



JULIA TEIXEIRA DE PAULA

**“Obtenção de extratos de folhas de *Arrabidaea chica*
(Humb. Bonpl.) Verlot por extração fracionada em leito
fixo a alta pressão usando dióxido de carbono
supercrítico, etanol e água como solventes”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIA TEIXEIRA DE PAULA

**“Obtenção de extratos de folhas de *Arrabidaea chica*
(Humb. Bonpl.) Verlot por extração fracionada em leito
fixo a alta pressão usando dióxido de carbono
supercrítico, etanol e água como solventes”**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Co-Orientadora: Dra. Losiane Cristina Paviani

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

DEFENDIDA PELA ALUNA JULIA TEIXEIRA DE PAULA

E ORIENTADA PELA PROF.DR.FERNANDO ANTONIO CABRAL

Assinatura do Orientador

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P281o Paula, Julia Teixeira de
Obtenção de extratos de folhas de *Arrabidaea chica*
(Humb. Bonpl.) Verlot por extração fracionada em leito fixo
a alta pressão usando dióxido de carbono supercrítico,
etanol e água como solventes / Julia Teixeira de Paula. --
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Fernando Antonio Cabral.
Coorientador: Losiane Cristina Paviani.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Arrabidaea chica*. 2. 3-desoxiantocianidina. 3.
Extração supercrítica. I. Cabral, Fernando Antonio
Cabral. II. Paviani, Losiane Cristina. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Obtaining extracts leaves of *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.)
Verlot by fractional extraction fixed bed high pressure using supercritical
carbon dioxide, ethanol and water as solvents

Palavras-chave em Inglês:

Arrabidaea chica

3-deoxyanthocyanidin

Supercritical extraction

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Fernando Antonio Cabral

Julian Martínez

Mary Ann Foglio

Data da defesa: 08-03-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
Orientador

Prof. Dr. Julian Martínez
Membro Titular
FEA - UNICAMP

Dra. Mary Ann Foglio
Membro Titular
CPQBA - UNICAMP

Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Membro Suplente
FEA - UNICAMP

Prof. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira
Membro Suplente
FZEA - USP

Aos meus pais, **Juarez e Maria**,
pelo apoio e incentivo para a
realização deste trabalho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral, por toda orientação, ensinamentos, atenção e confiança depositada em mim e no meu trabalho;

A Dra. Losiane Cristina Paviani, pela co-orientação, paciência e pela imensa colaboração na realização das análises deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Julian Martínez, Dra. Mary Ann Foglio, Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante e Prof. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira, suas correções e sugestões foram de grande valia para redação final deste trabalho;

Ao CPQBA, em nome da Dra Mary Ann Foglio, pela doação da matéria-prima e da química Ilza Maria de Oliveira Sousa pela realização das análises cromatográficas e pelos inúmeros artigos sugeridos;

As amigas: Ana Carolina, Vivian, Ana Gabriela e Telma pela amizade e pelos bons momentos;

Aos colegas do ExTrAE, pelo auxílio e companhia;

Aos meus irmãos, Thiago e Mariana pelo amor e constante apoio;

Ao Renato, pelo carinho e compreensão;

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro;

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autora: Julia Teixeira de Paula

Título: Obtenção de extratos de folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot por extração fracionada em leito fixo a alta pressão usando dióxido de carbono supercrítico, etanol e água como solventes.

Orientador: Prof. Dr. Fernando A. Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

Co-orientadora: Dra. Losiane Cristina Paviani – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

RESUMO

Extratos de folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot foram obtidos usando dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), etanol e água como solventes. Dois tipos de extração sequencial em leito fixo foram realizados: o primeiro tipo em três etapas, usando o scCO₂ na primeira etapa, o etanol na segunda e a água na terceira, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C e pressões de 300 bar e 400 bar; o segundo tipo em duas etapas, usando o dióxido de carbono supercrítico em uma primeira etapa, seguida de uma segunda extração com uma mistura de scCO₂/etanol/água em diferentes proporções, a 40 °C e 300 bar. Para comparação, foram realizadas algumas extrações convencionais: uma extração convencional etanólica a temperatura ambiente, uma extração convencional hidroalcoólica com uma mistura de etanol, água 70:30 (v:v) a temperatura ambiente, uma extração hidroalcoólica com uma mistura de etanol, água 70:30 (v:v) a 40 °C e 300 bar e três extrações aquosas convencionais (40 °C, 50 °C e 80 °C). Todos os extratos foram caracterizados quanto ao rendimento global, às respectivas cinéticas de extração, conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais, carajurina e luteolina. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi empregada na determinação

quantitativa de dois compostos selecionados: 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium (carajurina) e luteolina, além do monitoramento qualitativo dos outros dois pigmentos presentes na *A. chica*: pigmento (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium. Nos processos de extração em leito fixo em três etapas, o rendimento total acumulado das três etapas, nas quatro condições operacionais de temperatura e pressão, variaram entre 22 % e 27 %, sendo o maior rendimento global alcançado na condição de 50 °C e 300 bar. O maior teor de compostos fenólicos totais (178,2 mg EAG/g extrato) e flavonoides totais (373,2 mg EC/ g extrato) foi obtido pelo processo realizado com a mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % de etanol e 0 % de água. Os extratos etanólicos apresentaram maior teor de carajurina e a maior concentração de luteolina foi obtida no extrato convencional hidroalcoólico com uma mistura de etanol, água 70:30 (v:v). Na extração com scCO₂ puro, obteve-se o menor rendimento de extração e foi seletiva para extrair carajurina.

Palavras chave: *Arrabidaea chica*; carajurina; luteolina; extração supercrítica.

MASTER DEGREE THESIS

Author: Julia Teixeira de Paula

Title: Obtaining extracts leaves of *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot by fractional extraction fixed bed high pressure using supercritical carbon dioxide, ethanol and water as solvents.

Advisor: Prof. Dr. Fernando A. Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

Co-advisor: Dra. Losiane Cristina Paviani – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

ABSTRACT

Extracts from *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot leaves were obtained using supercritical carbon dioxide (scCO₂), ethanol and water as solvents. Two types of sequential extraction were carried out in a fixed bed: the first type in three stages, using scCO₂ in the first step, the ethanol in the second step and water in the third step at temperatures of 40 °C and 50 °C and pressures of 300 bar and 400 bar; the second type in two steps, using supercritical carbon dioxide in a first step, followed by a second extraction with a mixture of scCO₂/ethanol/water in different proportions, at 40 °C and 300 bar. For comparison, some conventional extractions were performed: an ethanolic extract conventional at room temperature, a conventional hydroalcoholic extraction with a mixture of ethanol, water 70:30 (v: v) at room temperature, a hydroalcoholic extraction with a mixture of ethanol, water 70:30 (v: v) at 40 °C and 300 bar and three extractions conventional aqueous (40 °C, 50 °C and 80 °C). All extracts were analyzed for global yield, the respective kinetics of extraction, total phenolic compounds, total flavonoid, anthocyanins monomeric total, carajurin and luteolin. The high performance liquid chromatography (HPLC) was used for quantitative determination of two selected compounds: 6,7-dihydroxy-5, 4'-dimethoxy flavilium (carajurina) and luteolin,

besides for monitoring qualitatively the other two pigments present in *A. chica*: pigment (1) 6,7,3', 4'-tetrahydroxy-5-methoxy flavilium and pigment (2) 6,7,4' - trihydroxy-5-methoxy flavilium. In the three stages extraction processes in fixed bed, the global yield of the three steps accumulated in the four operational conditions of temperature and pressure ranged between 22 % and 27 %, with the highest overall efficiency achieved in the condition of 50 °C and 300 bar. The highest content of total phenolic compounds (178.2 mg GAE / g extract) and total flavonoid (373.2 mg CE / g extract) was obtained by the process performed with the mixture scCO₂ 80.8 %, 19.2 % ethanol and 0 % water. The ethanol extracts showed a high level of carajurin and the highest concentration of luteolin was obtained in conventional hydroalcoholic with a mixture of ethanol, water 70:30 (v: v). In pure scCO₂ extraction, the lowest extraction yield was achieved and it selective to extract carajurin.

Keywords: *Arrabidaea chica*; carajurin; luteolin; supercritical extraction.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot.....	6
3.2. Compostos Fenólicos	8
3.2.1. Flavonoides.....	9
3.2.1.1. Antocianinas	11
3.3. Extração com Fluidos Supercríticos.....	14
3.3.1. Fluidos Supercríticos.....	14
3.3.1.1. Processos de Extração Sequencial com Fluido Supercrítico.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Matérias-Primas e Reagentes.....	20
4.2. Caracterização das Matérias-Primas	21
4.2.1. Teor Total de Voláteis e Umidade	21
4.2.2. Diâmetro Médio das Partículas	22
4.2.3. Densidade Real do Material Triturado (das Partículas)	23
4.2.4. Densidade Aparente do Leito de Partículas	23
4.2.5. Porosidade	23
4.3. Tipos de Extratos e Sistema Experimental.....	24
4.3.1. Tipos de Extratos Obtidos em Extrator em Leito Fixo.....	24
4.3.1.1. Extração Convencional Etanólica	30
4.3.1.2. Extração Convencional Hidroalcoólica.....	30

4.3.1.3.	Extração Convencional Aquosa	31
4.3.2.	Curvas de extração	32
4.3.3.	Determinação do Rendimento Global de Extração (X_0)	34
4.4.	Métodos Analíticos	34
4.4.1.	Compostos Fenólicos Totais	34
4.4.2.	Flavonoides Totais	35
4.4.3.	Quantificação de Antocianinas pelo Método do pH diferencial	36
4.4.4.	Análise qualitativa e quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 37	
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1.	Caracterização da Matéria-Prima.....	40
5.2.	Cinética de Extração.....	41
5.2.1.	Extração Sequencial em Leito Fixo em Três Etapas	41
5.2.2.	Extração Sequencial em Leito Fixo em Duas Etapas	47
5.3.	Rendimento de Extração	50
5.4.	Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais	58
5.5.	Quantificação de Antocianinas pelo Método do pH Diferencial	64
5.6.	Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	65
6.	CONCLUSÕES GERAIS	74
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	77
	ANEXOS.....	87
	ANEXO A – Caracterização da Matéria-Prima	89
	ANEXO B – Curva de Calibração para Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais.....	91
	ANEXO C – Dados Experimentais Obtidos nas Extrações da Amostra de <i>A. chica</i>	93

