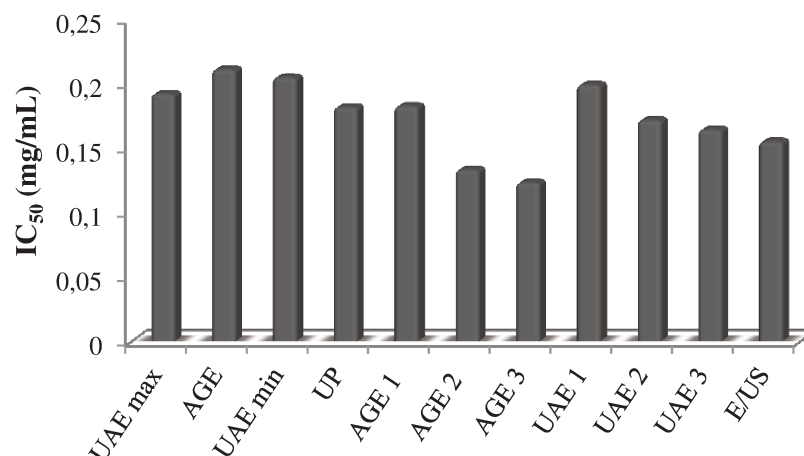


Figura 4.39. Valores de IC₅₀ determinados por DPPH dos extratos de jatobá obtidos por: UAE máx (potência máxima, 60 W) e UAE mín (potência mínima, 20 W); AGE (extração por agitação); UP (ultrassom com sonda); UAE1, UAE2, UAE3 e AGE1, AGE2, AGE3 (extração em três estágios) e E/US (aumento de escala).

Comparando os dados de TPC e AA para os extratos obtidos através da extração em corrente cruzada em três estágios para UAE e AGE, pode-se observar que a AA foi inversamente proporcional ao TPC (Figura 4.36). Este resultado está de acordo com os estudos realizados por TAN et al. (2011) e CONFORTI et al. (2009), em elevados teores de compostos fenólicos não necessariamente apresentam elevada capacidade antioxidante. De acordo com CHEW et al. (2011), a capacidade antioxidante depende não só da quantidade de antioxidantes presentes no extrato, mas também da estrutura e das interações entre os antioxidantes. A estrutura dos compostos fenólicos é um determinante na atividade antioxidante (TAN et al., 2011). Maiores teores de AA foram obtidos na segunda e terceira etapa da extração em três estágios para UAE e AGE. Isto sugere que outras classes de compostos podem ter sido extraídas.

4.2.3.7. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Através da CCD foram identificados compostos antioxidantes e taninos nos extratos. De acordo com a Figura 4.40 (B), as placas pulverizadas com 1 % de cloreto férrico em metanol confirmaram a presença de substâncias fenólicas derivadas da classe dos taninos através do aparecimento da cor azul escura típica de ácido gálico (AG), o padrão de taninos. Quando as placas foram pulverizadas com DPPH (Figura 4.40 (A)), manchas amarelas apareceram no fundo violeta da mesma forma que o ácido gálico e rutina, padrões reagidos. Esta atividade antioxidante é provavelmente devido a presença de compostos fenólicos, nos quais os taninos estão presentes em todos os extratos, já que as bandas correspondem aos extratos polares são as mesmas bandas relacionadas com derivados de taninos. Este mesmo comportamento foi confirmado por LIONÇO et al. (2001) e SOUZA et al. (2007).

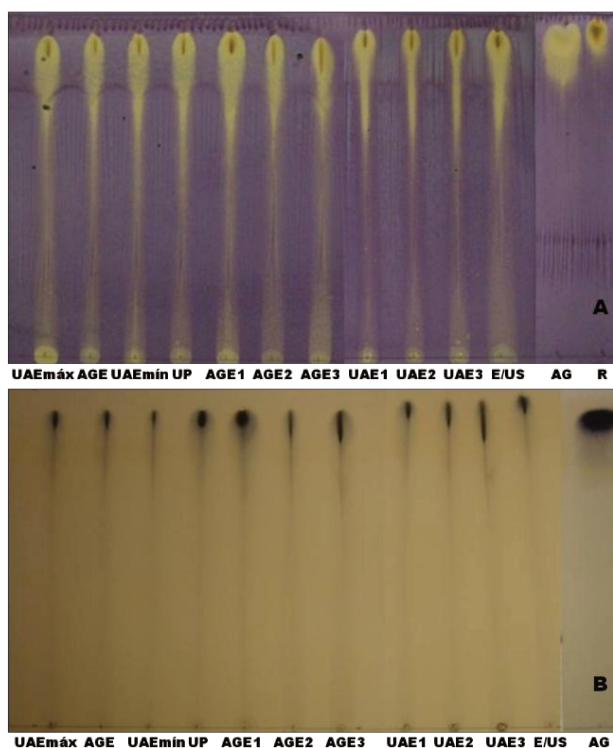


Figura 4.40. (A) DPPH e (B) taninos presentes no extrato do jatobá obtidos por: UAE máx (potência máxima) e UAE mín (potência mínima); AGE (extração por agitação); UP (ultrassom com sonda); UAE1, UAE2, UAE3 e AGE1, AGE2, AGE3 (extração em três estágios) e E/US (aumento de escala) com padrão AG (ácido gálico) e R (rutina).

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SFE

4.3.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY (IES – MS/MS)

A Figura 4.41 mostra o perfil de procianidinas representativo dos extratos obtidos da casca do jatobá. Neste estudo, as frações foram injetadas em IES-MS e examinadas os espectros de massa tanto em modo positivo como negativo. Compostos de elevada massa molecular foram encontrados, típicos de procianidinas.

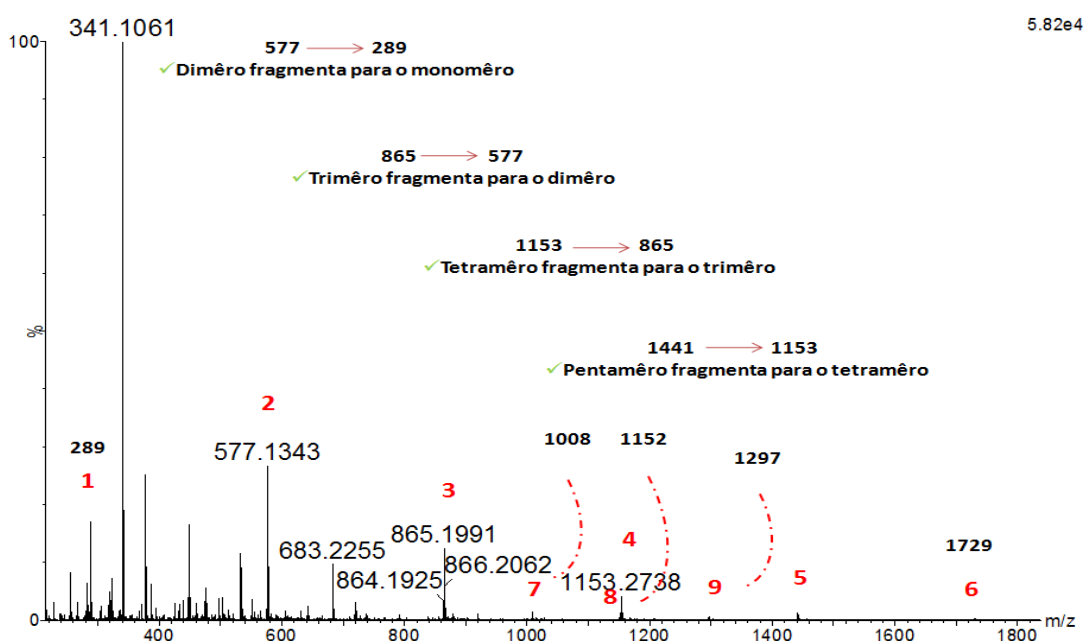


Figura 4.41. Espectro de massas IES-MS (-) dos extratos em 20 min da cinética de extração, ilustrando a identificação de uma série de procianidinas baseadas na unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina.

O mesmo perfil foi observado em todos os espectros dos extratos obtidos nos experimentos de rendimento global e cinética da extração. Na unidade piloto, apenas o extrato obtido no segundo separador (S2) em 80 min apresentou perfil de compostos característicos de óleos essenciais. O perfil do extrato obtido na limpeza do segundo extrator foi possível verificar a presença de procianidinas e glicosídeos, porém, com intensidade relativa menor comparada ao extrato recuperado neste separador.

O espectro de massas apresentado na Figura 4.41 ilustra a presença de um íon de m/z 289, o qual representa uma unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina, ambos apresentam mesma m/z (SASAKI et al., 2009). Ainda, pode ser observada nos espectros das amostras a presença de íons de m/z referentes a oligômeros que vão desde dímeros até nonâmeros. As procianidinas apresentam uma série de íons [M-H]⁻ que se distanciam em 288 unidades de m/z , assim os íons 289, 577, 865, 1153, 1441 e 1729 representam o monômero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero, respectivamente. Ainda, podem ser observados íons duplamente carregados que apresentam $\Delta m/z$ de 144, tais como: 1008, 1152 e 1296, que representam o heptâmero, octâmero e nonâmero, respectivamente. Desta forma, os espectros deste estudo apresentam o mesmo perfil encontrado por SASAKI et al. (2009).

A confirmação das estruturas das procianidinas foi realizada por meio de análises de MS/MS (varredura de íons produtos), onde a fragmentação de cada oligômero foi estudada para caracterizá-los. As fragmentações mais características para cada composto identificado estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Fragmentações observadas nas análises de MS/MS para a unidade monomérica (flavonóide) e para os oligômeros de procianidinas.

| Composto | Íon observado | Fórmula Molecular | m/z | Íons produtos |
|-----------|----------------------|---|-------|---------------------------------|
| Monômero | [M-H] ⁻ | C ₁₅ H ₁₃ O ₆ | 289 | 245, 161, 137, 125 |
| Dímero | [M-H] ⁻ | C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ | 577 | 289, 125 |
| Trímero | [M-H] ⁻ | C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ | 865 | 289, 577 |
| Tetrâmero | [M-H] ⁻ | C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄ | 1153 | 289, 577, 865 |
| Pentâmero | [M-H] ⁻ | C ₇₅ H ₆₁ O ₃₀ | 1441 | 289, 577, 865, 1153 |
| Hexâmero | [M-H] ⁻ | C ₉₀ H ₇₃ O ₃₆ | 1729 | 289, 577, 865, 1441 |
| Heptâmero | [M-2H] ²⁻ | C ₁₀₅ H ₈₅ O ₄₂ | 1008 | 289, 577, 865, 1153, 1441 |
| Octâmero | [M-2H] ²⁻ | C ₁₂₀ H ₉₇ O ₄₈ | 1152 | 289, 577, 865, 1153, 1441, 1729 |
| Nonâmero | [M-2H] ²⁻ | C ₁₃₅ H ₁₀₉ O ₅₄ | 1286 | 289, 577, 865, 1153, 1441, 1729 |

Conforme exposto na Tabela 4.3, cada oligômero fragmenta-se perdendo uma unidade monomérica e, portanto, forma o íon [M-288]⁻. Conforme se aumenta a energia de

colisão, observa-se que cada oligômero fragmenta-se aos seus similares de menores unidades monoméricas e, em último estágio, a própria unidade de flavonóide. No caso dos oligômeros que formam íons $[M-2H]^{2-}$, observa-se no espectro de MS/MS também íons de m/z maiores que o íon precursor. Isto ocorre devido ao íon precursor duplamente carregado fragmentar-se a um íon produto monocarregado e, portanto, de m/z maior. Além da fragmentação das procianidinas, a massa molecular exata dos compostos, obtida por IES-FT-ICR MS, corroborou com a identificação correta das estruturas.

4.3.2. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (UPLC-MS/MS)

A Figura 4.42 mostra o perfil de procianidinas representativo dos extratos obtidos da casca do jatobá.

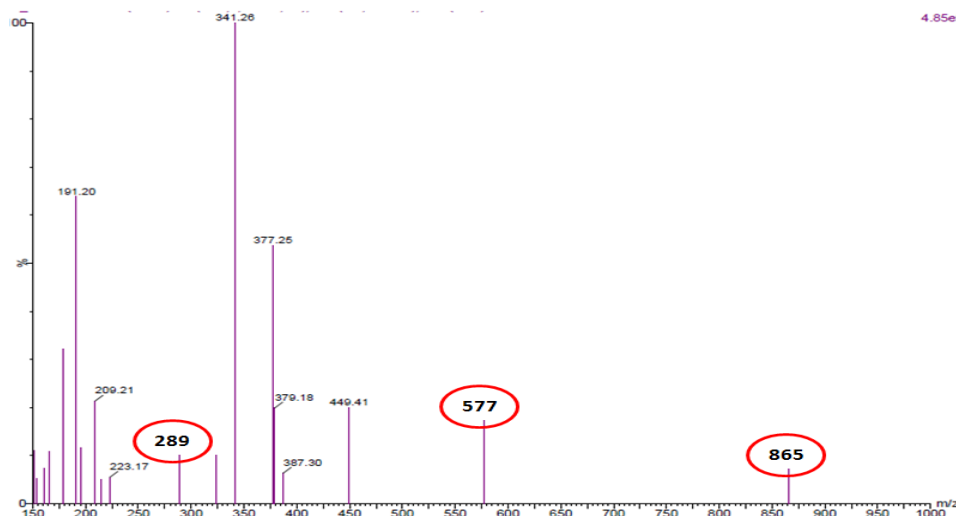


Figura 4.42. Espectro de massas da infusão direta MS (-) dos extratos da casca de jatobá, ilustrando a identificação de uma série de procianidinas baseadas na unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina.

O espectro de massas apresentado na Figura 4.42 ilustra a presença dos mesmos compostos obtidos nas análises anteriores (seção 4.3.1). Foi identificado o íon de m/z 289, o qual representa uma unidade monomérica do flavonóide catequina ou epicatequina, com a mesma m/z (SASAKI et al., 2009). As procianidinas também apresentaram uma série de

íons $[M-H]^-$ com m/z de 289, 577, 865 que representam o monômero, dímero, trímero, respectivamente.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR UAE

4.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ASSOCIADA A UM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE/DAD)

A tioacidólise, clivagem catalisada por ácido das ligações interflavanil de procianidinas na presença de um reagente nucleófilo tal como o tolueno- α -tiol seguido por CLAE em fase reversa, foi empregado para calcular o grau de polimerização médio das procianidinas e para caracterizar e quantificar os compostos fenólicos dos extratos (GUYOT et al., 2001).

A composição e a concentração dos principais compostos fenólicos encontrados na casca e nos extratos de jatobá estão apresentadas na Tabela 4.4. O perfil de compostos fenólicos da casca de jatobá foi extremamente simples: dois grupos fenólicos majoritários com o total de dois compostos identificados e quantificados. No cromatograma final da casca do jatobá, quatro compostos desconhecidos foram observados. Estes compostos foram designados como sendo do grupo dos flavonoides devido a seu espectro ultravioleta, com o máximo de absorbância em 280 nm, e foram quantificados como (-)-epicatequinas equivalentes. O cromatograma representativo da casca do jatobá está mostrado na Figura 4.44.