ANEXO D – Curvas de calibração de luteolina e carajurina utilizadas na análise por CLAE	111
ANEXO E – Cromatogramas dos Extratos de <i>Arrabidaea chica</i> obtidos por CLAE – 470nm.....	112
ANEXO F – Cromatogramas dos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> obtidos por CLAE – 350nm.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Exemplar de <i>A. chica</i> cultivada no campo experimental do CPQBA.	6
Figura 3.2 – Agliconas isoladas das folhas de <i>A. chica</i>	7
Figura 3.3 – Estrutura geral dos flavonoides.....	10
Figura 3.4 – Estrutura do cátion flavílium.....	12
Figura 3.5. Antocianinas comumente encontradas na natureza (A) comparado com as 3-desoxiantocianidinas encontradas na <i>A. chica</i> (B).	13
Figura 3.6 – Diagrama de fases Pressão- temperatura de uma substância pura.	15
Figura 3.7 Curva global de extração apresentando as três regiões distintas.	17
Figura 4.1 Amostra de <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. Bonpl.) Verlot seca e triturada.....	20
Figura 4.2 – Esquema da unidade experimental de extração.	25
Figura 4.3 – Esquema do processo de extração sequencial em leito fixo em três etapas.	27
Figura 4.4 –Esquema do processo de extração sequencial em leito fixo em duas etapas, sendo a segunda etapa constituída de uma mistura.	29
Figura 5.1 (a) Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra <i>A. chica</i> . (b) Cinética de extração a 40 °C e 400 bar de amostra de <i>A. chica</i>	42
Figura 5.2 (c) Cinética de extração a 50 °C e 300 bar de amostra <i>A. chica</i> . (d) Cinética de extração a 50 °C e 400 bar de amostra de <i>A. chica</i>	43
Figura 5.3 Cinética de extração nas quatro condições de operação utilizando como solvente o scCO ₂	45
Figura 5.4 Cinética de extração a 40°C e 300 bar de amostra <i>A. chica</i> em duas etapas. segunda etapa: 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água.....	48
Figura 5.5 Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra <i>A. chica</i> em duas etapas: segunda etapa: 79,6 % CO ₂ , 14,3 % etanol, 6,1 % água.....	49
Figura 5.6 Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra <i>A. chica</i> em duas etapas. segunda etapa: 78,4 % scCO ₂ , 10,8 % etanol, 10,8 % água.	49
Figura 5.7 Valores médios dos rendimentos obtidos na extração sequencial em leito fixo em três etapas da amostra de <i>A. chica</i> . As barras representam valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).	51
Figura 5.8 Valores médios dos rendimentos obtidos na extração sequencial em leito fixo em duas etapas da amostra de <i>A. chica</i> a 40 °C e 300 bar, com extração prévia com scCO ₂ na primeira etapa, uma mistura em diferentes proporções de scCO ₂ , etanol e água na segunda etapa seguido de extração aquosa convencional do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica). As barras	

representam valor da média \pm DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).....	54
Figura 5.9 Cinética de extração convencional hidroalcoólica 70:30 (v:v) acidificada com ácido cítrico 0,3 % a 40 °C e 300 bar na unidade de extração em leito fixo.....	55
Figura 5.10 Valores médios dos rendimentos obtidos nas extrações convencionais de amostra de <i>A. chica</i> . As barras representam valor da média \pm DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).....	58
Figura 5.11 Teor de compostos fenólicos totais para os diferentes extratos obtidos em leito fixo (em duas ou três etapas), com os respectivos extratos aquosos convencionais e os extratos convencionais. As barras representam os valores médio dos ensaios, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).	60
Figura 5.12 Teor de flavonoídes totais para os diferentes extratos obtidos em leito fixo (em duas ou três etapas), com os respectivos extratos aquosos convencionais e os extratos convencionais. As barras representam os valores médio dos ensaios, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).	62
Figura 5.13 Soluções em diferentes valores de pH, utilizados para análise de pH diferencial nos extratos de <i>Arrabidaea chica</i> (a) mistura 80,8% de scCO ₂ , 19,2 % etanol e 0 % água, (b) extrato convencional aquoso 50 °C.....	64
Figura 5.14 Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).....	67
Figura 5.15 Cromatograma do extrato 2º etapa: mistura 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol, 6,1% água (EM7) a 40 °C e 300 bar de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	67
Figura 5.16 Cromatograma dos extratos de <i>A. chica</i> a 40 °C e 300 bar em três etapas (a) scCO ₂ (C43) (b) etanol (E43) (c) aquoso residual (A43). Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	68
Figura 5.17 Estrutura molecular (a) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium (b) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium, (c) carajurina	71
Figura 5.18 Concentração de carajurina nos diferentes extratos obtidos de <i>A. chica</i>	72
Figura 5.19 Estrutura molecular da luteolina.....	72
Figura 5.20 Concentração de luteolina nos diferentes extratos obtidos de <i>A. chica</i>	73

Figura B. 1. Curva de calibração de ácido gálico	91
Figura B. 2. Curva de calibração de catequina	92
Figura D.1. Curva de calibração de luteolina.....	111
Figura D.2. Curva de calibração de carajurina.	111
Figura E.1.: Cromatograma do extrato 1ªetapa: scCO ₂ a 40 °C e 300 bar (C43) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	112
Figura E.2.: Cromatograma do extrato 2ªetapa: etanol a 40 °C e 300 bar (E43) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	112
Figura E.3.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 40 °C e 300 bar (A43) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	113
Figura E.4.: Cromatograma do extrato 1ªetapa: scCO ₂ a 40 °C e 400 bar (C44) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	113
Figura E.5.: Cromatograma do extrato 2ªetapa: etanol a 40 °C e 400 (E44) bar de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	114
Figura E.6.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 40 °C e 400 bar (A44) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	114
Figura E.7.: Cromatograma do extrato 1ªetapa: scCO ₂ a 50 °C e 300 bar (C53) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	115
Figura E.8.: Cromatograma do extrato 2ªetapa: etanol a 50 °C e 300 bar (E53) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	115
Figura E.9.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 50 °C e 300 bar (A53) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	116

Figura E.10.: Cromatograma do extrato 1ªetapa: scCO₂ a 50 °C e 400 bar (C54) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).116

Figura E.11.: Cromatograma do extrato 2ªetapa: etanol a 50 °C e 400 bar (E54) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).117

Figura E.12.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 50 °C e 400 bar (A54) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).117

Figura E.13.: Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).....118

Figura E.14.: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água (AM1) 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).....118

Figura E.15.: Cromatograma do extrato 2ª etapa: mistura 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1% água (EM7) a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).119

Figura E.16.: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1% água (AM7) a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min.....119

Figura E.17.: Cromatograma do extrato convencional etanólico (EC1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).....120

Figura E.18.: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) (EC7) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).120

Figura E.19.: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) em extrator em leito fixo a 40 °C e 300 bar (ECE7) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, λ=470 nm, fluxo 0,5 mL/min.

Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	121
Figura E.20.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 40 °C (A40) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	121
Figura E.21.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 50 °C (A50) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	122
Figura E.22.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 80 °C (A80) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).	122
Figura F.1: Cromatograma do extrato 2° etapa: etanol á 40 °C e 300 bar (E43) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR = 16,431).	123
Figura F.2: Cromatograma do extrato 2° etapa: etanol á 40 °C e 400 bar (E44) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,405).	123
Figura F.3: Cromatograma do extrato 2° etapa: etanol á 50 °C e 300 bar (E53) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,385).	124
Figura F.4: Cromatograma do extrato 2° etapa: etanol á 50 °C e 400 bar (E54) de <i>A.chica</i> , Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,377).	124
Figura F.5: Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,437).	125
Figura F.6: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 80,8% scCo ₂ , 19,2 % etanol e 0% água (AM1) 40 °C e 300 bar de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,427).	125
Figura F.7: Cromatograma do extrato 2° etapa: mistura 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol, 6,1 % água a 40 °C e 300 bar de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,419).	126
Figura F.8: Cromatograma do extrato convencional etanólico (EC1) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,371).	126
Figura F.9: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) (EC7) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,418).	127
Figura F.10: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) em extrator em leito fixo a 40 °C e 300 bar (ECE7) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,371).	127

Figura F.11: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 40 °C (A40) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,385).	128
Figura F.12: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 50 °C (A50) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,382).	128
Figura F.13: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 80 °C (A80) de <i>A.chica</i> . Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,471).	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 Propriedades físicas associados a diferentes estados das substâncias	16
Tabela 4.1 Condições experimentais, volume de CO ₂ e tempo utilizados para construção das cinéticas.....	33
Tabela 4.2 Condições experimentais e volume de CO ₂ utilizado para construção das cinéticas de misturas.....	33
Tabela 5.1 Caracterização da matéria-prima.....	40
Tabela 5.2 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos de amostra de <i>A. chica</i> obtidos por meio da extração sequencial em leito fixo em três etapas.....	50
Tabela 5.3 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos de amostra de <i>A. chica</i> obtidos em duas etapas da amostra de <i>A. chica</i> a 40 °C e 300 bar, com extração prévia com scCO ₂ na primeira etapa, uma mistura em diferentes proporções de scCO ₂ , etanol e água na segunda etapa, seguido de extração aquosa convencional do resíduo 2.	53
Tabela 5.4 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos convencionais da amostra de <i>A. chica</i>	57
Tabela 5. 5 Picos e tempos de retenção dos marcadores utilizados	66
Tabela 5.6 Concentração e rendimento de extração da carajurina e luteolina presentes no extratos de <i>A. chica</i>	70
Tabela A.1. Valores de Voláteis + Umidade determinados pelo método gravimétrico das amostras de <i>A. chica</i>	89
Tabela A. 2. Teor de água determinado pelo método de <i>Karl Fischer</i> para amostra de <i>A. chica</i>	89
Tabela A.3 Dados para cálculo do diâmetro médio das partículas das folhas da <i>A. chica</i>	90
Tabela A. 4 Densidade aparente das folhas secas, trituradas e peneiradas da <i>A. chica</i>	90
Tabela B. 1. Valores de absorvância para determinação da curva de calibração de ácido gálico ..	91
Tabela B. 2. Valores de absorvância para determinação da curva de calibração de catequina.....	92
Tabela C.1 Corrida 1: Cinética de extração 40 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	93
Tabela C.2. Corrida 2: Extração a 40 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	94
Tabela C.3. Corrida 3: Extração a 40 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	95
Tabela C.4. Corrida 4: Cinética de extração a 40 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	95
Tabela C.5. Corrida 5: Extração a 40 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	97
Tabela C.6. Corrida 6: Extração a 40 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	97
Tabela C.7. Corrida 7: Cinética de extração a 50 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	98
Tabela C.8. . Corrida 8: Extração a 50 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	100