A soma dos compostos fenólicos identificados na casca do jatobá, determinados por CLAE, foi 118,5 mg/kg (b.s); os polifenóis foram essencialmente compostos de flavan-3-ols. Entre os dois compostos identificados, a classe das procianidinas foi a predominante, que representaram 96,6 % dos compostos fenólicos identificados (Tabela 4.4). As procianidinas da casca do jatobá constituíram de (+)-catequina a partir da unidade terminal e (-)-epicatequina a partir das unidades terminais e de extensão (Tabela 4.5). Este resultado está em contradição com os de SASAKI et al. (2009). Os autores acharam que as procianidinas consistiam apenas de (-)-epicatequina. A diferença observada entre os resultados de SASAKI et al. (2009) e este estudo pode ser devido à variabilidade da

espécie, i.e., genética, ano, e meio ambiente. Além disso, a (+)-catequina quantificada na casca do jatobá pode ser resultado da epimerização da (-)-epicatequina após a abertura do heterociclo C sob as condições de tioacidólise (GUYOT et al., 2001; KIATGRAJAI et al., 1982; MCGRAW et al., 1982). O grau de polimerização (\overline{DP}_n) das procianidinas da casca do jatobá foi 11,4, tal como estimado pelo método de tiólise sendo maior que os de SASAKI et al. (2009). Além das procianidinas, o segundo composto identificado foi o monômero de flavan-3-ol, i.e., (-)-epicatequina (Tabela 4.5).

Tabela 4.4. Composição de polifenóis, teor (mg/kg, b.s) e \overline{DP}_n dos diferentes extratos.

| Extrato | EC | PCA | \overline{DP}_n | unk1 | unk2 | unk3 | unk4 |
|--------------------|------|-------|-------------------|------|------|------|------|
| Jatobá | 4,0 | 114,5 | 11,4 | 1,4 | 5,5 | 0,3 | 1,6 |
| AGE | 11,2 | 354,4 | 8,6 | 6,5 | 29,0 | 2,0 | 9,0 |
| UAE | 16,4 | 411,7 | 9,7 | 7,3 | 25,1 | 3,0 | 7,5 |
| Aumento de escala | 12,6 | 355,4 | 6,8 | 6,4 | 20,8 | 2,0 | 6,7 |
| Sonda de ultrassom | 1,16 | 22,37 | 0,12 | 0,45 | 0,42 | 0,22 | 0,13 |

EC: (-)-epicatequina, PCA: procianidinas, \overline{DP}_n : grau médio de polimerização dos flavonóis (catequinas + procianidinas), unk: composto desconhecido, SD: desvio padrão, n = 8, a: quantificados como (-)-epicatequina.

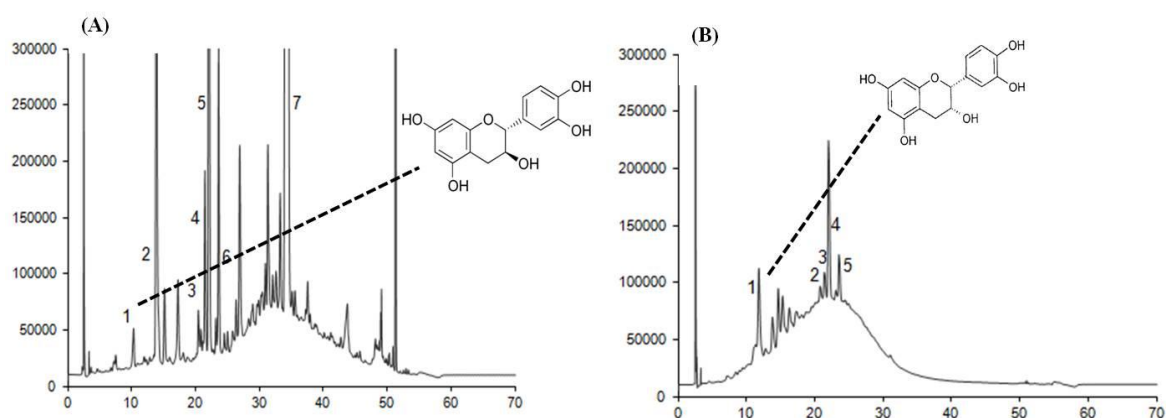


Figura 4.43. Perfil de CLAE dos extratos aquosos da casca do jatobá obtidos com ultrassom a 280 nm. A: (1) (+)-catequina; (2) (-)-epicatequina; (3) unk1; (4) unk2; (5) unk3; (6) unk4; (7) (-)-epicatequina benzil-tioéter; B: (1) (-)-epicatequina; (2) unk1; (3) unk2; (4) unk3; (5) unk4.

Tabela 4.5. Características estruturais das procianidinas.

| Extrato | CAT % | EC % |
|--------------------|--------------|-------------|
| Jatobá | 1,2 | 98,8 |
| AGE | 1,7 | 98,3 |
| UAE | 1,8 | 98,2 |
| Aumento de escala | 2,2 | 97,8 |
| Sonda de ultrassom | 0,08 | 0,08 |

CAT: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; SD: desvio padrão, n= 8.

A casca do jatobá foi então submetida aos métodos de extração por agitação, ultrassom e ao aumento de escala utilizando água como solvente da extração. Através da ANOVA observou-se que o método de extração (agitação, ultrassom e aumento de escala) não influenciou significativamente no rendimento da extração (mg/kg, b.s) ($F = 0,919$ e $P = 0,449$). Os três extratos foram essencialmente compostos também por flavan-3-ol. Em comparação com a casca do jatobá, a procianidina (\overline{DPn}) foi significativamente reduzida nos três extratos. Durante a extração, os polifenóis foram envolvidos em interações físico-químicas específicas com a parte sólida da casca, especialmente a parede celular (LE BOURVELLEC e RENARD, 2012). A parede celular seletivamente absorveu as procianidinas com um alto grau de polimerização, o que resultou em uma diminuição do \overline{DPn} do extrato (LE BOURVELLEC e RENARD, 2012).

A ANOVA foi realizada também para avaliar a influência do método de extração sobre a composição de fenóis, onde não foram observados efeitos significativos (Tabela 4.6). O método utilizado na extração da casca do jatobá quer por agitação, ultrassom ou aumento de escala, não influenciou a composição de polifenóis nos extratos.

Tabela 4.6. Valores F de Fisher e *p*-valor associados com a ANOVA realizadas na composição do extrato fenólico (mg/kg, b.s) em função do método da extração.

| Variável | Método de extração | |
|------------------|--------------------|------|
| | F | P |
| (-)-epicatequina | 4,2 | 0,07 |
| Procianidina | 1,9 | 0,23 |
| \overline{DPn} | 2,7 | 0,14 |
| unk1 | 0,9 | 0,44 |
| unk2 | 8,2 | 0,02 |
| unk3 | 5,3 | 0,05 |
| unk4 | 7,0 | 0,03 |

\overline{DPn} : grau médio de polimerização dos flavonóis (catequinas + procianidinas); unk: composto desconhecido, n= 8.

4.5. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

A Figura 4.44 apresenta as estimativas dos custos de manufatura dos extratos (COM) obtidos nos experimento de rendimento global (X_0) utilizando os solventes CO_2 , $CO_2 + EtOH$ e $CO_2 + H_2O$ respectivamente em três tamanhos de extratores (5, 50 e 500 L). Os maiores COM de extratos foram obtidos seguindo a seguinte ordem: CO_2 , $CO_2 + EtOH$ e $CO_2 + H_2O$. Os valores dos rendimentos foram apresentados juntamente às figuras para melhor entendimento do comportamento do COM.

O tempo de processo das extrações inseridos no simulador foi fixado de acordo com os tempos dos experimentos. Para o processo utilizando somente CO_2 como solvente, o tempo do processo foi de 40 min, resultando em 5940 bateladas anuais. Para os extratos obtidos com $CO_2 + EtOH$, o tempo de processo foi de 75 min, resultando em 3168 bateladas anuais. Entretanto, apesar do tempo de ciclo das extrações com $CO_2 + H_2O$ serem o mesmo do processo anterior (75 min), com a adição da etapa de liofilização no processo, o tempo total do processo aumentou para 24 horas. Por este motivo, ocorreu uma redução do número de bateladas anuais para 330.

Normalmente, o COM é estimado após a etapa de otimização do processo, ou seja, após a estimativa do melhor tempo de processo e juntamente com as informações da composição química dos extratos. Porém, para este estudo, a estimativa do COM para os

extratos obtidos no rendimento global (X_0) foi realizada a fim de verificar seu comportamento utilizando os três sistemas de solventes diferentes. Principalmente, avaliar o impacto no custo de manufatura dos extratos quando a água foi utilizada como cossolvente da extração.

Os valores das matérias-primas e o preço de venda de extratos (exceto para o feijão e cipó-de-são-joão) foram cotados no mercado brasileiro. Não foi encontrado no mercado nenhum valor de venda para o extrato de ingá-cipó. Mesmo assim, para as plantas estudadas não foi possível uma discussão baseada no tempo de retorno, já que os valores de COM obtidos foram maiores que os valores de venda dos extratos obtidos no mercado.

De acordo com a Figura 4.44 o COM dos extratos está diretamente relacionado com a densidade aparente do leite, o custo da matéria-prima, rendimento da extração e tempo de ciclo dos processos.

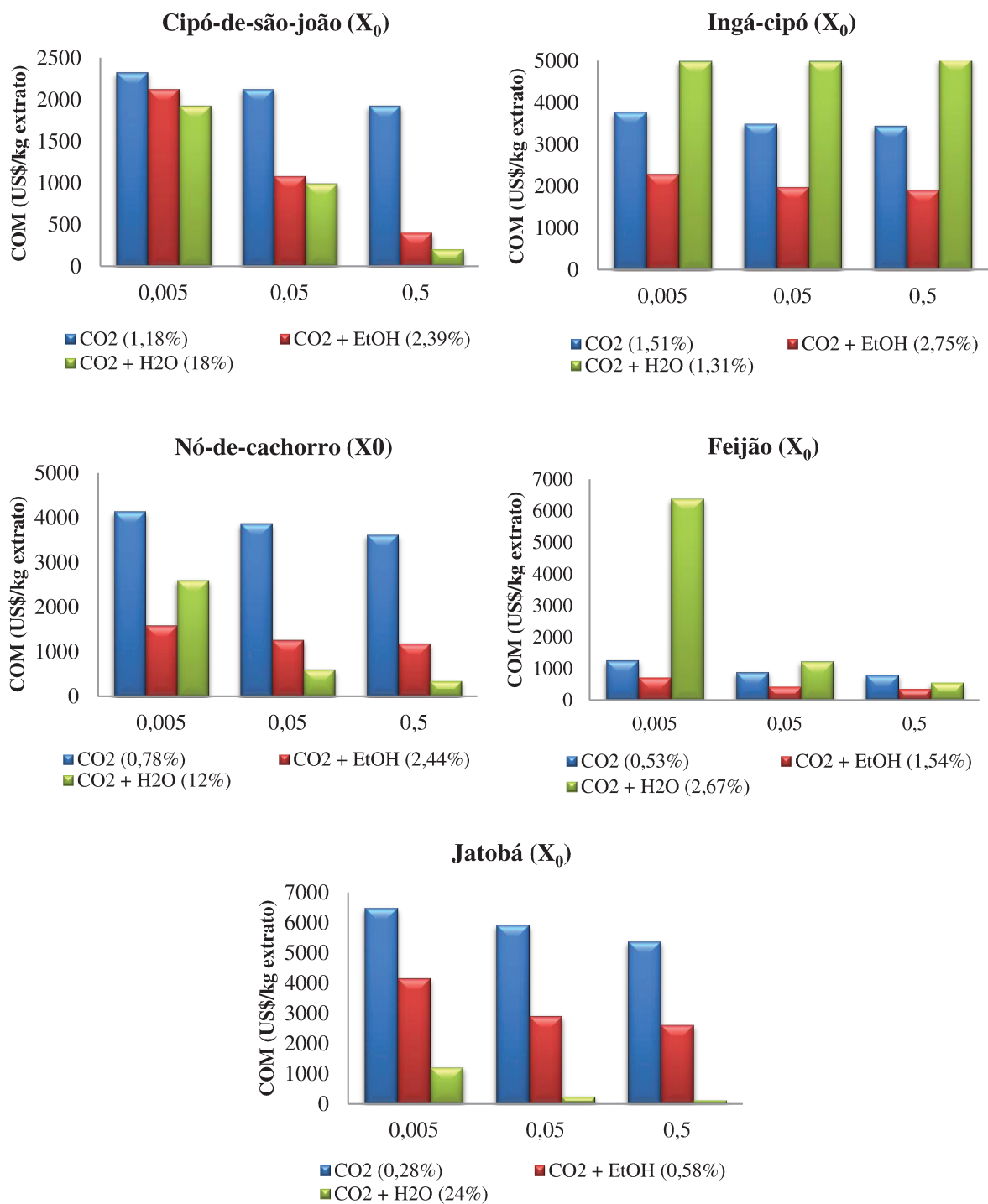


Figura 4.44. Custo de manufatura (COM) estimado para o extrato de jatobá obtido no rendimento global (X₀) utilizando CO₂, CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O em extratores de 5, 50 e 500 L.

De uma forma geral, os extratos obtidos utilizando somente CO₂ apresentaram maiores custos, principalmente devido ao menor rendimento, já que estes extratos foram obtidos em menor tempo de processo. Os menores valores de custo dos extratos obtidos com CO₂ + EtOH e CO₂ + H₂O se deve sobretudo ao aumento no rendimento da extração quando adicionado cossolvente, mesmo em maior tempo de ciclo.

O feijão possui densidade de leite elevada, o que implicaria na maior demanda de matéria-prima, portanto, devido a seu baixo custo US\$ 2,20/kg (AGOLINK, 2012), menor COM foi estimado para seus extratos. Também, o incremento no rendimento da extração causado pelo uso da água como cossolvente não foi o suficiente para que a produtividade anual do extrato superasse o efeito do tempo de processo da extração.

Para os extratos de jatobá, é notável o impacto do rendimento da extração nos COM estimados. Apesar de ser uma matéria-prima que também apresenta densidade aparente elevada quando comparada as outras, possui baixo custo, o que levou ao menor COM de seus extratos, principalmente os obtidos com água. Para estes extratos, o rendimento teve um alto impacto na produtividade anual de extrato, demonstrando a viabilidade deste processo. Comportamento similar foi obtido no COM estimado para os extratos de cipó-de-são-joão e nó-de-cachorro, porém, com menor COM nos processos utilizando CO₂ e CO₂ + EtOH, devido ao maior rendimento em relação aos extratos do jatobá.

Em relação ao extrato de ingá-cipó, o menor rendimento da extração e o elevado custo de matéria-prima, US\$ 50,00/kg (SANTOSFLORA, 2012), tiveram grande influência no COM final, afetando diretamente a viabilidade econômica. Foram estimados COMs altíssimos dos extratos no processo com água.

Portanto, para maioria das plantas avaliadas, menores COM foram estimados utilizando CO₂ + H₂O como solvente da extração, com destaque para o extrato de jatobá, cipó-de-são-joão e nó-de-cachorro, apresentando COM de US\$ 119.00/kg, US\$ 206.50/kg e US\$ 346.04/kg de extrato respectivamente em extrator de 500 L.

Dentro deste contexto, para os três sistemas de solventes, o processo torna-se economicamente viável quando se aumenta a escala, para extratores de 50 L e 500 L. Desta forma, a operação em extrator de 5 L para comercialização do produto é economicamente,

inviável. Este comportamento pode ser observado nos COMs estimados para os extratos de ingá-cipó, nó-de-cachorro e feijão. Além disso, os valores dos equipamentos utilizados para estimativa dos processos foram de fabricantes chineses, apresentando menores valores de unidades SFE do mercado, e conseqüentemente aumentando a viabilidade do processo. Desta forma, o investimento em uma unidade de 500 L é totalmente viável, mesmo com o processo de extração utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ operando em 24 horas.

Os demais parâmetros econômicos avaliados estão (Tabela 4.7 à Tabela 4.11). Pode-se observar o aumento no custo de matéria-prima (CRM) para cada solvente com o aumento de escala diluindo os demais. O mesmo pode ser observado para o custo de utilidades (CUT). O custo fixo de investimento (FCI) diminui com o aumento de escala, o que justifica a viabilidade de se operar com extratores de maiores capacidades. Ao contrário para o feijão, matéria-prima de baixo preço, o CRM apresentou a menor parcela dos custos, sendo o FCI predominante. O FCI dos extratos obtidos com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ apresentaram maior impacto, devido ao alto custo de investimento do liofilizador, que variou de acordo com a quantidade de água a ser removida de cada processo.