Tabela C.9. Corrida 9: Extração a 50 °C e 300 bar da amostra <i>A. chica</i>	100
Tabela C.10. Corrida 10: Cinética de extração a 50 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	100
Tabela C.11. Corrida 11: Extração a 50 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	102
Tabela C.12. Corrida 12: Extração a 50 °C e 400 bar da amostra <i>A. chica</i>	102
Tabela C.13. Corrida 13: Cinética de extração 40°C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água.	102
Tabela C.14. Corrida 14: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água.	103
Tabela C.15. Corrida 15: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água.....	103
Tabela C.16. Corrida 16: Cinética de extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol e 6,1 % água.....	104
Tabela C.17. Corrida 17: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol e 6,1% água.....	104
Tabela C.18. Corrida 18: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol e 6,1 % água.....	105
Tabela C.19. Corrida 19: Cinética de extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 78,4 % scCO ₂ , 10,8 % etanol e 10,8 % água.....	105
Tabela C.20. Dados experimentais das extrações convencionais aquosa obtidos a partir dos resíduos 2.....	106
Tabela C.21. Dados experimentais da extração convencional etanólica.	107
Tabela C.22. Dados experimentais da extração convencional hidroalcoólica, 70:30 (v/v).	107
Tabela C.23. Dados experimentais obtidos na cinética referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3%, nas condições experimentais de 40 °C e 300 bar em extrator de leite fixo.	108
Tabela C.24. Dados experimentais referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3%, nas condições experimentais de 40°C e 300 bar em extrator de leite fixo (1° repetição).....	109
Tabela C.25. Dados experimentais referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3 %, nas condições experimentais de 40 °C e 300 bar em extrator de leite fixo (2° repetição).....	109
Tabela C.26. Dados experimentais da extração convencional aquosa acidificada a 40 °C.....	109
Tabela C.27. Dados experimentais da extração convencional aquosa a 50 °C.....	110
Tabela C. 28. Dados experimentais da extração convencional aquosa acidificada a 80 °C.....	110
Tabela D.1. Valores de concentração para determinação da curva de calibração de luteolina.....	111
Tabela D.2. Valores de concentração para determinação da curva de calibração de carajurina ..	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. – Absorbância (nm)

AM - Concentração de Antocianinas Monoméricas (g/L)

b.s. - Base seca

C – Concentração (mg/ g de extrato)

CER - *Constant Extraction Rate* (Taxa constante de extração)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DC - *Diffusion Controlled* (Taxa de difusão controlada)

d_{mg} - Diâmetro médio geométrico das partículas sólidas

EA – Extrato Aquoso

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

EA-PESC – Extrato Aquoso Produto da Extração Supercrítica

EC – Equivalente de Catequina

EE-PESC – Extrato Etanólico Produto da Extração Supercrítica

EFS - Extração com Fluidos Supercríticos

EM-PESC - Extrato constituído de Mistura Produto da Extração Supercrítica

ESC – Extrato Supercrítico

FD – Fator de Diluição

FER - *Falling Extraction Rate* (Taxa decrescente de extração)

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

HPLC - *High performance liquid chromatography* (CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência)

MM -. Massa molar (g/mol)

OEC - *Overall Extraction Curves* (Curva Global de Extração)

R – Rendimento de componente, (mg/ g de matéria-prima)

scCO₂ - Dióxido de Carbono Supercrítico

S/F – Razão Mássica entre Solvente e Alimentação (massa de solvente utilizada na extração/ massa inicial de matéria-prima)

SFE -Supercritical Fluid Extraction (Extração com fluidos Supercríticos)

SUS – Sistema Único de Saúde

tr - Tempo de retenção (min)

U - Teor de Umidade (%)

VU - Teor de Voláteis + Umidade (%)

X_o – Rendimento Global de Extração, descontando o ácido cítrico adicionado

Y_o - Rendimento Total de Extração, considerando a massa de ácido cítrico adicionada

LISTA DE SÍMBOLOS

ε - Porosidade do leito de partículas

\mathcal{E} - coeficiente de absorvidade molar

λ - comprimento de onda (nm)

ρ – densidade (g/mL)

ρ_a - Densidade aparente (g/mL)

ρ_r - Densidade real (g/mL)

P_c - Pressão crítica (bar ou Pa)

T_c - Temperatura crítica (° C ou K)

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a crescente preocupação com a saúde humana e com o meio ambiente faz com que a indústria de alimentos necessite substituir aditivos sintéticos por aditivos extraídos de fontes naturais. Além disso, é crescente a necessidade de empregar processos alternativos de extração, pois muitos processos convencionais empregam solventes orgânicos nocivos à saúde e ao meio ambiente, produzindo extratos que podem conter traços de solventes indesejáveis e resíduos que podem agredir o meio ambiente. Isto tem demandado, no setor produtivo e no meio acadêmico, a busca de novas fontes para extrair substâncias naturais e novas propostas de processos alternativos que atendam a essa demanda. A extração supercrítica com dióxido de carbono é uma tecnologia bem conhecida como alternativa para se produzir extratos naturais, é um processo limpo, que não gera resíduos tóxicos e apresenta a possibilidade de aproveitamento de subprodutos de processos industriais. O CO₂ é atóxico, de baixo custo e tem sido uma das opções de destaque para extrair substâncias naturais com diversas atividades funcionais a partir de matrizes de origem vegetal ou animal.

Dentre as substâncias naturais de grande interesse estão os corantes, como os carotenoides, porfirínicos e as antocianinas. As antocianinas são compostos fenólicos que se encontram largamente distribuídas na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e das tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MALACRIDA & MOTTA, 2005). Além de colorir os alimentos, estas substâncias possuem valor nutricional e ação antioxidante. Antocianinas são pigmentos polares que são tradicionalmente extraídos por métodos convencionais, tais como extração sólido-líquido, usando solventes aquosos, metanólicos e etanólicos levemente acidificados. Dióxido de carbono pode ser usado em combinação com

etanol e água para extrair componentes polares, tais como antocianinas (SEABRA et al., 2010).

Tradicionalmente os corantes são extraídos com solventes orgânicos apresentando problemas bem conhecidos de seletividade e poluição. Além dos corantes, as matrizes naturais e/ou os extratos podem conter outros componentes com atividade biológica de interesse, como exemplo, compostos de natureza fenólica, que sabidamente possuem atividade antioxidante. A atividade antioxidante é muito estudada em vista de sua importância na prevenção de doenças degenerativas, porque estas substâncias sequestram radicais livres (MANACH et al., 2004).

A *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot, popularmente conhecida como crajirú é uma planta da família Bignoniaceae, largamente encontrada na América do Sul, sendo comum na Amazônia (VON POSER et al., 2000). As propriedades tintoriais desta planta são devidas a três pigmentos majoritários antociânicos do tipo 3-desoxiantocianidinas: pigmento (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium, pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (3) 6,7-dihidroxi-5,4'- dimetoxi flavilium, conhecido popularmente por carajurina, que é o principal pigmento (ZORN et al., 2001).

Segundo Barroso et al., (2010), a *Arrabidaea chica* é uma das 71 plantas medicinais que poderão ser utilizadas como medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e até o ano de 2012 foram depositadas pouco mais de 20 patentes, o que identifica oportunidades para o desenvolvimento em pesquisas para esta espécie.

O uso de co-solventes na extração supercrítica (quantidades de solventes orgânicos combinados com dióxido de carbono supercrítico) tem sido empregado para melhorar a eficiência de extração e modificar a seletividade do solvente. O uso de co-solventes pode mudar algumas características da mistura CO₂ + co-solvente, tais como polaridade e interações específicas com o soluto, formando

pontes de hidrogênio ou interagindo com sítios ativos da matriz sólida (DALMOLIN, 2010).

Diante do exposto pretende-se neste trabalho, obter extratos usando o dióxido de carbono supercrítico em uma primeira etapa, o etanol e a água ou uma mistura de scCO₂/etanol/água em uma segunda etapa e analisar diferenças de rendimentos de extração, de composição e de concentração dos extratos e com isso poder analisar a viabilidade de se fazer extrações combinadas com água, etanol e dióxido de carbono supercrítico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Obter extratos de folhas de *Arrabidaea chica* usando o CO₂ supercrítico puro como solvente em uma primeira etapa e o etanol e a água a alta pressão como solventes em outras duas etapas subsequentes ou ainda usar a mistura scCO₂/etanol/água em diferentes proporções em uma segunda etapa. Avaliar a composição dos extratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar uma amostra de folhas de *Arrabidaea chica* quanto à umidade e granulometria.
- Obter extratos fracionados usando CO₂ supercrítico puro em uma primeira etapa, seguida de etanol em uma segunda etapa e água em uma terceira etapa, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C e pressões de 300 e 400 bar.
- Obter extratos fracionados usando CO₂ supercrítico puro em uma primeira etapa e scCO₂/etanol/água em diferentes proporções em uma segunda etapa.
- Avaliar a cinética das curvas de extração, plotando rendimento de extração em função de S/F (massa de solvente / massa de matéria-prima).
- Obter extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos por métodos convencionais.
- Empregar cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar o teor da antocianina carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium) e da flavona luteolina além de monitorar as outras duas antocianinas majoritárias:

[pigmento (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium].

- Caracterizar todos os extratos quanto aos teores de carajurina, luteolina, compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, flavonoides totais pelo método desenvolvido por Zhishen e antocianinas pelo método do pH diferencial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Figura 3.1), é uma liana lenhosa, conhecida popularmente como puca-panga, coapiranga, carapiranga, carajuru, carajeru, crejer, pariri (no Pará), crajirú (no Amazonas), chica ou cipó-cruz e ocorre na América tropical desde o sul do México até o Brasil central. Pertence à família Bignoniaceae, que compreende 120 gêneros com cerca de 800 espécies (VON-POSER, 2000).



Figura 3.1 – Exemplar de *A.chica* cultivada no campo experimental do CPQBA.

Fonte: Taffarello, 2008.

Chapman et al. (1927) relataram pela primeira vez o pigmento 3-desoxiantocianidina (carajurina) extraído de folhas, acreditando-se que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita à

Arrabidaea chica (SCOGIN 1980). Estudos posteriores relataram a ocorrência de antocianinas, fito-esteróis, 7-4'-di-hidroxi-5-metoxiflavona, 6, 7, 3', 4'-tetra-hidroxi-5- metoxiflavona (carajuruflavona) (TAKEMURA et al., 1995). Devia et al. em 2002, relataram o isolamento de duas 3-desoxiantocianidina, 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e 6,7,4' - trihidroxi-5-metoxi flavilium.

No nordeste do Brasil, a *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (CORRÊA, 1926; CHAPMAN *et al*, 1927; ZORN *et al*, 2001). Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataque de insetos. São atribuídos à espécie *A. chica* capacidade antioxidante, anti-ulcerogênica (JORGE, 2008), propriedades adstringentes, contra cólica intestinal, diarréia com sangue, piodermites, corrimento vaginal (TERAN, 1997 citado por KALIL FILHO et al., 2000) e na recuperação de tendões (ARO et al., 2012). Há ainda relatos de eficácia como anti-inflamatório e contra câncer de boca, de útero e leucemia (KALIL FILHO et al., 2000).

As antocianinas mais comuns identificadas na *A. chica*, são do tipo 3-desoxiantocianidinas (Figura 3.2), 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (1), a 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi-flavilium (2) e a 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (3) (carajurina).

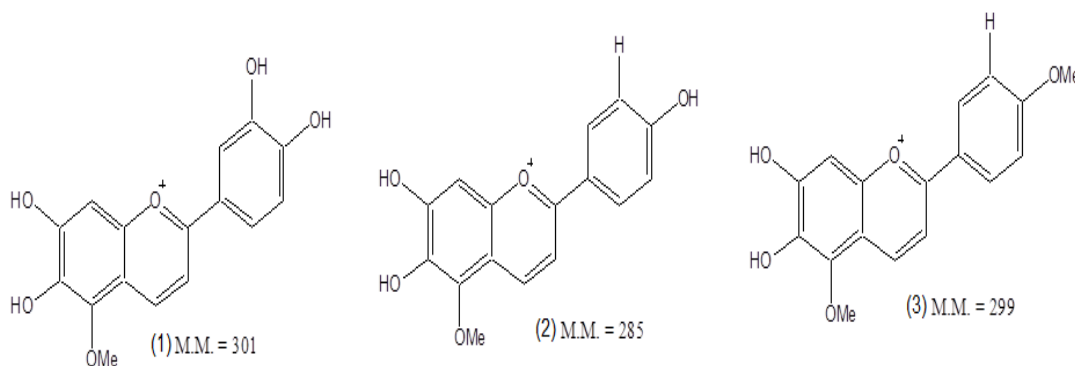


Figura 3.2 – Agliconas isoladas das folhas de *A. chica* .

Fonte : Taffarello, 2008.

Taffarello (2008) demonstrou que o tratamento enzimático em folhas de *Arrabidaea chica* previamente à extração favoreceu a obtenção de extratos enriquecidos em antocianidinas, enquanto que os extratos obtidos sem tratamento enzimático apresentaram maior teor de antocianosídeos, o que evidencia que xilanase promove a hidrólise enzimática liberando as agliconas.

3.2. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI, 1995). Em relação a sua estrutura química, podem ser classificados em duas classes: não flavonoides (estilbenos, ácidos fenólicos e álcoois fenólicos) e flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonóides e antocianidinas) (LEE et al, 2013; BURNS et al, 2001).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que frequentemente são sintetizados pelas plantas. Encontram-se amplamente distribuídos nos vegetais exercendo variadas funções como: na proteção das plantas contra raios UV, atrativo para polinização e de agentes patógenos (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Propriedades fisiológicas, tais como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora são atribuídas aos compostos fenólicos, mas seu principal efeito está relacionado à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM et al., 2006). Por sua vez, a capacidade antioxidante destes compostos está diretamente relacionada à sua estrutura química, a qual pode estabilizar radicais livres. Esses participam de processos degenerativos celulares que provocam a aterosclerose, câncer e outras doenças (MAMEDE & PASTORE, 2004).

Nos alimentos, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela qualidade nutricional e características sensoriais tais como adstringência, amargor

e aroma, além da estabilidade oxidativa dos produtos derivados de vegetais (BRAVO, 1998). Frutas e bebidas, como chá e vinho tinto, constituem a principal fonte de compostos fenólicos (MANACH et al., 2004).

Dentre os compostos fenólicos existentes destacam-se os flavonoides que englobam um numeroso grupo de pigmentos naturais e possuem atividade antioxidante que estão ligados a redução do risco de doenças crônicas graves (BARROS et al., 2011). São responsáveis pelas cores amarelo e tons de azul, vermelho de numerosas flores, frutos e folhas (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

3.2.1. Flavonoides

Os flavonoides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais e são os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, podendo estar presentes em outras partes das plantas. Possuem uma estrutura química constituída de dois anéis aromáticos que são ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que formam um heterociclo oxigenado, chamado de anel C (Figura 3.3). O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C classificam os flavonoides e, dentro destas classes, o padrão de substituição nos anéis A e B definem especificamente cada composto (BRAVO, 1998; MANACH et al., 2004). Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (HOLLMAN & KATAN, 1999).

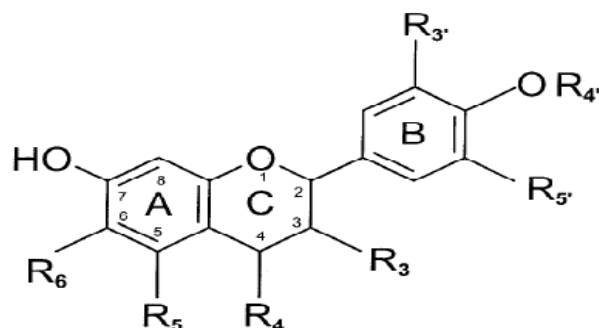


Figura 3.3– Estrutura geral dos flavonoides.

Fonte: Beecher, 2003.

Segundo Cao et al. (2013), já foram identificados mais de 10000 estruturas da família dos flavonoides. Esse grande número de compostos surge da ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica dos flavonoides (Beecher 2003).

Podem ser encontrados em diferentes tipos de vegetais: as antocianidinas e suas formas glicosiladas, as antocianinas, em flores, folhas, caules e frutos; flavonas em ervas aromáticas e grãos de cereais; as flavanonas são encontradas predominantemente em frutas cítricas; as isoflavonas são encontradas principalmente em legumes, incluindo grãos de soja, feijão preto e grão de bico (PIETTA, 2000). Os flavonóis estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas. A quercetina é o principal representante da classe (PETERSON & DWYER, 1998).

3.2.1.1. Antocianinas

O termo antocianina é de origem grega (anthos, flores e kyanos, azul escuro). São o maior e mais importante grupo de pigmentos solúveis em água presente na natureza e contribuem para as cores atrativas de frutas, legumes e flores, sendo responsáveis pelas colorações vermelho, laranja, roxo, violeta e azul (KERIO et al., 2012)

As antocianinas são um corante natural de crescente interesse devido as suas diversas propriedades, que vão além da coloração atrativa, como atividade antioxidante, a qual desempenha uma grande relação na prevenção de doenças cardiovasculares e neuronais, diabetes e câncer (KONCZAK & ZHANG, 2004). Por esta razão, as indústrias de alimentos e medicinais estão cada vez mais interessadas em utilizar fontes naturais com conteúdos elevados de antocianinas para fabricação de suplementos com finalidades nutricionais e terapêuticas (LEE & CHOUNG, 2011).

Em alimentos industrializados, as antocianinas são empregadas como corantes naturais, entretanto, sua utilização ainda é restrita em vista da sua relativa instabilidade e fácil degradação, onde sua cor é altamente afetada pelo pH, temperatura, presença de oxigênio, luz, enzimas e outras substâncias tais como açúcares, ácido ascórbico, íons metálicos, sulfatos entre outros, condições bastante comuns durante o processamento e estocagem dos alimentos (FALCÃO et al., 2003; MARKAKIS, 1982, FRANCIS, 1989). Nos últimos anos, a maioria das investigações sobre antocianinas estão focadas na solução dos problemas como baixa estabilidade, baixo rendimento de extração, bem como na purificação e identificação de antocianinas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As antocianinas são muito solúveis em água, sendo extraídas com facilidade a partir do uso de água, metanol e etanol. Com o intuito de prevenir a oxidação destes pigmentos, a extração é realizada em meio ácido (LEE & HONG, 1992).

Soluções de antocianinas apresentam coloração vermelha intensa em valores de pH abaixo de 3,0 que tende a desaparecer entre pH 4,0 e 5,0. Próximo de pH neutro ou alcalino, as antocianinas apresentam coloração azulada e com o tempo, tornam-se amareladas (OLIVEIRA, 2001).

Sabe-se que as antocianinas são termicamente estáveis até 60 °C (TERCI, 2004; ALASALVAR et al., 2005), por essa razão a temperatura de extração deve ser cuidadosamente controlada.

A estrutura geral das antocianinas é derivada do cátion flavílium (Figura 3.4). A antocianina após a perda de um açúcar por hidrólise ácida é chamada de antocianidina ou aglicona (OLIVEIRA, 2001).

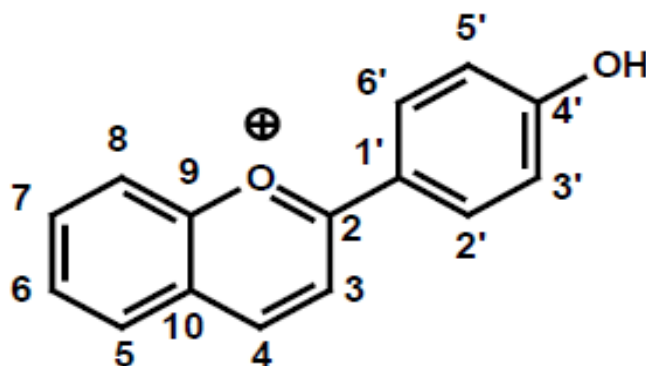


Figura 3.4 – Estrutura do cátion flavílium.

A cianidina é uma antocianidina encontrada na maioria das plantas. Outras antocianidinas encontradas, em ordem decrescente de prevalência na natureza incluem a pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina (KONG et al., 2003). Na *Arrabidaea chica* são encontrados três pigmentos antociânicos majoritários do tipo 3-desoxiantocianidinas: pigmento (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium, pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (3) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium que é o pigmento principal (Figura 3.5). A falta do

grupo hidroxílico na posição C-3 as torna mais estáveis em soluções ácidas do que as antocianinas encontradas na maioria das plantas (MAZZA & BROULLIARD, 1987 citado por AWIKA et al., 2004).