Tabela 4.7. Análise econômica da produção de extrato de cipó-de-são-joão obtido por SFE.

| Matéria-prima | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | CQC (%) |
|--|---------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Cipó-de-são-joão | | | | | | | | |
| CO₂ | | | | | | | | |
| 5 L | 270,13 | 629.000,00 | 2328,56 | 57,21 | 8,70 | 4,29 | 25,03 | 4,77 |
| 50 L | 2.702,05 | 5.759.000,00 | 2131,47 | 74,17 | 2,12 | 5,18 | 16,40 | 2,13 |
| 500 L | 27.020,47 | 52.198.000,00 | 1931,78 | 80,63 | 0,37 | 6,01 | 12,06 | 0,92 |
| CO₂ + EtOH | | | | | | | | |
| 5 L | 243,53 | 356.000,00 | 1459,91 | 37,70 | 13,11 | 5,28 | 35,15 | 8,74 |
| 50 L | 2.468,02 | 2.679.000,00 | 1085,59 | 60,82 | 4,23 | 8,46 | 22,37 | 4,11 |
| 500 L | 24.681,73 | 24.620.000,00 | 997,5 | 72,73 | 0,76 | 10,12 | 14,69 | 1,69 |
| CO₂ + H₂O | | | | | | | | |
| 5 L | 188,89 | 363.000,00 | 1923,74 | 3,86 | 27,02 | 21,75 | 36,32 | 11,05 |
| 50 L | 1.854,63 | 757.000,00 | 407,99 | 14,36 | 10,67 | 12,78 | 50,20 | 11,99 |
| 500 L | 18.926,03 | 3.908.000,00 | 206,5 | 30,65 | 2,36 | 12,44 | 45,07 | 9,47 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

Tabela 4.8. Análise econômica da produção de extrato de ingá-cipó obtido por SFE.

| Matéria-prima | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | CQC (%) |
|--|-----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Ingá-cipó | | | | | | | | |
| CO₂ | | | | | | | | |
| 5 L | 406,31 | 1.536.000,00 | 3781,22 | 73,96 | 3,99 | 3,88 | 15,97 | 2,19 |
| 50 L | 4.063,68 | 14.228.000,00 | 3501,36 | 83,77 | 0,91 | 2,64 | 11,77 | 0,91 |
| 500 L | 40.637,30 | 140.114.000,00 | 3447,92 | 87,01 | 0,14 | 2,73 | 9,76 | 0,35 |
| CO₂ + EtOH | | | | | | | | |
| 5 L | 294,22 | 677.000,00 | 2300,06 | 58,33 | 8,11 | 3,44 | 24,78 | 5,33 |
| 50 L | 2.941,88 | 5.848.000,00 | 1987,77 | 76,04 | 2,11 | 4,44 | 15,34 | 2,06 |
| 500 L | 29.420,00 | 56.306.000,00 | 1913,88 | 82,69 | 0,34 | 4,83 | 11,21 | 0,93 |
| CO₂ + H₂O | | | | | | | | |
| 5 L | 14,31 | 397.000,00 | 27718,55 | 9,06 | 25,37 | 20,59 | 34,60 | 10,38 |
| 50 L | 143,09 | 1.089.000,00 | 7608,58 | 29,06 | 8,61 | 10,52 | 42,14 | 9,67 |
| 500 L | 1.430,80 | 7.219.000,00 | 5045,56 | 51,42 | 1,58 | 8,77 | 32,10 | 6,13 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

Tabela 4.9. Análise econômica da produção de extrato de nó-de-cachorro obtido por SFE.

| Matéria-prima | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | CQC (%) |
|--|-----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Nó-de-cachorro | | | | | | | | |
| CO₂ | | | | | | | | |
| 5 L | 198,30 | 822.000,00 | 4145,24 | 63,65 | 6,97 | 3,91 | 21,66 | 3,82 |
| 50 L | 1.984,12 | 7.692.000,00 | 3876,59 | 77,68 | 1,62 | 4,56 | 14,50 | 1,63 |
| 500 L | 19.841,59 | 71.844.000,00 | 3620,89 | 82,90 | 0,27 | 5,08 | 11,07 | 0,68 |
| CO₂ + EtOH | | | | | | | | |
| 5 L | 282,74 | 449.000,00 | 1588,03 | 45,40 | 11,04 | 5,21 | 30,98 | 7,36 |
| 50 L | 2.827,38 | 3.580.000,00 | 1266,18 | 66,66 | 3,25 | 7,65 | 19,24 | 3,20 |
| 500 L | 28.653,64 | 34.098.000,00 | 1189,99 | 76,39 | 0,56 | 8,78 | 13,02 | 1,25 |
| CO₂ + H₂O | | | | | | | | |
| 5 L | 143,35 | 374.000,00 | 2609,26 | 5,33 | 26,46 | 21,65 | 35,74 | 10,82 |
| 50 L | 1.434,31 | 863.000,00 | 601,72 | 19,02 | 9,91 | 12,72 | 47,22 | 11,13 |
| 500 L | 14.342,33 | 4.963.000,00 | 346,04 | 38,09 | 2,06 | 12,61 | 39,27 | 7,98 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

Tabela 4.10. Análise econômica da produção de extrato de feijão obtido por SFE.

| Matéria-prima | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | CQC (%) |
|--|-----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Feijão | | | | | | | | |
| CO₂ | | | | | | | | |
| 5 L | 230,64 | 290.000,00 | 1257,78 | 22,60 | 15,57 | 15,14 | 38,17 | 8,53 |
| 50 L | 2.306,69 | 2.046.000,00 | 887,19 | 36,84 | 5,14 | 24,94 | 27,90 | 5,18 |
| 500 L | 23.066,86 | 18.300.000,00 | 793,34 | 46,70 | 0,98 | 31,65 | 18,22 | 2,45 |
| CO₂ + EtOH | | | | | | | | |
| 5 L | 316,55 | 226.000,00 | 714,06 | 11,25 | 17,85 | 14,67 | 44,50 | 11,74 |
| 50 L | 3.165,56 | 1.341.000,00 | 423,76 | 22,89 | 7,33 | 30,02 | 32,63 | 7,13 |
| 500 L | 31.656,61 | 11.243.000,00 | 355,17 | 31,91 | 1,53 | 41,87 | 21,25 | 3,44 |
| CO₂ + H₂O | | | | | | | | |
| 5 L | 55,10 | 352.000,00 | 6393,46 | 0,89 | 27,55 | 23,43 | 36,85 | 11,27 |
| 50 L | 551,08 | 678.000,00 | 1230,06 | 3,09 | 10,88 | 18,40 | 54,53 | 13,10 |
| 500 L | 5.510,75 | 3.033.000,00 | 550,4 | 7,35 | 2,67 | 27,06 | 51,74 | 11,17 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

Tabela 4.11. Análise econômica da produção de extrato de jatobá obtido por SFE.

| Matéria-prima | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | CQC (%) |
|--|-----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Jatobá | | | | | | | | |
| CO₂ | | | | | | | | |
| 5 L | 93,54 | 608.000,00 | 6497,15 | 54,23 | 8,96 | 6,38 | 25,52 | 4,91 |
| 50 L | 935,45 | 5.547.000,00 | 5930,15 | 71,10 | 2,19 | 7,83 | 16,67 | 2,21 |
| 500 L | 9.354,57 | 50.382.000,00 | 5385,81 | 77,43 | 0,38 | 9,04 | 12,19 | 0,96 |
| CO₂ + EtOH | | | | | | | | |
| 5 L | 73,81 | 307.000,00 | 4159,42 | 30,65 | 14,72 | 6,85 | 38,10 | 9,68 |
| 50 L | 728,32 | 2.118.000,00 | 2907,95 | 52,91 | 5,07 | 11,62 | 25,40 | 5,00 |
| 500 L | 7.380,89 | 19.280.000,00 | 2612,17 | 66,06 | 0,95 | 14,56 | 16,31 | 2,12 |
| CO₂ + H₂O | | | | | | | | |
| 5 L | 290,51 | 352.000,00 | 1211,52 | 2,87 | 27,42 | 21,51 | 36,92 | 11,29 |
| 50 L | 2.905,06 | 708.000,00 | 243,77 | 10,78 | 11,05 | 14,05 | 51,71 | 12,41 |
| 500 L | 29.050,56 | 3.463.000,00 | 119,22 | 23,37 | 2,49 | 15,02 | 48,73 | 10,40 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

Na Figura 4.45 estão apresentados as estimativas de custo (COM) dos extratos de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ baseados na cinética de extração em extrator de 500 L. É possível observar um decréscimo do COM até o tempo de 100 minutos (US\$ 359,04/kg). O COM para o extrato de jatobá variou de US\$ 148,88/kg a US\$ 2596,69/kg de extrato dependendo do tempo de processo. A estimativa do custo de manufatura em t_{CER} (64 min) e t_{CER2} (135 min) foi de US\$ 456,48/kg e US\$ 298,70/kg de extrato respectivamente; e o COM estimado em relação aos teores de taninos obtidos em t_{CER} (64 min) e t_{CER2} (135 min) foi de US\$ 8,54/g e US\$ 4,30/g respectivamente.

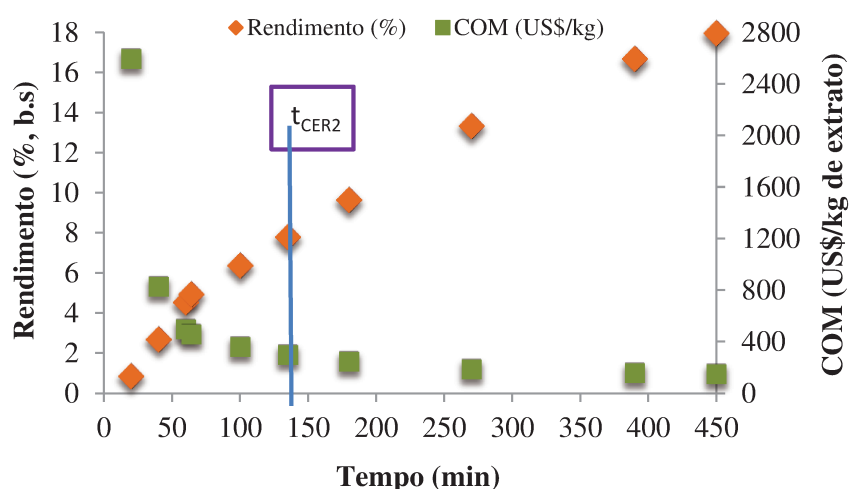


Figura 4.45. Custo de manufatura (COM) estimado para os extratos obtidos na cinética de extração (OEC) utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente em extrator de 500 L.

O COM estimado após a otimização dos parâmetros operacionais foi significativamente reduzido. Do ponto de vista econômico, o emprego de extratores de maiores capacidades impacta diretamente na maior produtividade de extrato, viabilizando a aplicação industrial do processo.

A Tabela 4.12 apresenta a variação dos parâmetros econômicos estimados em função do tempo de extração dos extratos de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Observa-se que o FCI é predominante e o dobro do CRM. Como comentado antes, a adição do liofilizador aumentou o custo de investimento do processo. O COM estimado para o teor de taninos em cada tempo da extração também está apresentado.

Baseando nos COMs estimados para os taninos, pode-se dizer que o t_{CER2} é uma boa estimativa de tempo de ciclo, pois apresenta melhor relação entre rendimento e custo. Porém, uma análise detalhada da composição química dos extratos de jatobá auxiliaria na determinação do tempo economicamente viável para o processo.

A análise do custo de manufatura dos extratos demonstra que a SFE não é uma técnica de alto investimento e pode ser competitiva com processos tradicionais de extração desde que seja realizada a análise econômica viável.

Tabela 4.12. Análise econômica da produção de extrato de jatobá obtido na cinética de extração por SFE.

| Tempo (min) | Produtividade (kg/ano) | Custo de operação (US\$/ano) | COM (US\$/kg extrato) | COM taninos (US\$/g extrato) | CRM (%) | COL (%) | CUT (%) | FCI (%) | QC (%) |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 500 L | | | | | | | | | |
| 20 | 1.026,33 | 2.665.000,00 | 2596,69 | 34,66 | 26,83 | 2,58 | 4,00 | 54,69 | 11,90 |
| 60 | 5.483,92 | 2.719.000,00 | 495,87 | 9,58 | 26,56 | 2,76 | 4,63 | 54,23 | 11,82 |
| 100 | 7.719,24 | 2.772.000,00 | 359,04 | 5,98 | 26,31 | 2,93 | 5,24 | 53,80 | 11,72 |
| 180 | 11.676,71 | 2.879.000,00 | 246,55 | 2,84 | 25,84 | 3,27 | 6,44 | 52,99 | 11,46 |
| 270 | 16.134,30 | 3.001.000,00 | 185,97 | 2,48 | 25,26 | 3,65 | 7,73 | 51,98 | 11,38 |
| 450 | 21.744,34 | 3.237.000,00 | 148,88 | 2,18 | 24,26 | 4,34 | 10,10 | 50,25 | 11,05 |

COM: custo de manufatura; CRM: custo de matéria-prima; COL: custo de mão-de-obra; FCI; custo de investimento; CQC; custo com controle de qualidade; CUT: custo de utilidades.

5. CONCLUSÃO

O estudo de diferentes matrizes vegetais na obtenção de compostos fenólicos através de experimentos de rendimento global ($X_{0,S/F=50}$), permitiu avaliar o comportamento destas empregando 3 tipos de solventes: CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. As plantas avaliadas foram: Cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), Nó-de-cachorro (*Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach), Ingá Cipó (*Inga edulis*), Jatobá (*Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*) e Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). De acordo com os resultados, os rendimentos obtidos variaram de 0,28 a 1,51 % utilizando CO_2 puro, 0,58 a 2,75 % utilizando $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ e 1,31 a 24 % utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Portanto, com o emprego do sistema $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ houve maior incremento no rendimento global das plantas, exceto para o ingá-cipó. Ainda, este solvente apresentou ótima relação entre rendimento global e atividade antioxidante para o extrato de jatobá, 24 % e 0,20 mg/cm³, respectivamente.

As isotermas de rendimento global (IRG's) para o jatobá mostraram que na condição de 323 K e 15 MPa houve maior recuperação de extrato (11,5 %), juntamente com maior teor de polifenóis (335,00 mg de ATE/g de extrato) e taninos totais (1,8 %). Ainda, as análises de CCD dos extratos confirmaram elevada atividade antioxidante atribuída à classe dos taninos presente nos extratos.

A cinética da extração construída sob condição de 323 K e 15 MPa durante 450 min de extração, resultou em um rendimento de 18 % (b.s). Segundo os parâmetros cinéticos ajustados para os três períodos de extração, na etapa de taxa constante t_{CER} (64 min) foram extraídos 27,5 % do extrato, enquanto em $t_{\text{CER}2}$ (135 min), 43,5 % do extrato foi recuperado. O teor de taninos em $t_{\text{CER}2}$ foi de 1,22 mgPE/gMP (b.s).

O estudo do aumento de escala de 30 vezes utilizando o critério em que se mantêm constantes a razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima não foi eficiente para o jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, já que as curvas de extração não apresentaram formatos similares para as escalas piloto e laboratorial. O rendimento total em escala piloto foi de 12,8 % em 140 min de extração, com 99 % do extrato recuperado no primeiro separador (S1); o total de taninos foi de 2,57 mgPE/gMP (b.s).

Através do cálculo do custo de manufatura dos extratos (COM) obtidos por SFE em $X_{0,S/F=50}$, verificou-se que com o emprego do $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ como solvente, foram obtidos menores valores de COM, principalmente quando se trabalhou com extratores de maiores capacidades (50 e 500 L). Este comportamento foi diferente somente para o Ingá-cipó, matriz vegetal de custo elevado. A estimativa do COM para os extratos de jatobá no processo otimizado em t_{CER} (64 min) e $t_{\text{CER}2}$ (135 min) foi de US\$ 456,48/kg e US\$ 298,70/kg de extrato respectivamente em extrator de 500 L. Portanto, do ponto de vista econômico, o emprego de extratores de maiores capacidades impacta diretamente na maior produtividade de extrato, viabilizando a aplicação industrial do processo.

Em relação aos extratos obtidos com ultrassom (UAE), a água foi o solvente mais adequado na recuperação dos polifenóis, a uma razão de S/F igual a 20. Operando com uma potencia de 60 W durante 40 min a uma temperatura de 323 K, obteve-se o maior rendimento ($15,8 \pm 0,7 \%$) e maior teor de polifenóis (81,42 mg EAG/g MP, b.s). O teor de polifenóis foi 12 % maior que o obtido na extração com agitação (AGE), com $13,9 \pm 0,5 \%$ de rendimento. Além disso, as análises de CCD dos extratos obtidos por UAE e AGE também confirmaram a atividade antioxidante dos extratos de jatobá atribuída à classe dos taninos. O mesmo comportamento foi obtido estudando a extração de polifenóis em corrente cruzada em três estágios, em que maiores rendimentos e teores de polifenóis foram alcançados por UAE.

Os rendimentos totais e os teores de polifenóis obtidos para experimentos de aumento a escala (1 L para 3 L) mostraram-se similares: $15,8 \pm 0,7 \%$ e $15,5 \pm 0,5 \%$ e, 81,42 e 81,37 mg EAG/g MP (b.s) em escala laboratorial e semi-piloto, respectivamente.

Segundo o estudo cinético, a extração de polifenóis utilizando o ultrassom mostrou-se mais rápida na primeira etapa, devido à cavitação do ultrassom; enquanto que na segunda etapa, a extração por agitação mostrou-se mais rápida. Os coeficientes de difusão determinados foram $2,63 \times 10^{-9}$ e $1,86 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ para a extração com ultrassom e $1,69 \times 10^{-9}$ e $4,54 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ para extração com agitação.

Os compostos obtidos da casca do jatobá por SFE e UAE apresentaram perfil de procianidinas de elevada massa molecular.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O aprofundamento dos estudos em relação à identificação dos compostos majoritários dos extratos de jatobá (tanto por SFE quanto por UAE) possibilitaria avaliar empregos mais objetivos para os produtos obtidos;

Otimização do processo SFE na extração da casca do jatobá em termos de proporção de cossolvente;

Avaliação do custo de manufatura para o processo de extração assistida por ultrassom (UAE) como forma de comparação com os custos obtidos no processo SFE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D.G.I. Isolation and Absolute Configuration of *ent*-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest. **Journal of Natural Products**, v. 6, p. 11-15, 2002.

ABE, I.; FUNAOKA, M.; KODAMA, M. Phenolic nuclei of condensed tannins approaches by the phenyl nucleus-exchange method (in Japanese). **Mokuzai Gakkaishi**, v. 33, p. 582-588, 1987.

ABIFISA. Disponível em < <http://www.abifito.org.br>>, acesso em outubro 2012.

ACHAT, S.; TOMAO, V.; MADANI, K.; CHIBANE, M.; ELMAATAOUI, M.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 777-786, 2012.

ADAM, F.; ABERT-VIAN, M.; PELTIER, G.; CHEMAT, F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 457-465, 2012.

AGOSTINI COSTA, T.S.; GARRUTI, D.S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F.A.P.; MACHADO, T.F. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.

AGROLINK. Disponível em <<http://www.agrolink.com.br>>, acesso em outubro 2012.

AKERELE, O. Summary of who guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-20, 1993.

ALEXE, G.; MARINESCU, M.; MATEI, E.; LUCA, E. Increase in the extraction of tanning material under ultrasonic vibration. **Review Technology Industry Cuir**, p. 56-73, 1964.

ALKIO, M. **Purification of pharmaceuticals and nutraceutical compounds by sub- and supercritical chromatography and extraction**. VTT Publications 673. 84 p. + app. 42 p. Espoo, 2008.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening

para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

APPEL, H.M.; GOVERNOR, H.L.; D'ASCENZO, M.; SISKI, E.; SCHULTZ, J.C. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 761-778, 2001.

ARCURI, P.B.; THONNEY, M.L.; SCHOFIELD, P.; PELL, A.N. Polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone effect on bacterial rRNA extraction and hybridization from cells exposed to tannins. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1073-1081, 2003.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops & Products**, v. 34, p. 838-844, 2011.

ATHIMULAM, A.; KUMARESAN, S.; FOO, D.C.Y.; SARMIDI, M.R.; AZIZ, R.A. Modelling and optimization of *eurycoma longifolia* water extract production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, p.139-149, 2006.

BALACHANDRAN, S.; KENTISH, S.E.; MAWSON, R.; ASHOKKUM, M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 471-474, 2006.

BALBANI, A.P.S.; SILVA, D.H.S.; MONTOVANI, J.C. Potents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461-473, 2009.

BANKS, C.E; COMPTON, R.G. Ultrasound: promoting electroanalysis in difficult real world media. **Analyst**, v. 129, p. 678-683, 2004.

BARBOSA, W.L.R. Manual para análise Fitoquímica e Cromatográfica de extratos vegetais. Manual. Universidade Federal do Pará. 2001. Centro de ciências da saúde, departamento de farmácia, laboratório de fitoquímica. Belém-PA, 2001.

BENINGER, C.W.; HOSFIELD, G.L. Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7879-7883, 2003.

BERNA, A.; CHAFER, A.; MONTON, J.; SUBIRATS, S. High-pressure solubility data of system ethanol (1) + catechin (2) + CO₂ (3). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 157-162, 2001.

BERNAL, J.; MENDIOLA J. A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 758-74, 2011.

BLOCK, L.H. Scale Up of Liquid and Semisolid Manufacturing Processes. **Pharmaceutical Technology scaling up manufacturing**, p. 26-33, 2005.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; OGUTU, S. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus spp.* L.). **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1541-1547, 2008.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; DEOLIVEIRA, A.B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, p. 447-452, 2000.

BRAGA, M.E.M.; LEAL, P.F., CARVALHO; J.E.; MEIRELES, M.A.A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6604-6611, 2003.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.C.P.; MONTE-MÓR, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.141-148, 2008.

BRAVO, L.B. Polyphenols, chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRUNNER, G. **Gás Extraction: Na Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. Ed. Springer, Hamburgo, Alemanha, 1994, 387 p.

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

ÇAM, M.; HIŞİL, Y. Pressurized water extraction of polyphenols from pomegranate peels. **Food Chemistry**, v. 123, p. 878-885, 2010.

CAMPOS, P.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M. Effect of X- and gamma-rays on phenolic compounds from *Maytenus aquifolium Martius*. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 264, n. 3, p. 707-709, 2005.

CARLO, G.D.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life sciences**, v. 65, p. 337-353, 1999.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analítica Chimica Acta**, v. 732, p. 100-104, 2012.

CARVALHO JR, R.N.; MOURA, L.S.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **Journal of supercritical fluids**, v. 35, n. 3, p. 197-204, 2005.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F.A.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.J. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from sunflower leaves: comparison of analytical and pilot-scale extraction. In: EUROPEAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING (ECCE-6), 2007, Copenhagen. **Proceedings of the European Congress of Chemical Engineering, Copenhagen**, 2007.

CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P. R. Nascimento, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 55-57, 2004.

CATCHPOLE, O.J.; GRY, J.B.; MITCHELL, K.A.; LAN, J.S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 97-106, 2004.

CHAVAN, U.D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvent. **Food Chemistry**, v. 75, p. 509-512, 2001.

CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; FELÍSSIMO, D.C.; DANTAS, V.S.; DANTAS, G.D.S. Lamberdor: um conhecimento popular em abordagem científica. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 73-93, 2008.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHEN, M. Effects of Extraction on Reaction of Bark Extracts With Formaldehyde. **Holzforschung**, v. 45, n.2, p. 155-159, 1991.

CHEW, K.K.; KHOO, M.Z.; NG, S.Y.; THOO, Y.Y.; WAN AIDA, W.M.; HO, C.W. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1427-1435, 2011.

CHIU, K.K.; CHENG, Y.C.; CHEN, J.H.; CHANG, C.J.; YANG, P.W. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and Flavonoids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 77-87, 2002.

CHUNG, K.; WONG, T.Y.; WEI, C.; HUANG, Y.; LIN, Y. Tannins and human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 421-464, 1998.

COELHO, M.F.B.; SOUZA, R.L.C.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; WEBER, O.S.; NOGUEIRA BORGES, H.B. Qualidade de mudas de nó-de-cachorro (*Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 3, p. 82-90, 2008.

COELHO, M.F.B.; SPILLER, C. Fenologia de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.-Malpighiaceae, em Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 10, v.1, p. 1-7, 2008.

CONDORI, S.Q. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas da extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenácea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare***. 2005. 239 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MINICHINI, F.; STATTI, G.A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. **Food Chemistry**, v. 112, p. 587-594, 2009.

COSTA, C.L.S.; CHAVES, M.H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: Uma alternativa para as disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

COSTA, L.M.; SANTOS, V.A.; OHANA, D.T.; LIMA, E.S.; PEREIRA, M.M.; SOUZA, T.P. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum*. (mulateiro) using factorial design. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 1, p. 181-186, 2011.

CPFL. Disponível em < <http://www.cpfl.com.br>>, acesso em outubro 2011.

CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford: Oxford University Press, 1975, 424 p.

D'ALESSANDRO, L.G.; KRIAA, K.; NIKOV, I.; DIMITROV, K. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. **Separation and Purification Technology**, v. 93, p. 42-47, 2012.

DA SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; DA CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

DAUKSAS, E.; VENSKUTONIS, P.R.; SIVIK, B.; NILSSON, T. Effect of fast CO₂ pressure changes on the yield of lovage (*Levisticum officinale Koch.*) and celery (*Apium graveolens L.*) extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 201-210, 2002.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

DE LA LASTRA, C.A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 405-430, 2005.

DE LUCAS, A.; GRACIA, I.; RINCO, J.; GARCÍA, M. T. Solubility Determination and Model Prediction of Olive Husk Oil in Supercritical Carbon Dioxide and Cosolvents. **Industrial and Engineering Chemical**, v. 46, p.5061-5066, 2007.

DE MARIA, L.L.M.; JANETE, H.Y.V.; FERNANDO, M.L. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from Passiflora leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 2007.

DEL VALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. **Food Science and Technology International**, v. 5, p. 1-24, 1999.

DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

DIAS, A.L.S.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Ingá edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2010.

DING, LI.; LUO, X.; TANG, F.; YUAN, J.; LIU, Q.; YAO, S. Simultaneous determination of flavonoid and alkaloid compounds in Citrus herbs by high-performance liquid

chromatography–photodiode array detection–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 857, p. 202-209, 2007.

DOAT, J. Les tanins dans les bois tropicaux. **Bois et Forêts des Tropiques**, Nogent, v. 182, p. 35-37, 1978.

DOBIÁŠ, P.; PAVLÍKOVÁ, P.; ADAM, M.; EISNER, A.; BEŇOVÁ, K.B. Comparison of pressurized fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. **Central European Journal of Chemistry**, v.8, p. 87-95, 2010.

DONG, J.; LIU, Y.; LIANG, Z.; WANG, W. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p. 61-65, 2010.

DOS SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1998.

DUARTE, M.R.; JURGENSEN, I. Diagnose Morfoanatômica de Folha e Caule de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoniaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n.1, p. 70-75, 2007.

DUBEY, R.C.; MISRA, K. Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 53, n. 4, p. 378-81, 1976.

DUFRENSE, C.J.; FARNWORTH, E.R.A Review of latest research on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-21, 2001.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 111-120, 1996.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M.; CHEN, C.Y.; MALLOY, M.J.; BROWNE, A.; CHIU, E.Y.; KWAK, H.K.; MILBURY, P.; PAUL, S.M.; BLUMBERG, J.; MIETUS-SNYDER, M.L. Flavonoid-Rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n.3, p. 197-204, 2004.

ERVAS BRASIL. Disponível em < <http://www.ervasbrasil.com.br>>, acesso em outubro 2012.

FAOSTAT. Core Consumption Data, 2005. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>, acesso em fevereiro 2010.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FERREIRA, D.T.; ALVARES, P.SM.; HOUGHTON, P.T.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes Químicos das Raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.

FERREIRA, S.R.S.; MEIRELES, M.A.A. Modeling the supercritical fluid extraction of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 263-269, 2002.

FERREIRA JR, M.F.; MORAES, S.A.L. Estudo da composição química do café conilon. (*C. canephora*) proveniente do cerrado mineiro. **Revista Horizonte Científico**, v.1, n.7, p. 1-24, 2007.

FERREIRA, E.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, V.L. Flavonoides: Um potente agente terapêutico. **Diário de Itabira**, Itabira, n. 4054, 2008.

FERRENTINO, G.; BARLETTA, D.; DONSI, F.; FERRARI, G.; POLETTO, M. Experimental Measurements and Thermodynamic Modeling of CO₂ Solubility at High Pressure in Model Apple Juices. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 2992-3000, 2010.

FLICKR. Disponível <www.flickr.com>, acessado em Junho, 2012.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 271-277, 2008.

FREGONESI, F.; GUEDES, R.C.M.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Estudo da atividade antioxidante dos extratos da casca e da folha de *Hymenaea courbaril* (jatobá) obtidos por maceração dinâmica, ultra-som e soxhlet. In: 17º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2009, Ribeirão Preto. **Livro de resumos do 17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2009.

GAETE-GARRETÓN, Y.; VARGAS-HERNÁNDEZ, M.G.; CARES-PACHECO, J.S.; ALARCÓN, J. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria Molina* L. **Ultrasonics**, v. 51, p. 581-585, 2011.

GALVÃO, S.M.P.; MARQUES, L.C.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.A. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 305-311, 2002.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GINDRI, A.L.; SILVA, M.; MARCHI, M.B.; BRUM, L.S.; ATHAYDE, M.L.; HOELZEL, S.C.S.M. Análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de *Urerabaccifera* (L.) Gaudich (urticaceae). **Saúde** (Santa Maria), v. 36, n. 2, p. 63-69, 2010.

GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in Food: Practical Applications**. Wood head Publishing Limited, Abington, Cambridge, England, 2001, p. 147-158.

GRANATO, D.; NUNES, D.S.; MATTOS, P.P.; RIOS, E.M.; GLINSKI, A., RODRIGUES, L.C.; JÚNIOR, G.Z. Chemical and Biological Evaluation of Rejects from the Wood Industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 237-241, 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 (*Hierchloë odorata*). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 223-233, 2005.

GUYOT, S.; MARNET, N.; DRILLEAU, J.F. Thioacidolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 14-20, 2001.

GUZMÁN-MALDONADO, S.H.; CASTELLANOS, J.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 55, p. 333-335, 1996.

HAGERMAN, A.E.; RIEDL, K.M.; JONES, A.; SOVIK, K.N.; RITCHARD, N.T.; HARTZFELD, P.W.; RIECHEL, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (taninns) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1887-1892, 1998.

HANDA S.S; KHANUJA S.P.S, LONGO G.; RAKESH D.D. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. International Centre for Science and High Technology. Trieste, 2008, 266 p.

HASLAM, E. **Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989, 230pp.

HEIM, K.E; TAGLIAFERRO, A.R; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure - activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HELDT, H. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**, University Press: Oxford, 1997, 522p.