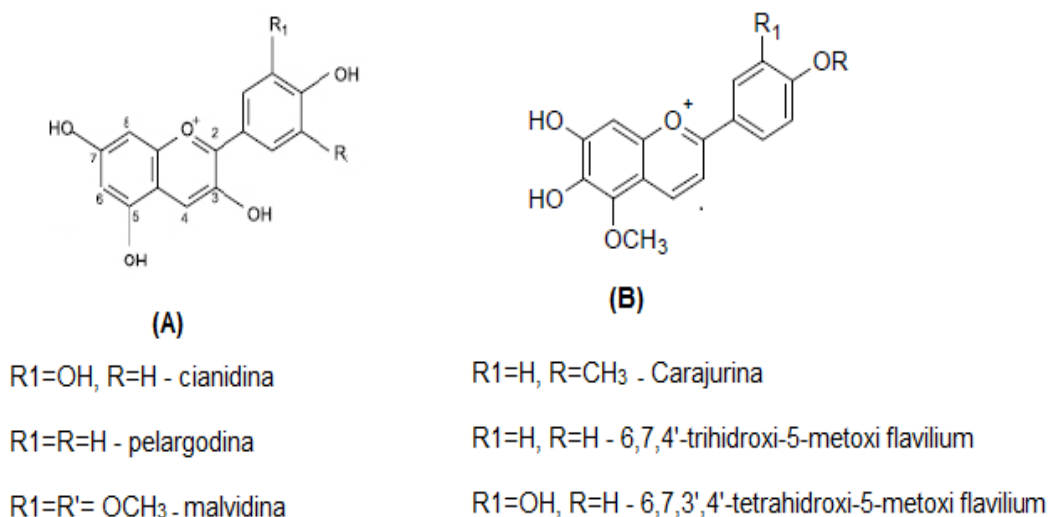


Figura 3.5. Antocianinas comumente encontradas na natureza (A) comparado com as 3-desoxiantocianidinas encontradas na *A. chica* (B).

Antocianinas são solúveis em solventes polares, e são normalmente extraídos de materiais vegetais usando metanol com pequena quantidade de ácido clorídrico ou ácido fórmico (KONG et al., 2003).. No entanto como o ácido clorídrico e fórmico são corrosivos e o metanol é tóxico para o ser humano, os pesquisadores que trabalham com alimentos preferem utilizar outros sistemas de extração (LOPES et al., 2007). Portanto, busca-se a utilização de ácidos mais fracos, como o ácido cítrico bem como a utilização de solventes como etanol, CO₂ e água para não gerar resíduos tóxicos à saúde.

3.3. Extração com Fluidos Supercríticos

Atualmente, a crescente preocupação com a saúde humana e com o meio ambiente gera uma necessidade de se empregar processos alternativos de extração, visto que muitos métodos convencionais de extração empregam solventes orgânicos nocivos, produzindo extratos que podem conter traços de solvente indesejáveis e resíduos que podem agredir o meio ambiente.

A extração supercrítica é uma tecnologia alternativa de extração e tem sido empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado a partir de matrizes vegetal e animal, especialmente para os setores de alimentos e de cosméticos (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2011; PAVIANI et al., 2010).

No processo de extração supercrítica em matrizes sólidas, o fluido supercrítico escoar através do leito fixo de partículas sólidas, sendo que o fluido é absorvido pela matriz sólida, fazendo com que a estrutura celular dilate e a resistência ao transporte diminua. Em paralelo, os componentes solúveis são dissolvidos pelo solvente e transportados para superfície do sólido. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo precipitador, onde finalmente os componentes são separados (BRUNNER, 1994).

3.3.1. Fluidos Supercríticos

Uma substância pura se torna um fluido supercrítico quando sua temperatura e pressão são maiores que os valores de suas propriedades críticas, T_c e P_c , respectivamente (BRUNNER, 1994). A temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido a um líquido pelo aumento de pressão, dessa forma, a pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento da temperatura. Sendo assim, acima do ponto crítico, variações de pressão e de

temperatura não modificam a fase do fluido (RIZVI et al., 1986). A Figura 3.6 apresenta o diagrama de fases de uma substância pura. A região crítica tem sua origem no ponto crítico, e acima desta temperatura (T_c) e pressão (P_c) críticas, a substância é considerada fluido supercrítico.

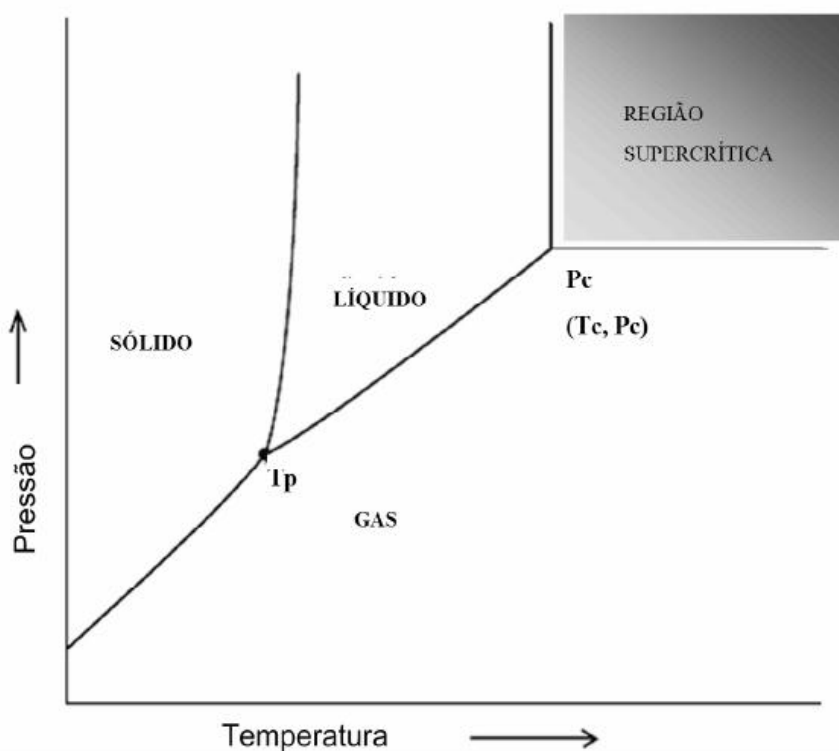


Figura 3.6 – Diagrama de fases Pressão- temperatura de uma substância pura.
Adaptado de Brunner, 1994.

As propriedades do fluido supercrítico de maior importância para a extração são a densidade, a viscosidade e o coeficiente de difusividade, os quais tomam valores que se aproximam dos valores dos líquidos, no caso da densidade e que se aproximam dos gases, no caso da viscosidade e do coeficiente de difusão (Tabela 3.1). Nas proximidades do ponto crítico é onde se produzem com pequenas alterações de pressão e temperatura, as maiores variações na densidade do fluido supercrítico e por consequência do seu poder solvente (VELASCO et al., 2007).

Tabela 3. 1 Propriedades físicas associados a diferentes estados das substâncias

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

Adaptado de Brunner (1994)

O solvente mais empregado na extração supercrítica é o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), o qual é um solvente não tóxico e seguro (GRAS = *Generally recognized as safe*), não inflamável e de baixo custo. As extrações empregando fluidos supercríticos são mais convenientes, devido a sua baixa temperatura e pressão crítica (31,2 °C e 73,8 bar, respectivamente), que o torna favorável como solvente de extração de compostos termosensíveis, além de ser uma tecnologia limpa, livre de resíduos no extrato e na matriz vegetal após a extração (UQUICHE et al., 2004; BRUNNER, 2005). Além disso, o scCO₂ apresenta alta compressibilidade, densidade semelhante aos líquidos, alta difusividade, baixa viscosidade e tensão superficial, propriedades que favorecem a penetração e transporte do fluido supercrítico na matriz vegetal quando comparado com processos convencionais (DUNFORD et al., 2003).

Sendo apolar, o scCO₂ dissolve preferencialmente compostos apolares e de baixa polaridade. O aumento da pressão torna o scCO₂ menos apolar e com isso, consegue extrair substâncias mais polares. No entanto, substâncias de alta polaridade também podem ser extraídas com o emprego de co-solventes, tais como etanol e água, já que as propriedades de solvatação dos fluidos supercrítico podem ser modificadas facilmente pela adição de pequenas quantidades dessas substâncias (PELLERIN, 1991; VASAPOLLO et al., 2004).

O comportamento de uma extração supercrítica em leito fixo é caracterizado por uma curva global de extração (OEC, do inglês, overall extraction curve) obtida pela função entre a massa de extrato acumulada em função do tempo de extração ou da quantidade de solvente utilizada, mantida constante a vazão do solvente (SOVOVÁ, 2005). As curvas típicas de rendimento global apresentam três fases distintas (Figura 3.7). A primeira, onde retira-se o soluto exposto na superfície da partícula, a uma taxa aproximadamente constante, pelo fenômeno de convecção, denominado período de taxa constante de extração (CER - constant extraction rate). Na segunda etapa, a camada superficial de soluto na partícula começa a apresentar falhas e por isso menor quantidade de soluto é solubilizada. Esta etapa é denominada etapa de taxa decrescente de extração (FER - falling extraction rate period), neste período prevalecem tanto a transferência de massa por convecção como por difusão interna. Na terceira etapa o soluto é retirado de dentro da partícula, em um processo difusional lento (DC – diffusion controlled rate period) (BRUNNER, 1994; QUISPE - CONDORI, 2005; DIEHL, 2008).