HERODEZ, S.S.; HADOLINB, M.; SKERGETA, M.; KNEZA, Z. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 80, p. 275-282, 2003.

HROMÁDKOVÀ, Z.; EBRINGEROVÀ, A. Ultrasonic extraction of plant materials- Investigation of hemicellulose release from *buckwheat hulls*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, p. 127-133, 2003.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1381-1398, 2008.

IHEOZOR-EJIOFOR, P.; DEY, E.S. Extraction of rosavin from *Rhodiola rosea* root using supercritical carbon dioxide with water. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, p. 29-32, 2009.

JACOBS, M.B. **The Chemical Analysis of Food and Products**. Robert Krieger Publishing Co., New York, 1973, p. 22-23.

JERMAN, T.; TREBŠE, P.; MOZETIC VODOPIVEC, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 123, p. 175-182, 2010.

KANDIAH, M.; SPIRO, M. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25, p. 328-338, 1990.

KATAYAMA, S., ZHAO; L., YONEZAW, S.; IWAI, Y. Modification of the surface of cotton with supercritical carbon dioxide and water to support nanoparticles. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p.199-205, 2012.

KHOO, M.Z. **Comparative study on polyphenol antioxidant activity of misai kucing (*Orthosiphon stamineus*) crude extract**. Thesis. Malaysia: UCSI University, 2009.

KIATGRAJAI, P.; WELLONS, J.D.; GOLLOB, L.; WHITE, J.D. Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 2910-2912, 1982.

KIM, D.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003.

KIM, W.J.; KIM, J.D.; KIM, J.; SEONG-GEUN, O.H, YOUN-WOO, L.E.E. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 303-309, 2008.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213-218, 1999.

KITADA, K.; MACHMUDAH, S.; SASAKI, M.; GOTO, M.; NAKASHIMA, Y.; KUMAMOTO, S.; HASEGAWA, T. Antioxidant and antibacterial Activity of nutraceutical compounds from chlorella vulgaris extracted in hydrothermal condition. **Separation Science Technology**, v. 44, p. 1228-1239, 2009.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; CAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9452-9458, 2005.

KOTOUPAS, A.; RIGAS, F.; CHALARIS, M. Computer-aided process design, economic evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. **Desalination**, v. 213, p.238-252, 2006.

KRISHNA, V.; SHARMA, S.; PAREEK, R.B.; SINGH, P. Terpenoids constituents from some indigenous plants. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 79, n.6, p. 550-552, 2002.

KUMAR, A.; ASTHANA, M.; SHARMA, S.; ROY, P.; AMDEKAR, S.; SINGH, V.; PARKASH, O.; SHARMA R. Importance of Using DNA Microarray in Studying Medicinal Plant. **Webmed Central Molecular Biology**, v. 3, n. 7, WMC003286, 2012.

LE BOURVELLEC, C.; BOUZERZOUR, K.; GINIES, C.; REGIS, S.; PLE, Y.; RENARD, C.M.G.C. Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 537-547, 2011.

LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C.M.G.C. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. **Critical Review in Food Science and nutrition**, v. 52, n. 3, p. 213-248, 2012.

LEAL, P.F.; BRAGA, M.E.; SATO, D.N.; CARVALHO, J.E.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.5 1, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LEAL, P.F.; MAIA, N.B.; CARMELLO, Q.A.C.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N.; MEIRELES, M.A.A. Sweet basil (*Ocimum basilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): global yields, chemical compositions, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 326-338, 2008.

LI, D.; SYPERT, G.W.; GOW, R.T. **Compositions and methods comprising Zingiber species**. United States Patent Application. HerbalScience Singapore Pte. Ltd. WO 2008/010183. 2008.

LI, Q.; ZHANG, Z.; ZHONG, C.; LIU, Y.; ZHOU, Q. Solubility of solid solutes in supercritical carbon dioxide with and without cossolvents. **Fluid Phase Equilibria**, v. 207, p. 183-192, 2003.

LIONÇO, M.I.; DE SOUZA, T.P.B.; PETROVICK, P.R. Avaliação cromatográfica de polifenóis presents nas partes morfológicas de *Phyllanthus Niruri*. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 2, p.117-120, 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 1991, 2 ed., 448 p.

LORIMER, J.P.; MASON, T.J.; FIDDY, K. Enhancement of chemical reactivity by power ultrasound: an alternative interpretation of the hot spot. **Ultrasonics**, v. 23, p. 157-169, 1991.

LUQUE-GARCÍA, J.L.; DE CASTRO, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MA, Y.; YE, X.; HAO, Y.; XU, G.; XU, G.; LIU, D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 227-232, 2008.

MACHMUDAH, S.; KITADA, K.; SASAKI, M.; GOTO, M.; MUNEMASA, J.; YAMAGATA, M. Simultaneous Extraction and Separation Process for Coffee Beans with Supercritical CO₂ and Water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 4, p. 2227-2235, 2011.

MACHMUDAH, S.; MARTIN, A.; SASAKI, M.; GOTO, M. Mathematical modeling for simultaneous extraction and fractionation process of coffee beans with supercritical CO₂ and water. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 111-119, 2012.

MAILLARD, M.N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1789-93, 1995.

MANACH, C.; MAZUR, A. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev. 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.

MARINHO, I.V. **Avaliação do potencial tanífero das cascas do angico vermelho *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina* (Vell.) Brenan e do cajueiro *Anacardium occidentale* Linn. em diferentes reagentes.** 2004. 36 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2004.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W.R.W.; SINGH, M.H.; JAHIM, J.M.D. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496, 2007.

MARQUES, L.C.; PIERI, C.; ROMAN-JÚNIOR, W.A.; CARDOSO, M.L.C.; MILANEZE-GUTIERRE M.A., MELLO, J.C.P. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (*Malpighiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 604-615, 2007.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A.R.; ROSA, P.T.V.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-63, 2003.

MARTÍNEZ, J.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of clove and vetiver oils with supercritical carbon dioxide: modeling and simulation. **The Open Chemical Engineering Journal**, v.1, p. 1-7, 2007.

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

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais.** Viçosa: UFV, 2000, 220 p.

MASON, T.J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.P. The use of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253-260, 1996.

MASON, T.J.; PHILLIP LORIMER, J. **Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing.** Wiley-VCH: Darmstadt, Germany, 2002, 303 p.

MATTEI, R.; BARROS, M.P.; GALVÃO, S.M.P.; HENRIQUES, E.J.B.; CARLINI, E.L.A. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: Effects of Extract BST 0298 on the Oxidative Stress of Young and Old Rat Brains. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 604-607, 2001.

MCGRAW, G.W.; STEYNBERG, J.P.; HEMIGAY, R.W. Condensed tannins: a novel rearrangement of procyanidins and prodelphinidins in thiolytic cleavage. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 987-990, 1993.

MCHUGH, M.A.; KRUKONIS, V.J. **Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice**, 2nd Ed., Butterworth-Heinemann, Boston, 1994, 253 p.

MEIRELES, M.A.A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, J. **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008, p. 243-274.

MELECCHI, M.I.S.; PÉRES, V.F.; DARIVA, C.; ZINI, C.A.; ABAD, F.C.; MARTINEZ, M.M.; CARAMÃ, E.B. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus Tiliaceus* L. flowers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 242-250, 2006.

MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M.O., Schenckel, E.P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3^a ed., 2001.

MENAKER, A.; KRAVETS, M.; KOEL, M.; ORAV, A. Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 629-633, 2004.

MENDES, R.L.; NOBRE, B.P.; CARDOSO, M.T.; PEREIRA, A.P.; PALAVRA, A.F. Carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 328-334, 2003.

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, n. 2, p. 127-30, 2001.

MISAILIDIS, N.; CAMPBELL, G.M.; DU, C.; SADHUKHAN, J.; MUSTAFA, M.; MATEOS-SALVADOR, F.; WEIGHTMAN, R.M. Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol, Part 2. Process simulation and economic analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1239-1250, 2009.

MOHAMED, R.S.; MANSOORI, G.A. The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing. **Food Technology Magazine**, p. 1-15, 2002.

MONTAÑÉS, F.; FORNARI, T.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. Isolation of prebiotic carbohydrates by supercritical fluid extraction. Scaling-up and economical feasibility. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 92-98, 2012.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: Uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, R.G. **Plantas Medicinais e Representações sobre Saúde e Doença na Comunidade de Angical (Rosário Oeste-MT)**. 2003. 153 f. Dissertação (Mestrado em saúde e ambiente). Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MORI, F.A.; VITAL, B.R.; LUCIA, R.M.; VALENTE, O.F.; PIMENTA, A.S. Utilização de resinas à base de taninos das cascas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden na produção de painéis compensados. **Revista Árvore**, v. 23, n. 4, p. 455-461, 1999.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M.J.; CORNÉLIO, M.L. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 68-73, 2003.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J.L. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-3412, 2000.

NEGRI, M.L.S. **Secagem das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos**. 2007, 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE, J.R.A.; MARSAIOLI, A.J.; IAMAMURA, P.M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1153-1157, 2001.

OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais. Disponível em: <<http://www.cpsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinasmelhoramento.pdf>>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

OOMAH, B.D.; TIGER, N.; OLSON, M.; BALASUBRAMANIAN, P. Phenolics and antioxidative activities in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 91-97, 2006.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.P.; MACIA, A.; REGUANT, J.; ANGLE, N.; MORELLO, J.R.; MOTILVA, M.J. Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 298-305, 2010.

PADILHA, M.H.; JESUS, A.F.; MELLO, E.V.S.L.; MELLO, J.C.P. Análise da Reparação do Tecido Conjuntivo em Feridas de Ratos Tratados com Gel contendo Extrato de *Heteropteris Aphrodisiaca* sem Toxinas e de sua Atividade Antioxidante. In: XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/CNPq. **Livro de Resumos do 16th Encontro Anual de Iniciação Científica PIBIC/CNPq**, Maringá, 2007.

PALAZZO, F.; PEREIRA, L.C.M.S.; MELLO, E.V.S.L.; MELLO, J.C.P. Cicatrização de feridas cutâneas com aplicação de pomada de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. **Anais do 16th Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife, 2000, v. 16, p. 183.

PALICI, I.; TITA, B.; URSICA, L.; TITA, T. Method for Quantitative Determination of Polyphenolic Compounds and Tannins from Vegetal Products. **Seria F Chemia**, v. 8, p. 21-32, 2005.

PALMA, M.; TAYLOR, L.T. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 5044-5048, 1999.

PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 119-130, 2002.

PANSERA, M.R.; IOB, G.A.; ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; ATTI-SERAFINI, L.; CASSEL, E. Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 995-998, 2004.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, p. 271-280, 2004.

PARK, H.S.; LEE, Y.H.; KIM, W.; CHOI, H.J.; KIM, K.H. Disinfection of wheat grains contaminated with penicillium oxalicum spores by a supercritical carbon dioxide-water cosolvent system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 239-244, 2012.

PEREIRA, C.G.; LEAL, P.F.; SATO, D.N.; MEIRELES, M.A.A. SFE of Pharmacological compounds from *Tabernaemontana catharinensis*: Analysis of the Antioxidant and Antimycobacterial Activities. In: 6TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

SUPERCRITICAL FLUIDS. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, Versailles, 2003, p. 195-200.

PEREIRA, C.G.; MARQUES, M.O.M.; BARRETO, A.S.; SIANI, A.C.; FERNANDES, E.C.; MEIRELES, M.A.M. Extraction of índole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: An evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, p. 51-61, 2004.

PEREIRA, C.G. **Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (*Tabernaemontana atharinensis* A.D.C.), cidrão (*Aloysia triphylla* L'Herit Britton) e manga (*Mangifera indica* L.) por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antioxidante dos extratos**. 2005. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Manufacturing cost of essential oils obtained by supercritical fluid extraction. In: 8th Conference on Supercritical Fluids and their Applications. **Proceedings of 8th Conference on Supercritical Fluids and their Applications**, Ischia, Italy, 2006.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 407-413, 2007.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.3, p. 340-372, 2010.

PERRUT, M. Industrial applications of supercritical fluids: development status and scale-up issues. In: I IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS. **Proceedings of the First Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids**, Foz do Iguaçu, 2007.

PETTIT, G.R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. Isolation and Structure of Palstatin from the Amazon Tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 259-262, 2003.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, ANNE-SYLVIE; LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C.M.G.C.; CHEMAT, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 73-81, 2012.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1994. 320 p.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.

PRADO, J.M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leite fixo**. 2010. 250 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PRADO, J.M.; PRADO, G.H.C.; MEIRELES, M.A.A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 231-237, 2011.

PRADO, J.M.; DALMOLIN, I.; CARARETO, N.D.D.; BASSO, R.C.; MEIRELLES, A.J.A.; OLIVEIRA, J.V.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 249-257, 2012.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009.

PRADO, I.M. **Uso de simulador no estudo de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de extração supercrítica de produtos naturais**. 2009, 117 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Polyphenols and Antioxidant Capacity of Seed Coat and Cotyledon from Brazilian and Peruvian Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 90-98, 2007.

RANILLA, L.G.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Effect of Different Cooking Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Some Selected Brazilian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5734-5742, 2009.

RAO, J.U.M.; HANUMAIAH, T.; RAO, B.K.; RAO, K.V.J. A new flavonol glycoside from the leaves of *Indigofera hirsuta* Linn. **Journal of Indian Chemical Society**, v. 23B, n. 1, 1984.

REIS, S.F.; RAI, D.K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1991-1998, 2012.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 3421-3428, 1997.

RIVIERE, C.; VAN NGUYEN, T.H.; PIETERS, L.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V.; MINH, C.V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfeanus*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 86-94, 2009.

ROMAN-JÚNIOR, W.A.; CARDOSO, M.L.C.; VILEGAS, W.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. 2,3,4,6-Tetra-*O*-(3-nitropropanoyl)-*O*- β -Dglucopyranoside, a new antimicrobial from the roots of *Heteropteris aphrodisiaca*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 543-545, 2005.

RONDEAU, P.; GAMBIER, F.; JOLIBERT, F.; BROSSE, N. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 251-254, 2013.

ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.M. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 235-240, 2005.

ROSS, K.A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S.D. Comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 113, p. 336-344, 2009.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

RUNHA, F.P.; CORDEIRO, D.S.; PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W.P. Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: Development of the Process and Evaluation of Thermal Degradation During the Drying Operation. **Institution of Chemical Engineers**, v. 79, p. 160-168, 2001.

SAAD, H.; CHARRIER-EL BOUHTOURY, F.; PIZZI, A.; RODE, K.; CHARRIER, B.; AYED, N. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 239-246, 2012.

SAJFROTOVÁ, M.; SOVOVÁ, H.; HOPLETAL, L.; BARTIOVÁ, M. Near-critical extraction of β -sitosterol and scopoletin from stinging nettle roots. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, p. 111-118, 2005.

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; BAER, M.G.; MAZZAFERA, P. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SANTOSFLORA. Disponível em <<http://www.santosflora.com.br>>, acesso em outubro 2012.

SANTOS, S.A.O.; VILLAVERDE, J.J.; SILVA, C.M.; NETO, C.P.; SILVESTRE, A.J.D. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globules Labill* bark. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 71- 79, 2012.

SANTOS, O.O.; SANTOS, R.J.C.; SANTOS, M.J.; NETO, E.B; BARRETO, L.P. Fenóis Totais e taninos condensados em orelha de onça em função do solvente. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX 2010. **Anais da X Jornada de ensino, Pesquisa e Extensão**, Recife, 2010.

SANTOS, R.; CARLINI, E.A. Efeitos da *Heteropteris aphrodisiaca* sobre o comportamento sexual de ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. **Anais do Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife, 2000, v. 16, p. 260.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Review - Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1094-1117, 2000.