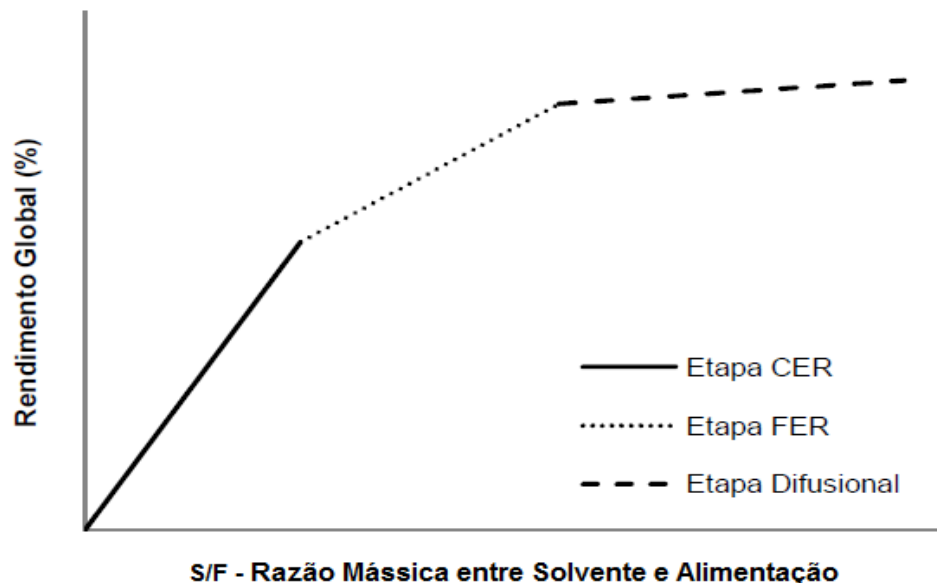


Figura 3.7 Curva global de extração apresentando as três regiões distintas.

Fonte: Adaptado de Farías - Campomanes, 2012.

3.3.1.1. Processos de Extração Sequencial com Fluido Supercrítico

Poucos são os estudos que relatam o uso de extração sequencial de compostos bioativos. O CO₂ é apolar o que o restringe à extração de substâncias apolares e/ou de baixa polaridade, por essa razão a extração com etanol (polaridade=5,2) e com água (polaridade=9,0) se tornam importantes para extração de substâncias polares. Além disso, alguns solventes (por exemplo, o etanol ou água ou ainda a mistura destes) podem ser usados como co-solvente do scCO₂ em diferentes proporções para se alterar a polaridade da mistura scCO₂/etanol/água e extrair substâncias nas faixas de polaridades desejadas, ou ainda pode-se empregar uma extração sequencial, onde inicialmente o scCO₂ extrairá os compostos apolares e de baixa polaridade e em seguida uma extração etanólica e/ou aquosa poderá resultar em extratos mais concentrados em compostos polares de interesse.

O efeito de três modificadores (etanol, água e azeite de oliva) na extração supercrítica com dióxido de carbono de licopeno de tomates foi estudado por Shi et al., (2009). As condições de operação foram divididas em sistemas únicos (etanol ou água ou azeite de oliva variando de 5 % a 15 %), sistemas binários (etanol + água (5 % ou 10 %)); água + azeite de oliva (5 % ou 10 %); etanol + azeite de oliva (5 % ou 10 %)) e sistemas ternários (etanol, água e azeite de oliva (5 %)) nas temperaturas de 45 °C a 75 °C e pressões de 250 bar a 350 bar. O efeito dos três modificadores aumentou a eficiência de extração de licopeno, sendo que os melhores rendimentos foram obtidos na temperatura de 75 °C e pressão de 350 bar, no sistema binário etanol 10 % + azeite de oliva 10 %. O azeite de oliva comparado com os outros modificadores, na mesma condição de temperatura e pressão, apresentou-se maior eficiência na extração de licopeno.

Seabra et al., (2010), estudaram o efeito do solvente (CO₂/etanol/água) na extração de antocianinas a partir do bagaço de sabugueiro. Os experimentos foram conduzidos a 40 °C e 210 bar utilizando a extração com scCO₂ e em seguida com diversas misturas de solventes CO₂/etanol/H₂O (0-90 %, 0,5-100 %, 10-90 %, 20-80 %, 30-70 %, 40-60 %, 50-50 %).

0-95 %, v/v da mistura etanol água), com o intuito de obter frações ricas em antocianinas. A extração prévia com scCO₂ resultou em uma fração lipofílica e as diferentes misturas dos solventes CO₂/etanol/H₂O tiveram uma grande influência sobre o rendimento de extração e composição, em termos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e rutina. A presença de etanol e água foi importante para promover a extração de antocianinas, mesmo que a sua presença não esteve diretamente relacionada com a atividade antioxidante do extrato.

Martinez-Correa et al. (2012) obtiveram extratos de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia* L.) em duas etapas, a 60 °C e 400 bar. A primeira etapa foi realizada com scCO₂ e em seguida foi realizada uma extração a partir do resíduo com etanol ou com água. Foram analisados os compostos polifenólicos totais, flavonóides totais e a concentração de Artepelin C nos extratos. Os autores concluíram que a extração sequencial em duas etapas permitiu a recuperação dos extratos com diferentes composições e funcionalidades e a utilização da extração supercrítica (primeira etapa) seguida da extração aquosa permitiu maximizar a obtenção de compostos fenólicos, enquanto que a extração com etanol após a extração supercrítica produziu extratos mais concentrados em compostos fenólicos e flavonoides.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-Primas e Reagentes

Uma amostra de folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot já trituradas (Figura 4.1) foi doada pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP), localizado no município de Paulínia (22° 45' 00" Sul e 47°10'21" Oeste), Estado de São Paulo, obtida do acesso 06 (germoplasma oriundo de Manaus), cultivado no campo experimental do CPQBA cuja excicata depositada sobre o número 1348, no herbarium, onde a Dra. Glyn Mara Figueira foi a responsável pela identificação.



Figura 4.1 Amostra de *Arrabidaea chica* (Humb. Bonpl.) Verlot seca e triturada.

A secagem das folhas foi realizada no CPQBA em secador com circulação forçada de ar (Fabber, modelo 170, Piracicaba, Brasil) a 40 °C durante 24 horas.

A amostra foi classificada de acordo com tamanho usando peneiras vibratórias da serie Tyler (tamanhos: 8, 12, 16, 24, 32 e 48 meshes) (Bertel, Brasil) por 15 minutos. Após, as amostras foram empacotadas em sacos plásticos, envoltas em papel alumínio e estocadas em freezer doméstico (modelo 220, Cònsul, Brasil) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

4.2. Caracterização das Matérias-Primas

A matéria-prima foi caracterizada quanto às propriedades das partículas (teor total de voláteis + umidade, diâmetro médio das partículas e densidade real) e propriedades do leito fixo de partículas (densidade aparente do leito de partículas e porosidade). Essas propriedades são importantes para a modelagem matemática e influenciam na curva de extração e no rendimento global de extração.

4.2.1. Teor Total de Voláteis e Umidade

O teor total de voláteis + umidade ($VU\%$) foi determinado por método gravimétrico AOAC 930.04 (1997). O método emprega 2 g de amostra em uma placa previamente tarada e pesada em balança semi-analítica (BEL, modelo U210A, SP, Brasil) e submetida a secagem em estufa (Marconi, modelo MA-030/12, SP, Brasil) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo a 525 mmHg (bomba Marconi, modelo MA-057-13, Brasil), tomando o peso a cada 2 horas ate que a variação fosse menor ou igual a 3 mg.

Para o cálculo da porcentagem de massa seca empregou-se a Equação 4.1 a seguir:

$$VU = \left[\frac{m_{amostra} - m_{amostra\ dessecada}}{m_{amostra}} \right] \times 100 \quad 4.1$$

O teor de umidade (U %) foi quantificado pelo método de Karl-Fisher (Metrohm 701 KF Titrimo) equipado com forno (832 KF Thermoprep), a partir de 0,20 g de amostra e pré-tratando-a a 105 °C durante 20 minutos, e vazão de nitrogênio de 50 mL/min (mililitros por minuto de nitrogênio a 1,01 bar e 0 °C (A.O.C.S., 1998)).

4.2.2. Diâmetro Médio das Partículas

O diâmetro médio das partículas foi calculado utilizando o método ASAE (ASAE, 1997), onde a amostra foi colocada em um jogo de peneiras da série Tyler de tamanho de 8 a 48 mesh e peneiradas durante 15 minutos com ajuda de um agitador eletromagnético (Modelo 1868, Bertel, SP, Brasil). As diferentes frações retidas nas peneiras foram pesadas em balança semi-analítica (BEL, modelo U210A, SP, Brasil).

Através da Equação 4.2, foi obtido o valor do diâmetro médio geométrico da partícula, que representa uma média ponderada dos diâmetros médios geométricos de cada fração (Equação 4.3).

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

$$\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{1/2} \quad (4.3)$$

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

4.2.3. Densidade Real do Material Triturado (das Partículas)

A densidade real (ρ_r) foi determinada por picnometria de gás hélio utilizando um picnomêtro automático (modelo ULTRAPYC 1200e, QUANTACHROME, Flórida, EUA) na central analítica do Instituto de Química da UNICAMP. O resultado expresso é a média de dez determinações.

4.2.4. Densidade Aparente do Leito de Partículas

A densidade aparente (ρ_a) do leito foi calculada a partir da massa de folhas de cajuí trituradas, requerida para encher um volume de 10 cm³ (UQUICHE et al., 2004).

4.2.5. Porosidade

A porosidade ε do leito (ou fração volumétrica de vazios no leito) foi calculada a partir dos dados experimentais de densidade aparente (ρ_a) e real (ρ_r) do material moído, calculada pela Equação 4.4.

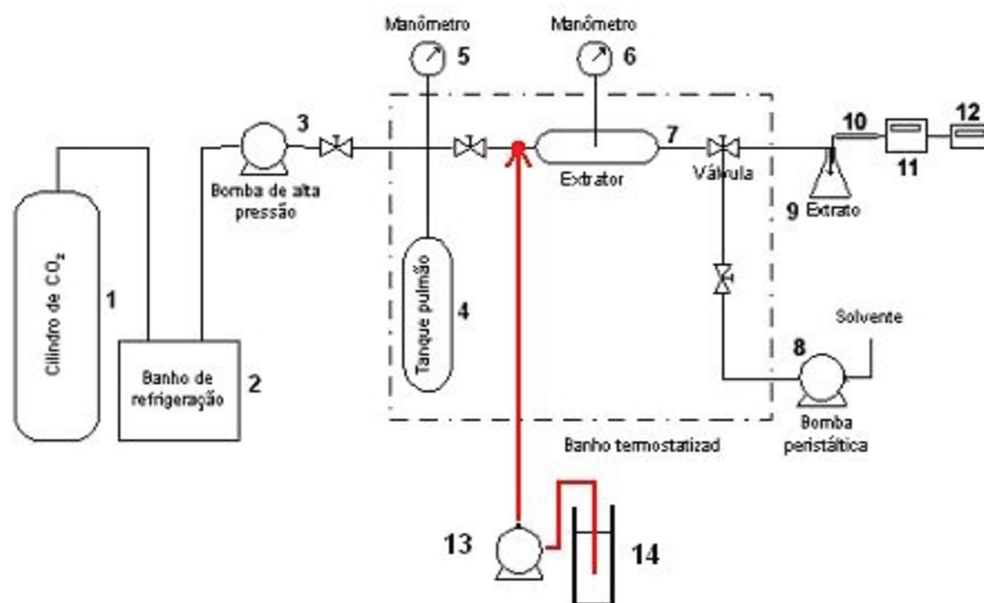
$$\varepsilon = \frac{\text{volume do leito} - \text{volume ocupado pelo material}}{\text{volume do leito}} = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (4.4)$$

4.3. Tipos de Extratos e Sistema Experimental

Nesse trabalho, foram obtidos extratos através de um extrator em leito fixo e com intuito de comparação de dados foram realizados extratos convencionais etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos.

4.3.1. Tipos de Extratos Obtidos em Extrator em Leito Fixo

Os experimentos para obtenção dos extratos utilizando o extrator em leito fixo foram conduzidos na unidade experimental do Laboratório ExTrAE, UNICAMP, Brasil, esquematizada na Figura 4.2. A unidade consiste, basicamente, de um cilindro de CO₂, banho termostatizado, manômetros do tipo Bourdon, trocador de calor (2), bomba de alta pressão (3), tanque pulmão (4), extrator (7), frasco coletor do extrato (9), medidor de vazão (11), totalizador de volume(12), válvulas, bomba (13) para etanol ou água.



- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 1. Cilindro CO ₂ | 8. Bomba peristáltica |
| 2. Banho de Refrigeração | 9. Frasco coletor |
| 3. Bomba CO ₂ | 10. Adsorvente |
| 4. Tanque Pulmão | 11. Medidor de Vazão |
| 5, 6 Manômetros do tipo Bourdon | 12. Totalizador de Volume |
| 7. Extrator | 13. Bomba para etanol ou água |

Figura 4.2– Esquema da unidade experimental de extração.

O extrator com aproximadamente 50 mL de volume e diâmetro de 20 mm (7) foi empacotado manualmente com cerca de 5 g de folhas secas e trituradas, formando um leito de partículas. O restante do volume do extrator foi completado com esferas de vidro de 5 mm. O banho termostatizado foi ajustado na temperatura de operação (40 °C ou 50 °C) e a pressão foi ajustada bombeando CO₂ até atingir a pressão preestabelecida (300 bar ou 400 bar). Quando alcançadas as condições estabelecidas, adotou-se um período estático de 30 minutos como tempo para estabilização do sistema e iniciou-se a extração escoando CO₂ supercrítico através do leito e coletando-se extrato no coletor (9). Por fim o CO₂ foi conduzido a um medidor (11) (Modelo 32908-69 Cole Parmer

Instrument Company) para o controle da vazão de CO₂ e um totalizador de volume (12) para quantificar o dióxido de carbono usado.

Durante o processo de extração com CO₂ supercrítico a tubulação da linha foi lavada com etanol com o auxílio de uma bomba peristáltica (8), para recuperação do extrato depositado na mesma, com uma vazão média de 0,3 mL/min ($\rho=785$ g/L, 25 °C)

Em uma primeira etapa, amostras de folhas de cajurú foram submetidas a processos de extração em extrator de leito fixo em três etapas, usando três solventes distintos. Na primeira etapa foi utilizado CO₂ supercrítico com uma vazão média de 1,65 g/min (1L/min), que foi lida na saída do sistema, nas condições de temperatura e pressão local de 0,93 bar à 25 °C ($\rho=1,65$ g/L), a segunda e terceira etapas, foram realizadas com etanol ($\rho=785$ g/L, 25 °C) acidificado com ácido cítrico 0,3 % e água ($\rho=1000$ g/L, 25 °C) acidificada com ácido cítrico 0,3% com vazão média de 0,39 g/min (0,5 mL/min) e 0,5 g/min (0,5 mL/min), respectivamente. A Figura 4.3 esquematiza as condições experimentais e nesse diagrama os mesmos estilos de hachuras representam o mesmo processo a uma temperatura e pressão.

Durante a coleta das frações de extratos para construção da curva de extração, foi observado um escurecimento das amostras na terceira etapa com água. Por essa razão, foi realizada uma modificação no processo e a terceira etapa passou a ser feita por extração convencional aquosa do resíduo 2, na mesma temperatura de operação e na pressão ambiente, com isso obtendo o terceiro extrato (EA/PESC).

Para obtenção do terceiro extrato aquoso, o resíduo 2 foi seco em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil) a 40 °C durante uma hora e meia. Em seguida, pesou-se cerca de um grama de resíduo adicionado a 20 mL de água deionizada, acidificada com ácido cítrico 0,3 % e foram colocadas em um banho previamente aquecido na temperatura de operação, durante 10 minutos em repouso. Após a mistura foi centrifugada (centrifuga JOUAN, BR4i, França), por 20

minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e o filtrado foi liofilizado (liofilizador modelo L101, LIOBRAS, SP, Brasil), obtendo um extrato aquoso seco de crajirú. As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

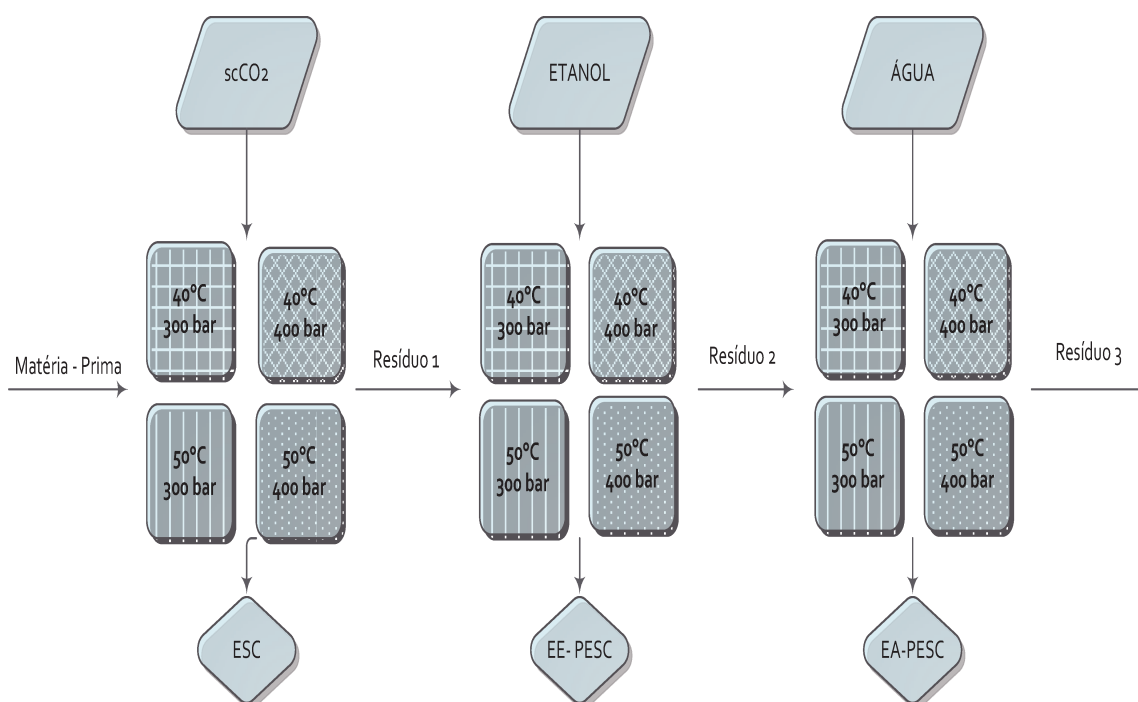


Figura 4.3 – Esquema do processo de extração sequencial em leito fixo em três etapas.

O etanol presente nos extratos obtidos foi evaporado em um rotaevaporador (Marconi. MA-120, Brasil) acoplado a um banho a 40°C sob vácuo de 700 mmHg em seguida colocados em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil) na temperatura de 40°C sob vácuo de 525 mmHg (bomba Marconi, MA 057-13, Brasil), até a obtenção do extrato seco. As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob

refrigeração para posterior análise. A água presente nos extratos foi evaporada por secagem em liofilizador.

Em um segundo experimento, amostras de craijirú foram submetidas a processos de extração em extrator de leito fixo em duas etapas, sendo que na primeira etapa foi utilizado o CO₂ supercrítico, a segunda etapa foi realizada a extração por meio de uma mistura de CO₂ supercrítico/etanol/água em três diferentes proporções mássicas:

- ❖ 1° condição experimental: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol, 0 % água
($\rho_{\text{etanol-água}}=785 \text{ g/L}$, 25 °C);
- ❖ 2° condição experimental: 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1 % água
($\rho_{\text{etanol-água}}=843,6 \text{ g/L}$, 25 °C);
- ❖ 3° condição experimental: 78,4 % scCO₂, 10,8 % etanol, 10,8 % água
($\rho_{\text{etanol-água}}=912 \text{ g/L}$, 25 °C);

As três condições experimentais foram conduzidas a uma temperatura de 40 °C e pressão fixa de 300 bar, estabelecidas a partir de testes preliminares realizados neste trabalho e estão ilustradas na Figura 4.4.

O resíduo 2 (resíduo da extração etanólica) obtido nesse processo, foi seco em estufa (Marconi, MA 030-12, Brasil) a 40°C durante uma hora e meia e posteriormente foi submetido a uma extração convencional aquosa a 40°C e pressão ambiente, obtendo um terceiro extrato. Esse processo só foi realizado nas etapas posteriores a construção de curvas de cinéticas de extração.

Todos os experimentos de extração foram realizados em triplicata.