SARMENTO, L.A.V.; MACHADO, R.A.F.; BOLZAN, A.; SPRICIGO, C.B.; PETRUS, J.C.C. Use of Reverse Osmosis Membranes for the Separation of Lemongrass Essential Oil and Supercritical CO₂. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 285-291, 2004.

SASAKI, K.; MATSUKURA, Y.; SHIJIMA, K.; MIYAKE, M.; FUJIWARA, D.; KONISHI, Y. High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of Jatobá (*Hymenae courbaril*), **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1274-1279, 2009.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCALON, S.P.Q.; VIEIRA, M.C.; LIMA, A.A.; SOUZA, C.M.; MUSSURY, R.M. Tratamentos pré-germinativos e temperaturas de incubação na germinação de cipó-de- São-João [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers] - Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinias**, v. 10, n. 4, p. 37-42, 2008.

SERRA, A.T.; SEABRA, I.J.; BRAGA, M.E.M.; BRONZE, M.R.; DE SOUSA, H.C.; DUARTE, C.M.M. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 184-191, 2010.

SHAHRAM S.; YADOLLAH Y. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 938-976, 2012.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.

SHIRSATH, S.R.; SONAWANE, S.H.; GOGAT, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering Process**, v. 53, p. 10-23, 2012.

SILVA, E.M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 381-387, 2007a.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007b.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, UFRGS, 1999.

SINGLETON, V.L.; RTHOFER, 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.

SIVAKUMAR, V.; VERMA, V.R.; RAO, P.G.; SWAMINATHAN, G. Studies on the use of power ultrasound in solide-liquid myrobalan extraction process. **Journal of Cleaner Production**, v. 15, p. 1813-1818, 2007.

SLOBODAN, S.; PETROVIĆ, J.I.; MILOVANOVIĆ, S.; ŽIŽOVIĆ, I. Comparative analyses of the diffusion coefficients from thyme for different extraction processes, **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 6, p. 799-813, 2012.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; SILVA, M.N.; ARRUDA, M.S.P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and Antioxidant Activity of Several Flavonoids of *Inga Edulis* Leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1276-1280, 2007.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LOIR, A.; REES, J.F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 106, p. 331-339, 2008.

SOVOVÁ, H.; SAJFRTOVÁ, M.; BARTLOVÁ, M.; OPLETAL, L. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. **Journal Supercritical Fluids**, v. 30, p. 213-224, 2004.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 35-55, 2005.

SPIRO, M.; JAGO, D.S. Kinetics and Equilibria of Tea Infusion. **Journal of the Chemical Society. Faraday Transactions I**, v. 78, p. 295-305, 1982.

SPIRO, M. The rate of caffeine infusion from Kenyan Arabica coffee beans. In: 12TH INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE. **Proceedings of the 12th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, Paris, 1988, p. 260-264.

SPIRO, M.; KANDIAH, M. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with acetone. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 24, p. 589-600, 1989.

SPIRO, M.; KANDIAH, M.; PRICE, W. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with dichloromethane, ethanol, 2-propanol and an acetone water mixture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 25, p. 157-167, 1989.

SUNARSO, J.; ISMADJI, S. Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: A review, **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1-20, 2009.

SUPEREXTRA BRASIL. Disponível em <<http://www.superextrabrasil.com.br>>, acesso em abril 2012.

SUTIVISEDSEK, N.; CHENG, H.N.; WILLET, J.L.; LESCH, W.C.; TANGSRUD, R.R.; BISWAS, A. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Research International**, v. 43, p. 516-519, 2010.

SUZUKI, R.; MATSUSHITA, Y.; IMAI, T.; SAKURAI, M.; DE JESUS, J.M.H.; OZAKI, S.K.; FINGER, Z.; FUKUSHIMA, K. Characterization and antioxidant activity of Amazonian. **Journal of Wood Science**, v. 54, p. 174-178, 2008.

TAKEUCHI, T.M.; BRAGA, M.E.; BENEDETTI, B.A.; ORESTES, T.; LEONARDI, V.V.; MEIRELES, M.A. A. Native and Exotic Plants from Brazil: Leaves Oil Extraction by SFE and Hydrodistillation. 8th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications. **Proceedings of 8th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications**, Ischia, Italy, 2006.

TAKEUCHI, T.M.; MEIRELES, M.A.A. Study of bed geometry influence on the kinetics of supercritical fluid extraction of *Achyrocline satureioides*. In: I IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS. **Proceedings of the First Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids**, Foz do Iguaçu, 2007.

TAKEUCHI, T.M. **Extração supercrítica de macela, cravo-da-índia e vetiver: aspectos tecnológicos e econômicos**. 2009, 417 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

TAKEUCHI, T.M.; PEREIRA, C.G.; BRAGA, M.E.M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; LEAL, P.F.; MEIRELES, M.A.A. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave-assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and application**, 1ª ed., 2009, p. 138-218.

TAN, P.W.; TAN, C.P.; HO, C.W. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). **International Food Research Journal**, v. 18, p. 557-562, 2011.

TENG, H.; YAMASAKI, A. Solubility of liquid CO₂ in water at temperatures from 278 K to 293 K and pressures from 6,44 MPa to 29,49 MPa and densities of the corresponding aqueous solutions. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 29, p. 1301-1310, 1997.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R.L. Determination of Major Carotenoid Constituents in Petal Extracts of Eight Selected Flowering Plants in the North of Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2006.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKY, L.; MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 137-142, 2001.

TOUMI, A.; JÜRGENS, C.; JUNGO, C.; MAIER, B.; PAPAVALASILEIOU, V.; PETRIDES, D. Design and Optimization of a Large Scale Biopharmaceutical Facility using Process Simulation and Scheduling Tools. **Pharmaceutical Engineering**, March/April 2010.

TRUGILHO, P.F.; CAIXETA, R.P.; LIMA, J.T.; MENDES, L.M. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **Cerne**, v. 3, n. 1, p.1-13, 1997.

TSUDA, T.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 248-251, 1994.

VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T.J. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 111-117, 2001.

VEDAMARAN, N.; BRUNNER, G.; KANNAN, C.S.; RAMABRANHMAM., B.V.; RAO, P.G. Solubility of *N*-CBZ derivatised amino acids in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, p. 119-125, 2004.

VEGGI, P.C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. 2009, 143 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C.M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R.D.M.C. Análise de Compostos Fenólicos, Metilxantinas, Tanino e Atividade Antioxidante de Resíduo do Processamento da Erva-Mate: Uma Nova Fonte Potencial de Antioxidantes. In: **2nd International Workshop/Advances in Cleaner Production**, São Paulo, Brazil, 2009.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

VIROT, M.; TOMAO, V.; LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C.; CHEMAT, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 6, p. 1066-1074, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer-Berlin, Alemanha, 2001. 384 p.

WEI, S.D.; ZHOU, H.C.; LIN, Y.M.; LIAO, M.M.; CHAI, W.M. Maldi-Tof MS Analysis of Condensed Tannins with Potent Antioxidant Activity from the Leaf, Stem Bark and Root Bark of *Acacia confusa*. **Molecules**, v. 15, p. 4369-4381, 2010.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 4026-4037, 2004.

YANG, H.; ZHONG, C. Modeling of the solubility of aromatic compounds in supercritical carbon dioxide - cosolvent systems using SAFT equation of state. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 99-106, 2005.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *rumex crispus* l. extracts. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

YILMAZ, E.E.; OZVURAL, E.B.; VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 924-928, 2011.

YODA, S.K.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. supercritical fluid extraction from *stevia rebaudiana bertonii* using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted component. **Journal of food Engineering**, v. 57, p. 125-134, 2003.

ZABOT, G.L.; MORAES, M.N.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Botanic Matrices: Experimental Data, Process Parameters and Economic Evaluation. **Recent Patents on Engineering**, v. 6, n. 3, p. 1-25, 2012.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) Oleoresin with CO₂ and Cossolvents: a Study of the Antioxidant Action of the Extracts. **Journal Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.

7. APÊNDICE

7.1. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O LOTE 1 DE JATOBÁ.

Após a etapa de determinação das isotermas de rendimento global (IRG's) para a matéria-prima jatobá (lote 1), foi selecionada a condição de melhor condição de temperatura e pressão (35 MPa e 323 K) de extração. Esta condição foi selecionada juntamente com resultados das análises dos extratos quanto aos polifenóis totais e atividade antioxidante.

Porém, foi observada uma alteração no rendimento da extração durante a etapa de determinação da cinética da extração (OEC) na condição selecionada. O novo rendimento obtido foi praticamente a metade do obtido na IRG na mesma condição. Este comportamento pode ser devido a alterações da planta no período o qual esta estava estocada o que ocasionou uma variabilidade em nível de rendimento e composição química ao longo do estudo.

Desta forma, a fim de evitar qualquer alteração nos experimentos nas etapas posteriores, optamos por obter um novo lote da matéria-prima (lote 2) e novos experimentos foram necessários para realização da otimização do processo (determinação das isotermas de rendimento global ($X_{0,S/F=50}$) e determinação da cinética de extração). Os experimentos realizados com a matéria-prima de lote 2, são os apresentados no corpo da tese. Os tópicos a seguir descrevem os experimentos de IRG e análises realizadas com a matéria-prima de lote 1.

7.1.1. ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL (IRG) PARA O JATOBÁ (LOTE 1)

Após as etapas de análises, identificação e caracterização dos extratos, foi selecionada a casca de jatobá para dar continuidade ao estudo, já que os extratos obtidos com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ apresentaram elevada atividade antioxidante destes extratos. Ainda, estes extratos são ricos em taninos condensados (proantocianidinas), demonstrado ser a classe mais eficaz em atividade antioxidante quando comparado aos flavonoides.

Foram realizados experimentos de rendimento global utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ variando duas temperaturas e três pressões (Figura 7.1). A seleção das condições de

operação foi baseada no poder de solvatação do solvente com a pressão, ou seja, na variação da densidade do solvente com pressão e temperatura.

Pode ser observado que sob pressão de 15 MPa, os rendimentos não apresentaram diferença significativa para 323 K (10,59 %) e 333 K (10,82 %). Quando a pressão foi aumentada para 25 MPa, a recuperação do extrato foi 1,5 % maior quando utilizou-se temperatura de 323 K. Porém, quando a pressão foi aumentada para 35 MPa, houve um aumento significativo na quantidade de extrato recuperado a 323 K. Este comportamento ocorreu devido ao aumento da solubilidade dos solúveis no solvente ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), com o aumento da pressão. Nesta condição, houve uma recuperação de 22,21 % do extrato, enquanto que nas pressões de 15 e 25 MPa esta recuperação foi de 10,59 % e 10,08 % respectivamente, sendo os rendimentos similares. Para a temperatura de 333 K, para as três pressões, não foi possível observar grandes variações. Os rendimentos referentes a essa temperatura foram de 10,82; 8,57 e 10,74 %, respectivamente, para 15, 25 e 35 MPa.

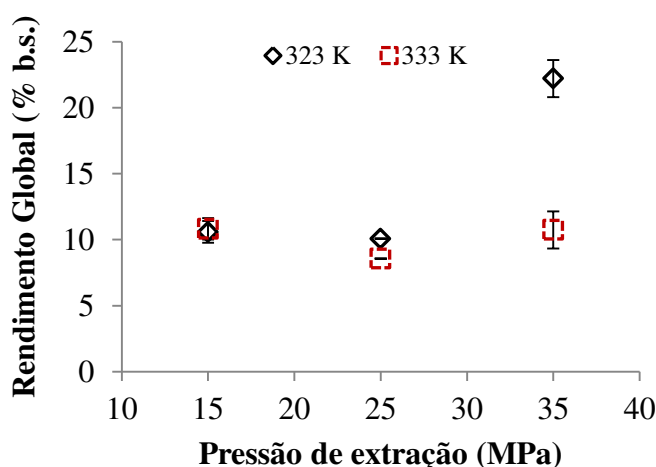


Figura 7.1. Isotermas de rendimento global dos extratos de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

A utilização de alta temperatura pode ter provocado uma perda na recuperação de alguns compostos presentes no extrato. Porém, o efeito da variável pressão foi importante para que se observasse o comportamento da recuperação do extrato com a variação de densidade do CO_2 em água, já que esta aumenta com o aumento da pressão a uma temperatura constante (TENG e YAMASAKI, 1997).

É importante destacar que se comparados os dados experimentais de IRG's obtidos com lotes diferentes de jatobá, lote 1 e lote 2 (Item 4.2.2), pode-se observar que a natureza da matéria-prima influencia no rendimento de extração. A influência da pressão e vazão dependeu da origem da matéria-prima na SFE de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) (FERREIRA et al., 2002), e comportamento similar também foi observado nos estudos de PRADO (2010) e MARTINEZ (2005).

7.1.2. DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS TOTAIS

Os extratos obtidos a partir dos experimentos de rendimento global da casca de jatobá utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ foram analisados quanto à presença de polifenóis totais. Na Figura 7.2 pode ser analisado o comportamento do extrato quanto à presença de polifenóis ao variar pressão (P) e temperatura (T).

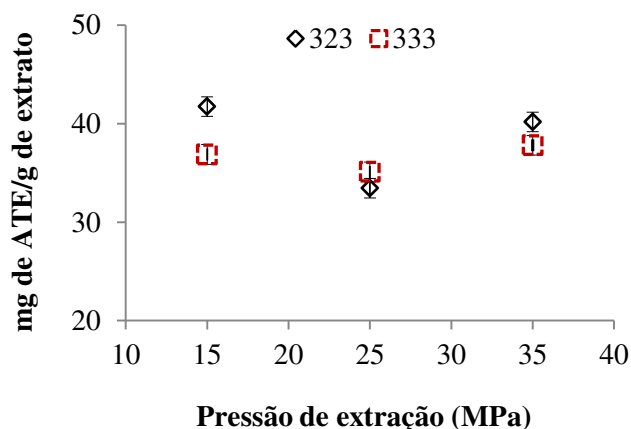


Figura 7.2. Concentração de polifenóis totais nos extratos de jatobá obtidos por SFE com $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ a 323 e 333 K.

Os resultados indicaram que para a temperatura de 333 K, a variação de polifenóis não foi significativa para as três pressões estudadas. Nesta condição, o total de polifenóis obtido para as três pressões foram de 36,87; 35,09 e 37,80 mg de ATE/g de extrato respectivamente para 15, 25 e 35 MPa.

Pode-se observar um maior teor de polifenóis quando se trabalhou a 323 K e pressão de 15 MPa (41,74 mg de ATE/g de extrato) e 35 MPa (40,18 mg de ATE/g de extrato). O menor teor de polifenóis recuperado aconteceu para 323 K e 25 MPa (33,45 mg

de ATE/g de extrato). Pode-se dizer que nas condições de temperatura e pressão utilizadas, não houve grandes variações nos teores de polifenóis analisados.

Como se trata de matéria-prima rica em taninos (proantocianidinas), a temperatura tem grande efeito sobre o processo de extração. Muito embora temperaturas elevadas sejam necessárias para superar as interações solutos-matriz (PALMA e TAYLOR, 1999). Como as cascas de jatobá são ricas em taninos, se pode dizer que o aumento da temperatura foi evidente apenas na condição de 15 MPa, podendo ter ocasionado a degradação de alguns destes compostos.

No estudo realizado por MURGA et al. (2000) foi avaliada a solubilidade de três tipos de fenóis complexos (incluindo taninos) com diferentes massas molares em CO₂ supercrítico utilizando ou não cossolventes. Foi avaliada também a temperatura de extração, quantidade de cossolvente (2, 5, 10 e 15 % v/v) e pressão de operação (20 e 30 MPa). Devido à instabilidade a altas temperaturas dos solutos, e para evitar oxidação e polimerização, a temperatura foi mantida constante, 313 K. Desta forma, sob uma pressão de 20 MPa foi possível obter maior quantidade de fenóis de alta massa molar com 10 % de etanol. Porém, a recuperação dos complexos de sementes de uva concentrada foi maior utilizando 15 % de etanol a 30 MPa.

É importante destacar grande variação da composição química de taninos e fenóis totais entre plantas de gêneros diferentes e entre plantas de mesma espécie, podendo causar diferenças consideráveis nas concentrações em termos de extração.

Comparando os resultados de polifenóis obtidos para os extratos de jatobá do lote 1 e lote 2 (Item 4.2.2.2), é perceptível observar grande diferença nos resultados. Este mesmo comportamento foi observado por PRADO et al. (2009) avaliando os teores de fenóis, atividade antioxidante e taninos de 3 lotes de casca de noz-pecã. Segundo os autores, as frações de taninos condensados mostraram grande diferença entre os lotes, enquanto que os teores de polifenóis não apresentaram diferenças significativas.

7.1.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

Os resultados das atividades antioxidantes dos extratos obtidos pelo método de DPPH expressos em IC₅₀ (mg/cm³) podem ser observados na Figura 7.3.

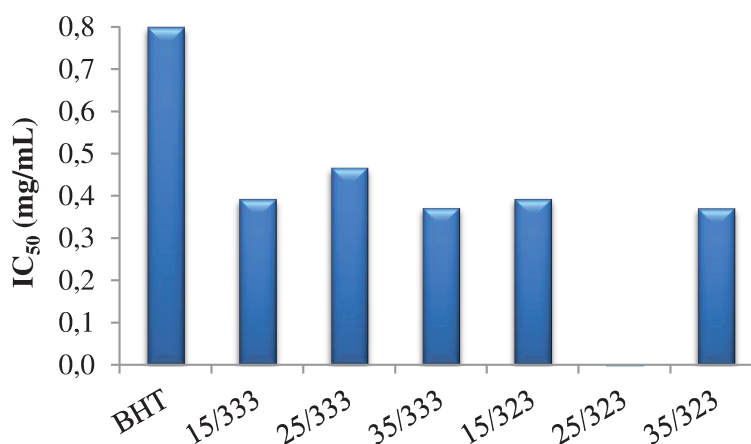


Figura 7.3. Atividade antioxidante (IC₅₀) correspondente as IRG nas diferentes condições de P (MPa) e T (K) dos extratos de jatobá utilizando CO₂ + H₂O.

Considerando que quanto menor o valor do IC₅₀, maior é a atividade antioxidante do extrato, podemos observar que sob pressão de 35 MPa nas duas temperaturas (323 e 333 K) obteve-se um menor IC₅₀ (0,37 mg/cm³) levando a concluir que sob estas condições os extratos apresentam maior atividade antioxidante. O valor de IC₅₀ encontrado sob pressão de 15 MPa nas duas temperaturas (323 e 333 K) também foram similares, 0,39 mg/cm³, levando a concluir que a temperatura pareceu não influenciar na variação da AA dos extratos. A 25 MPa e 323 K obteve-se um comportamento anômalo, não sendo possível a determinação da AA para esta condição, enquanto a 25 MPa e 333 K foi observado um maior IC₅₀. Ainda, estes resultados estão de acordo com os valores de polifenóis totais (seção 7.1.2) obtidos, em que as melhores condições de extração polifenóis foram as que apresentaram maiores valores de AA. Este mesmo comportamento foi observado no estudo de WEI et al. (2010), ocorrendo um aumento na AA de diferentes partes de *Acacia confusa* com o aumento da concentração de polifenóis.

FREGONESI et al. (2009) estudaram a AA dos extratos da casca e das folhas de jatobá obtidos por maceração dinâmica, ultrassom e soxhlet. Maior AA foi encontrada utilizando polietilenoglicol a 70 % (IC₅₀ de 0,89 mg/cm³).

Assim, neste trabalho a AA pode ser atribuída aos taninos (compostos fenólicos). Segundo RIVIERE et al. (2009) os taninos são conhecidos por possuir atividade

antimicrobiana e antioxidante, confirmando o relatado por MAILLARD e BERSET (1995) sob a forte interrelação entre atividade antioxidante de extratos vegetais e compostos fenólicos. De acordo com estudos de HAGERMAN et al. (1998), taninos condensados e hidrolisáveis de alto peso molecular são antioxidantes eficazes com atividade ainda maior do que os compostos fenólicos simples, como exemplo, os monômeros flavonoides. Portanto, o extrato de jatobá obtido por SFE utilizando $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ pode ser utilizado como fonte potencial de novos fármacos devido a sua eficiente capacidade antioxidante.

7.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

7.2.1. RENDIMENTO GLOBAL

Tabela 7.1. Dados dos experimentos de rendimento global do jatobá (lote 1).

| T (K) | P (MPa) | Massa de extrato (g) | Rendimento (%, b.u) | Rendimento (%, b.s) | Média (%, b.s) |
|----------|------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| 323 | 15 | 1,0027 | 10,03 | 11,04 | 10,60 |
| | | 0,9206 | 9,20 | 10,14 | |
| 333 | 15 | 0,9412 | 9,41 | 10,37 | 10,82 |
| | | 1,0234 | 10,23 | 11,27 | |
| 323 | 25 | 0,8444 | 8,44 | 9,30 | 10,09 |
| | | 0,9872 | 9,87 | 10,87 | |
| 333 | 25 | 0,7731 | 7,73 | 8,51 | 8,57 |
| | | 0,7843 | 7,84 | 8,64 | |
| 323 | 35 | 1,9825 | 19,82 | 21,83 | 22,21 |
| | | 2,0502 | 20,50 | 22,58 | |
| 333 | 35 | 1,0294 | 10,29 | 11,34 | 10,75 |
| | | 0,9216 | 9,21 | 10,15 | |

Tabela 7.2. Dados dos experimentos de rendimento global do jatobá (lote 2).

| T (K) | P (MPa) | Massa de extrato (g) | Rendimento (%, b.u) | Rendimento (%, b.s) | Média (%, b.s) |
|----------|------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| 323 | 15 | 1,0264 | 10,26 | 11,44 | 11,50 |
| | | 1,0372 | 10,37 | 11,56 | |
| 333 | 15 | 0,9110 | 9,11 | 10,15 | 9,83 |
| | | 0,8528 | 8,53 | 9,50 | |
| 323 | 25 | 0,7849 | 7,85 | 8,74 | 8,27 |
| | | 0,7000 | 7,00 | 7,80 | |
| 333 | 25 | 0,7583 | 7,58 | 8,42 | 8,01 |
| | | 0,6827 | 6,83 | 7,61 | |
| 323 | 35 | 0,7436 | 7,43 | 8,28 | 7,92 |
| | | 0,6787 | 6,79 | 7,56 | |
| 333 | 35 | 0,8016 | 8,02 | 8,93 | 9,98 |
| | | 0,9910 | 9,92 | 11,04 | |

7.2.2. CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

Tabela 7.3. Dados da cinética 1 e 2: T = 323 K, P = 15 MPa, M = 50 g (b.u), $Q_{CO_2,1} = 1,10 \times 10^{-4}$ kg/s e $Q_{CO_2,2} = 1,12 \times 10^{-4}$ kg/s.

| Tempo (min) | S/F_1 (b.s) | Massa de extrato_1 (g) | Rendimento_1 (% , b.s) | S/F_2 (b.s) | Massa de extrato_2 (g) | Rendimento_2 (% , b.s) |
|-------------|-------------|------------------------|------------------------|-------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 0,00 | 0,0000 | 0,00 | 0,00 | 0,0000 | 0,00 |
| 20 | 2,26 | 0,3039 | 0,68 | 3,84 | 0,3244 | 0,72 |
| 40 | 4,85 | 1,3342 | 2,98 | 6,21 | 1,3414 | 2,99 |
| 60 | 7,35 | 1,9503 | 4,35 | 8,82 | 1,9771 | 4,41 |
| 80 | 9,91 | 2,4443 | 5,46 | 11,19 | 2,4949 | 5,57 |
| 100 | 12,47 | 2,8632 | 6,39 | 13,86 | 2,9427 | 6,57 |
| 120 | 15,00 | 3,2185 | 7,18 | 16,54 | 3,3208 | 7,41 |
| 150 | 18,91 | 3,7042 | 8,27 | 20,44 | 3,8174 | 8,52 |
| 180 | 23,19 | 4,1346 | 9,23 | 24,49 | 4,2830 | 9,56 |
| 210 | 27,06 | 4,5663 | 10,19 | 28,46 | 4,7309 | 10,56 |
| 270 | 35,22 | 5,8319 | 13,02 | 36,68 | 6,2086 | 13,86 |
| 330 | 42,97 | 6,6965 | 14,95 | 43,73 | 7,0750 | 15,79 |
| 390 | 51,16 | 7,3108 | 16,32 | 52,55 | 7,6820 | 17,15 |
| 450 | 59,35 | 7,8718 | 17,57 | 60,23 | 8,2005 | 18,30 |

7.2.3. ESCALA PILOTO

Tabela 7.4. Dados do experimento 1 e 2: T = 323 K, P = 15 MPa, M = 1346 g (b.u), $Q_{CO_2} = 3,33 \times 10^{-3}$ kg/s e $Q_{H_2O} = 3,33 \times 10^{-4}$ kg/s.

| Tempo (min) | S/F (b.s) | Rendimento acumulado (% , b.s) | | | Rendimento total (% , b.s) |
|-------------|-----------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| | | S1 | S2 | S3 | |
| Cin. 1 | | | | | |
| 40 | 6,51 | $3,05 \times 10^{-4}$ | $7,43 \times 10^{-6}$ | $6,69 \times 10^{-5}$ | $3,79 \times 10^{-4}$ |
| 80 | 12,47 | 6,81 | $1,75 \times 10^{-3}$ | $3,71 \times 10^{-5}$ | 6,82 |
| 110 | 17,00 | 3,84 | $2,20 \times 10^{-2}$ | $5,94 \times 10^{-5}$ | 3,86 |
| 140 | 21,56 | 2,03 | $3,93 \times 10^{-2}$ | $4,09 \times 10^{-4}$ | 2,07 |
| Cin. 2 | | | | | |
| 40 | 6,38 | $2,85 \times 10^{-4}$ | $6,92 \times 10^{-6}$ | $7,12 \times 10^{-5}$ | $3,63 \times 10^{-4}$ |
| 80 | 12,58 | 6,36 | $2,05 \times 10^{-3}$ | $3,01 \times 10^{-5}$ | 6,36 |
| 110 | 17,22 | 4,05 | $2,60 \times 10^{-2}$ | $6,50 \times 10^{-5}$ | 4,07 |
| 140 | 21,30 | 2,38 | $4,30 \times 10^{-2}$ | $4,48 \times 10^{-4}$ | 2,43 |

7.2.4. ESPECTROS DOS EXTRATOS DA CASCA DO JATOBÁ OBTIDOS NA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

O mesmo perfil de composição foi obtido nos tempos restantes da cinética de extração (C5: 100 min a C13: 450 min) e nos extratos obtidos nos experimentos de rendimento global (IRG's).

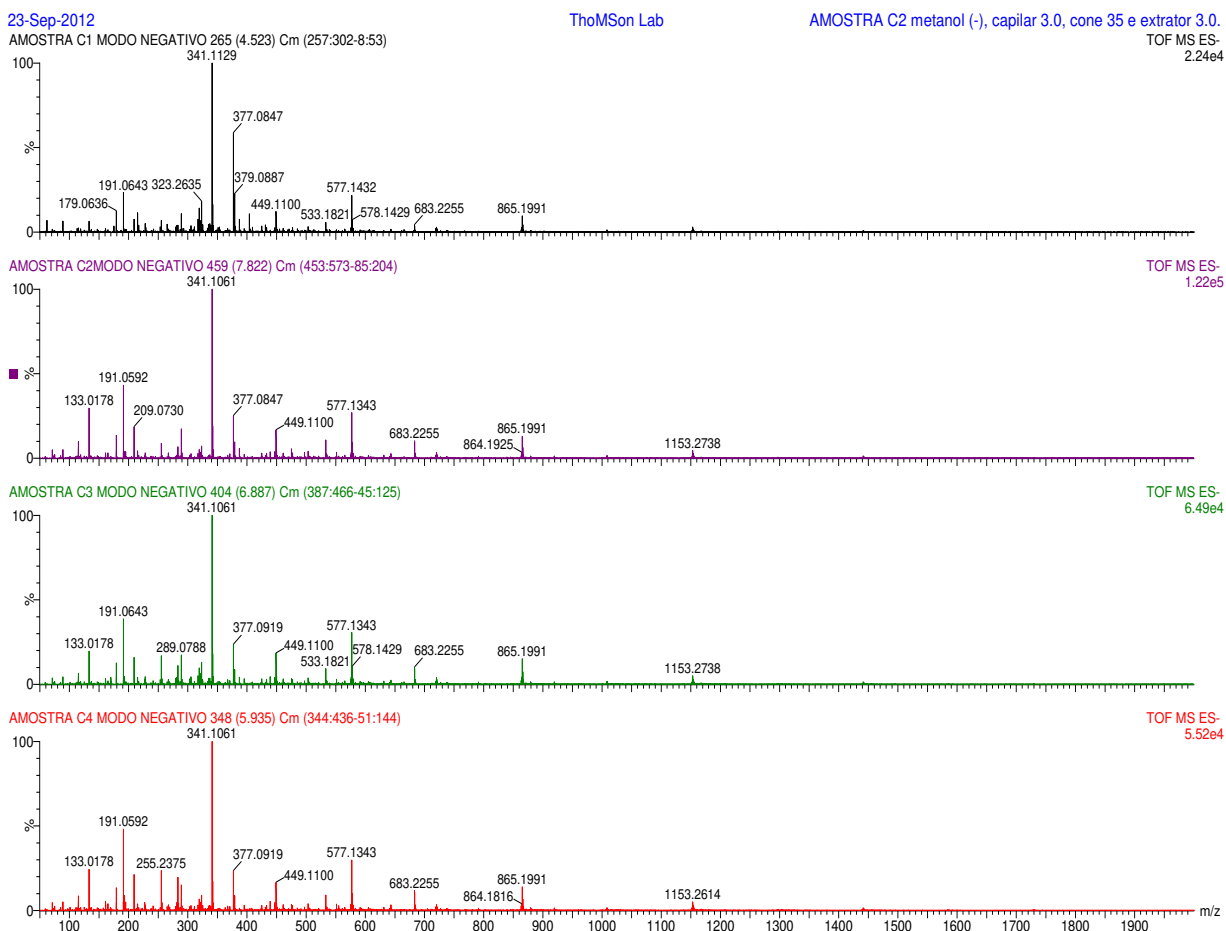


Figura 7.4. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos da casca de jatobá na cinética de extração (C1: 20 min; C2: 40 min; C3: 60 min; C4: 80 min) a 323 K e 15 MPa na unidade SFE Ii.

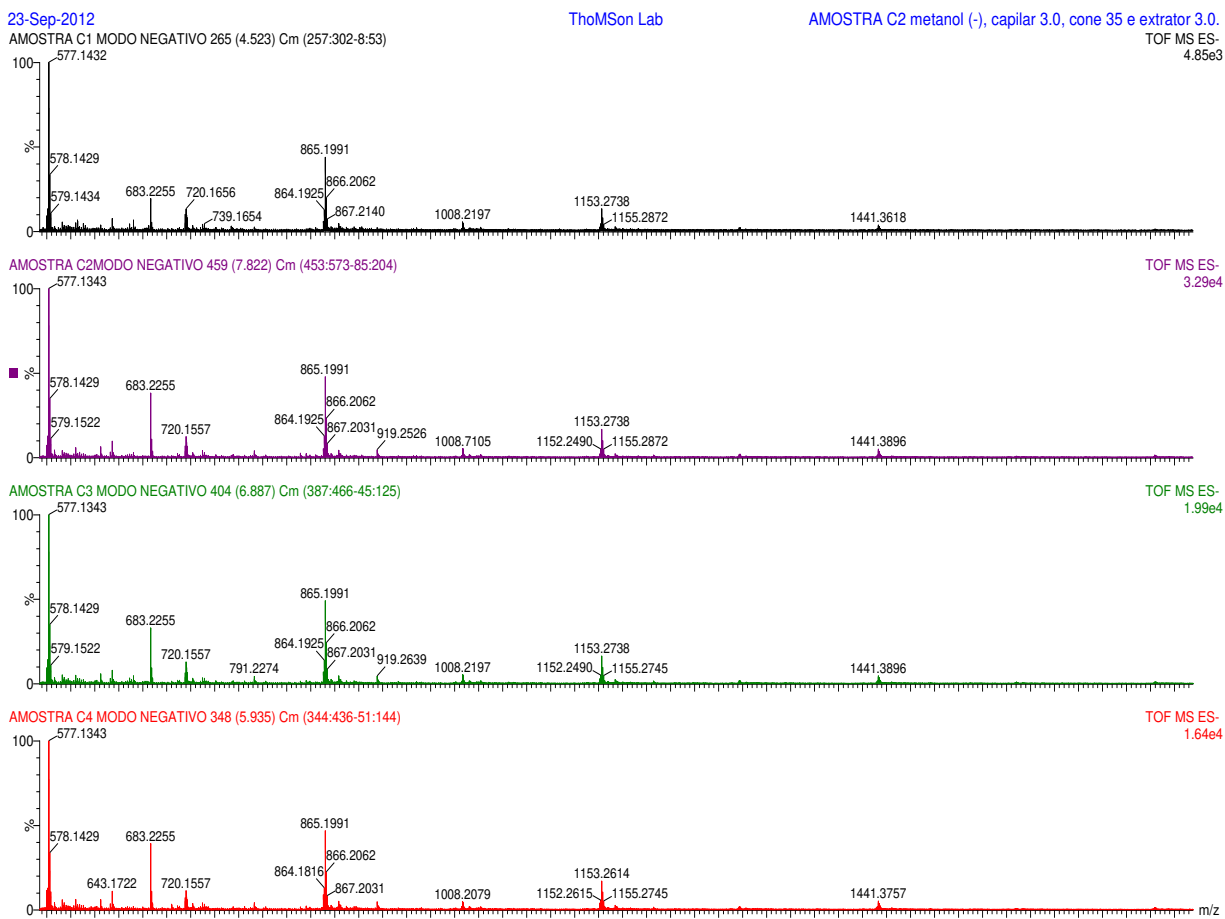


Figura 7.5. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos da casca de jatobá na cinética de extração (C1: 20 min; C2: 40 min; C3: 60 min; C4: 80 min) a 323 K e 15 MPa na unidade SFE li.

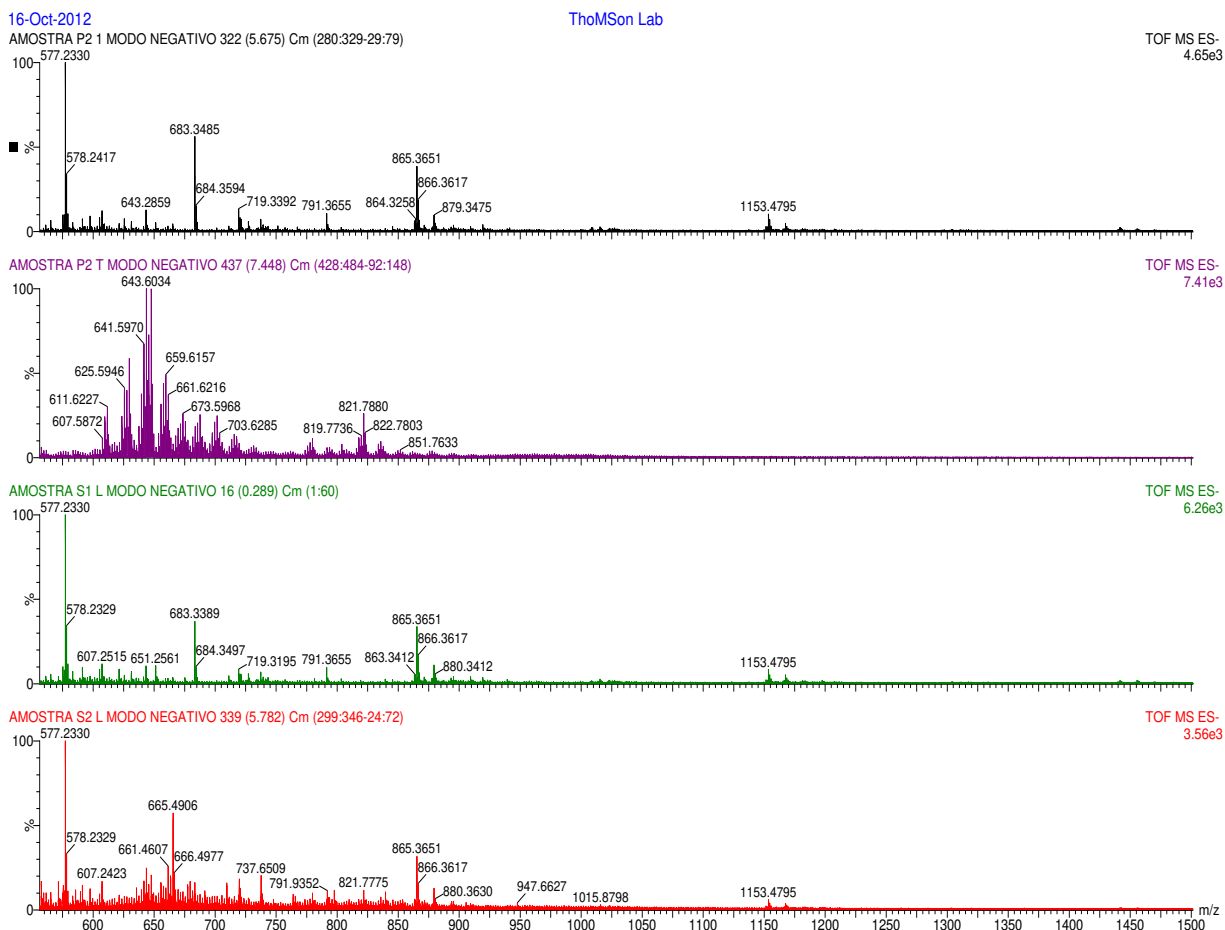


Figura 7.7. Cromatograma obtidos na análise por IES-MS dos extratos da casca de jatobá em escala piloto a 323 K e 15 MPa.

7.3. EXEMPLO DE ROTINA DE PROGRAMAÇÃO UTILIZADA NO SAS SYSTEM 8.02 PARA AJUSTE DE TRÊS RETAS.

Ajuste linear

```
Options ls=80 ps=50;
Title 'JB a 50°C e 150 bar, cin.1 - 3 retas';
```

```
data OEC1;
input tmin rend;
AL1 = max (tmin-90,0);
AL2 = max (tmin-200,0);
```

```
Cards;
```

| | |
|-----|-------------|
| 20 | 0.678348214 |
| 40 | 2.978125000 |
| 60 | 4.353348214 |
| 80 | 5.456026786 |
| 100 | 6.391071429 |
| 120 | 7.184151786 |
| 150 | 8.268303571 |
| 180 | 9.229017857 |
| 210 | 11.19263393 |
| 270 | 13.01763393 |
| 330 | 14.94754464 |
| 390 | 16.31875000 |
| 450 | 17.57098214 |
| 20 | 0.724107143 |
| 40 | 2.994196429 |
| 60 | 4.413169643 |
| 80 | 5.568973214 |
| 100 | 6.568526786 |
| 120 | 7.412500000 |
| 150 | 8.520982143 |
| 180 | 9.560267857 |
| 210 | 10.56004464 |
| 270 | 13.85848214 |
| 330 | 15.79241071 |
| 390 | 17.14732143 |
| 450 | 18.30468750 |

```
Proc Reg;
```

```
Model rend = tmin AL1 AL2;
```

```
Output out = a p=rendi r=Mrend;
```

```
Proc print;
```

```
Axis1 order = (0 to 20 by 0.3);
```

```
Proc gplot; Plot Mrend * rendi;
```

```
Proc gplot;
```

```
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```

Ajuste não linear

```
options ls=120 ps=70;
Title 'JB a 50°C e 150 bar, cin.1 - 3 retas';
```

```
data OEC1;
```

```
input tmin rend;
```

```
AL1 = max (tmin-90,0);
```

```
AL2 = max (tmin-200,0);
```

```
Cards;
```

| | |
|-----|-------------|
| 20 | 0.678348214 |
| 40 | 2.978125000 |
| 60 | 4.353348214 |
| 80 | 5.456026786 |
| 100 | 6.391071429 |
| 120 | 7.184151786 |
| 150 | 8.268303571 |
| 180 | 9.229017857 |
| 210 | 11.19263393 |
| 270 | 13.01763393 |
| 330 | 14.94754464 |
| 390 | 16.31875000 |
| 450 | 17.57098214 |
| 20 | 0.724107143 |
| 40 | 2.994196429 |
| 60 | 4.413169643 |
| 80 | 5.568973214 |
| 100 | 6.568526786 |
| 120 | 7.412500000 |
| 150 | 8.520982143 |
| 180 | 9.560267857 |
| 210 | 10.56004464 |
| 270 | 13.85848214 |
| 330 | 15.79241071 |
| 390 | 17.14732143 |
| 450 | 18.30468750 |

```
Proc Nlin;
```

```
parms
```

```
b0 = -0.28079
```

```
b1 = 0.07166
```

```
b2 = -0.03036
```

```
b3 = -0.01018
```

```
knot1 = 90
```

```
knot2 = 200;
AL1 = max(tmin-knot1,0);
AL2 = max(tmin-knot2,0);
Model rend = b0 + b1*tmin + b2*AL1 + b3*AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Axis order = (0 to 20 by 0.3);
Proc print;
Proc gplot;
Plot Mrend*rendi;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```


7.3. ATIVIDADES ACADÊMICAS

7.3.1. PUBLICAÇÕES DURANTE O DOUTORADO

7.3.1.1. ARTIGOS

- SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 23-31, 2010.
- HATAMI, T.; RAHIMI, M.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Mathematical Modeling of near-critical carbon dioxide extraction of khoa (*Satureja boliviana* Benth Briq) using ethanol as a co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids** v. 55, p. 929-936, 2011.
- VEGGI, P.C.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Anthocyanin extraction from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science** v. 1, p. 1725-1731, 2011.
- VEGGI, P.C.; CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Modifier effects on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of some Brazilian plants: Antioxidant activity and Economical evaluation. **Procedia Food Science** v. 1, p. 1717-1724, 2011.
- CAVALCANTI, R.N.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. **Procedia Food Science** v. 1, p. 1672-1678, 2011.
- SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering** v. 108, p. 444-452, 2012.
- PRADO, J.M.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Extraction Methods for Obtaining Carotenoids from Vegetables. "Supercritical Fluid Technology in Analytical Chemistry" of the Journal "**Current Analytical Chemistry**". **Aceito para publicação.**

- VEGGI, P.C.; FABIANO-TAXIER, ANNE-SYLVIE.; LE BOURVELLEC, C.; MEIRELES, M.A.A. CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from jatobá (*Hymenaea courbaril* L.var *stilbocarpa*) bark. **Submetido para publicação.**
- PRADO, J.M.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of lemon verbena (*Aloysia triphylla*): process kinetics and scale-up, extract chemical composition and antioxidant activity and economic evaluation. **Submetido para publicação.**

7.3.1.2. CAPÍTULOS DE LIVRO

- PRADO, J.M.; VEGGI, P.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Propriedades Térmicas de Alimentos e Propriedades Termodinâmicas da água. In: M. M. Angela A. Meireles e Camila G. Pereira (Eds) (2012, in press). **Fundamentos de Engenharia de Alimentos**, vol. 6. Editora Atheneu.
- VEGGI, P.C.; MARTINEZ, J.; MEIRELES, M.A.A. Fundamentals of microwave extraction. In: Farid Chemat (Ed.) (2013, in press). **Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice**. Springer.

7.3.1.3. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

- VEGGI, P.C.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of antioxidant from some Brazilian plants. In: 12TH EUROPEAN MEETING ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2010, Nancy. **Proceedings of the 12th European Meeting on Supercritical Fluids**, Nancy, 2010.
- VEGGI, P.C.; PRADO, J.M.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical technology applied to obtain bioactive compounds from biological matrices: LASEFI's 25 years of research. In: II IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2010, Natal. **Proceedings of Conference on Supercritical Fluids**, Natal, 2010.
- VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Economical Evaluation of Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) extract obtained via Supercritical Technology

and Low Pressure Solvent Extraction. In: II IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2010, Natal. **Proceedings of Conference on Supercritical Fluids**, Natal, 2010.

- CAVALCANTI, R.N.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Flavonoids and phenolic compounds recovery from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) residue by supercritical technology with modifier. In: 6TH INTERNATIONAL CIGR TECHNICAL SYMPOSIUM. TOWARDS A SUSTAINABLE FOOD CHAIN, 2011, Nantes. **Proceedings of 6th International CIGR**, Nantes, 2011.
- VEGGI, P.C.; CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Obtaining of Flavonoids and Phenolic Compounds of some Brazilian plants using Supercritical Fluid Extraction (SFE) and co-solvent. In: 6TH INTERNATIONAL CIGR TECHNICAL SYMPOSIUM. TOWARDS A SUSTAINABLE FOOD CHAIN, 2011, Nantes. **Proceedings of 6th International CIGR**, Nantes, 2011.
- VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Extracting Tannins from Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.var stilbocarpa) Using Supercritical Carbon Dioxide and Water as Modifier. In: 10TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2012, San Francisco. **Proceedings of 10th International Symposium on Supercritical Fluids**, San Francisco, 2012.
- VEGGI, P.C.; PRADO, J.M.; MEIRELES, M.A.A. Cost of manufacturing of vegetable extracts obtained by supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction: assisted or not by ultrasound. In: 10TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2012, San Francisco. **Proceedings of 10th International Symposium on Supercritical Fluids**, San Francisco, 2012.

7.3.1.4. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

- SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Avaliação Técnico-Econômica da Extração de Antocianinas por Percolação em Leito Fixo. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS - ENEMP, 2009, Campinas. **Anais do Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados**, Campinas, 2009, p. 306-306.

- VEGGI, P.C.; PRADO, J.M.; MEIRELES, M.A.A. Production of bioactive compounds by supercritical fluid technology: LASEFI's 25 years of research. In: 15TH WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY - IUFOST, 2010, Cape Town. **Proceedings of 15th World Congress of Food Science and Technology**, Cape Town, 2010.

7.3.2. PALESTRA MINISTRADA

- Aplicação da Tecnologia Supercrítica na Extração de Compostos Bioativos - XVI Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos da UFRRJ, 16 setembro de 2010.

7.3.3. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS E CURSOS

- 10th International Symposium on Supercritical Fluids - ISSF. San Francisco, EUA, 2012.
- 11th International Congress on Engineering and Food - ICEF. Atenas, Grécia, 2011.
- 6th International CIGR Technical Symposium: Food Process, Bioprocessing and Food - CIGR. Nantes, França, 2011.
- Summer School in High Energy Processing Ultrasound & Microwave technologies - Universidade de Avignon, França, 2011.
- II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids - PROSCIBA. Natal, Brasil, 2010.
- XXXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP. Campinas, Brasil, 2009.
- Cromatografia por fluido supercrítico SFC/SFE. São Paulo, Brasil, 2010.
- IV Rodada tecnológica - Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Produtos Cosméticos. São Paulo, 2008.