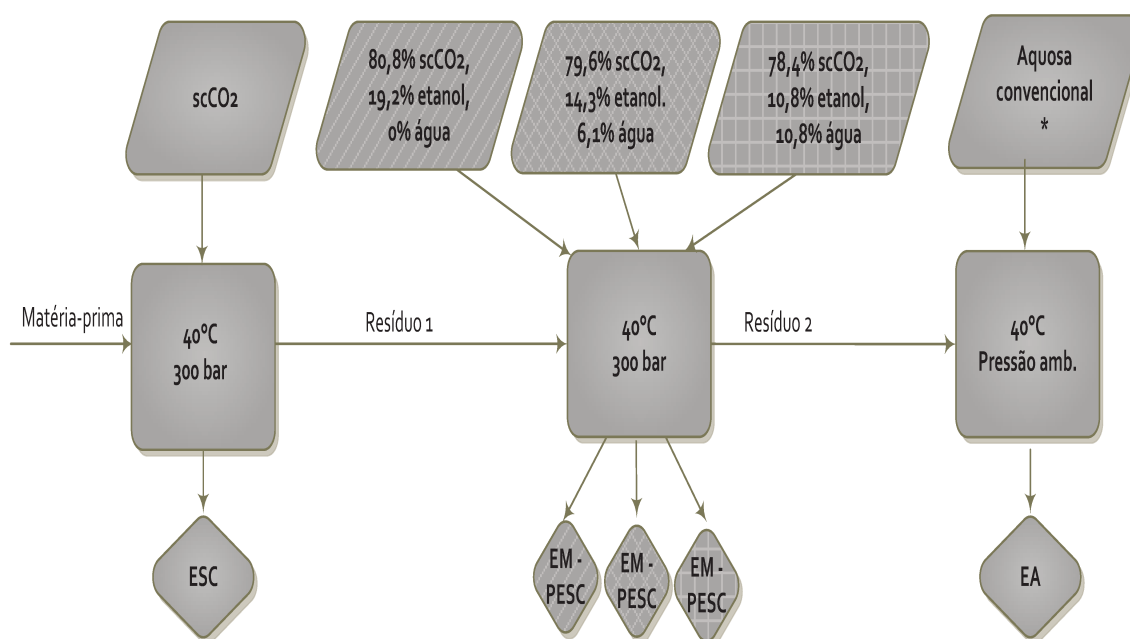


Figura 4.4 –Esquema do processo de extração sequencial em leito fixo em duas etapas, sendo a segunda etapa constituída de uma mistura.

*- Processo adicionado somente nas etapas posteriores a cinética de extração.

O etanol presente nos extratos foi rotaevaporado (rotaevaporador Marconi, MA-120, Brasil) acoplado em um banho a 50 °C sob vácuo de 700 mmHg, em seguida colocado em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil) a temperatura de 50 °C sob vácuo de 525 mmHg (bomba Marconi, MA 057-13, Brasil), até a obtenção do extrato seco. Para a construção das curvas, em alguns pontos da cinética, os frascos foram secos á 80 °C devido à dificuldade em secar água a baixa temperatura. Os extratos aquosos foram liofilizados (liofilizador modelo L101, LIOBRAS, SP, Brasil). As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise.

4.3.1.1. Extração Convencional Etanólica

Os extratos convencionais etanólicos foram obtidos segundo a metodologia descrita por Jorge (2008) com modificações. Um grama de folhas secas e trituradas foram extraídas através de agitação, três vezes, sendo cada vez com 5 mL de etanol acidificado (0,3% ácido cítrico), com duração de uma hora e meia cada, protegido da luz, em agitador magnético. O extrato foi filtrado sob vácuo e o solvente foi evaporado em rotaevaporador (Marconi. MA-120, Brasil) acoplado a um banho a 40 °C sob vácuo de 700 mmHg em seguida colocado em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil) a temperatura de 40 °C sob vácuo de 525 mmHg (bomba Marconi, MA 057-13, Brasil), até a obtenção do extrato seco. As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise. Todos os experimentos de extração etanólica convencional dos extratos foram realizadas em triplicata.

4.3.1.2. Extração Convencional Hidroalcoólica

Os extratos convencionais hidroalcoólicos foram obtidos segundo a metodologia descrita por Jorge (2008) com modificações. Dez gramas de folhas secas e trituradas foram extraídas através de agitação, três vezes, sendo utilizada em cada vez 50 mL de uma mistura de etanol e água 70:30 (v:v) acidificada (0,3 % ácido cítrico) com duração de uma hora e meia cada, protegida da luz, em agitador magnético, nas condições ambientes. O extrato foi filtrado sob vácuo. Todos os experimentos de extração hidroalcoólica convencional foram realizadas em triplicata.

Com intuito de comparação, foi realizada uma extração hidroalcoólica com uma mistura de etanol, água 70:30 (v:v) acidificada (0,3 % ácido cítrico) na

unidade experimental de extrator em leito fixo, a 40 °C e 300 bar, com vazão média de entrada de solvente de 0,39 g/min ($\rho=785$ g/L, 25 °C) e 5 g de folhas. Em um primeiro momento foi realizada a cinética de extração para determinação do tempo total de extração, que foi construída plotando rendimento global de extração por tempo (minutos). Para determinação do rendimento global de extração e para obtenção de extratos para as demais análises o processo foi realizado em triplicata. Em cada uma das extrações, o extrator foi empacotado com aproximadamente cinco gramas de amostra de *A. chica*.

O solvente presente nesses extratos foi evaporado em rotaevaporador (Marconi, MA-120, Brasil) acoplado em um banho a 40 °C sob vácuo de 700 mmHg em seguida colocados em estufa a vácuo (Marconi, MA 030-12, Brasil) a temperatura de 40 °C sob vácuo de 525 mmHg (bomba Marconi, MA 057-13, Brasil), até a obtenção do extrato seco. As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise.

4.3.1.3. Extração Convencional Aquosa

Foram obtidos três extratos convencionais utilizando três temperaturas diferentes (40 °C, 50 °C e 80 °C). Para realização da extração convencional aquosa foi seguida a metodologia descrita por Cseke et al. (2006) com modificações. Para as temperaturas de 40 °C e 80 °C, cerca de um grama de amostra seca foi adicionada a 20 mL de água deionizada, acidificada com ácido cítrico 0,3 %, foram colocadas em um banho previamente aquecido na temperatura de operação e permaneceram durante 10 minutos em repouso, após a mistura foi centrifugada (centrifuga JOUAN, BR4i, França), por 20 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e o filtrado foi liofilizado (liofilizador modelo L101, LIOBRAS, SP, Brasil), obtendo um extrato aquoso seco

de crajirú. As amostras armazenadas em frascos do tipo penicilina de 50 mL foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise.

O terceiro experimento foi conduzido seguindo a mesma metodologia à 50°C, porém o solvente não foi acidificado.

Todos os experimentos de extração aquosa convencional dos extratos foram realizadas em triplicata.

4.3.2. Curvas de extração

Para a construção das curvas de extração obtidas em extrator de leito fixo foram adotados intervalos de tempo ou de massa de solvente utilizada. As curvas foram construídas plotando rendimento de extração em % por S/F (massa utilizada do solvente/ massa inicial de matéria-prima).

No processo de extração sequencial em três etapas, na primeira etapa, utilizando como solvente o CO₂ supercrítico, a cada 49,5 g (30L de CO₂ a 93 bar e 25 °C) de solvente utilizado foram retirados frascos com o extrato para a construção da curva de extração, até se obter massa desprezível. Na segunda etapa com etanol, nos primeiros 90 minutos foram retirados frascos de 10 em 10 minutos, em seguida foram retirados frascos de 20 em 20 minutos, no intervalo de uma hora, posteriormente foram retirados frascos de 30 em 30 minutos durante 4 horas e meia, após de 40 em 40 minutos e em seguida de 50 em 50 minutos, até obter massa desprezível ou observação de coloração igual e bem mais clara dos frascos. Na terceira etapa, usando água como solvente, durante os primeiros 90 minutos foram retirados frascos de 10 em 10 minutos, em seguida foram retirados frascos de 20 em 20 minutos, posteriormente foram retirados frascos de 30 em 30 minutos, até obter massa desprezível. O tempo total de cada cinética variou nas condições de trabalho e os dados estão mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Condições experimentais, volume de CO₂ e tempo utilizados para construção das cinéticas.

Condição experimental(T-P)	Volume CO ₂ utilizado (L)*	Tempo (min) etapa etanol	Tempo (min) etapa água
40 °C – 300 bar	360	590	362
40 °C – 400 bar	450	1100	390
50 °C – 300 bar	570	520	390
50 °C – 400 bar	150	590	420

* medidos a 0,93 bar e 25 °C.

Definido o volume de CO₂ utilizado na condição de 40 °C e 300 bar, foi então conduzida a cinética de extração em leito fixo em três etapas, sendo a segunda etapa constituída de uma mistura com CO₂, etanol e água, sendo que as condições experimentais podem ser observadas na Tabela 4.2. A primeira etapa, a qual o solvente utilizado foi o CO₂ supercrítico consistiu na retirada de três frascos a cada 30 litros de solvente. Na segunda etapa a qual utilizou uma mistura de CO₂, etanol e água, foram retirados frascos a cada 30 litros de CO₂ utilizados. O volume total de CO₂ variou com as condições experimentais conforme a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Condições experimentais e volume de CO₂ utilizado para construção das cinéticas de misturas.

Condição experimental (2° etapa do processo)	Volume total CO ₂ (L)*
80,8 % CO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água	540
79,6 % CO ₂ , 14,3 % etanol, 6,1 % água;	330
78,4 % CO ₂ , 10,8 % etanol, 10,8 % água.	385

* medidos a 0,93 bar e 25 °C

4.3.3. Determinação do Rendimento Global de Extração (X_o)

O rendimento global de extração foi calculado para comparação entre os diferentes métodos de extração e expressa a relação entre a massa de extrato seco obtido e massa inicial colocada no extrator (base seca). Nos extratos, aos quais foram utilizados solventes acidificados (extratos etanólicos, aquosos, exceto misturas), para fins de cálculo de rendimento global (X_o), a massa de ácido cítrico foi descontada.

4.4. Métodos Analíticos

Com objetivo de caracterizar todos os extratos obtidos neste trabalho, foram realizadas as análises: compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antoncianinas monoméricas totais, carajurina e luteolina. Todas as análises dos extratos são descritas a seguir.

4.4.1. Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de SINGLETON et al. (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (EAG)/ g. A curva padrão de ácido gálico foi construída segundo o procedimento a seguir: dissolveu-se 0,5 g de ácido gálico (pureza 99 %, Vetec, Brasil, lote 0806387) em 100 mL de água deionizada em balão volumétrico de 100 mL. Em balões volumétricos, colocou-se volumes de 0,0; 0,4; 0,8; 1,0; 1,4; 1,8 e 2,0 mL da solução estoque em 100 mL de água deionizada. Em seguida, coletou-se 1 mL de cada uma das soluções em diferentes concentrações que foram previamente preparadas com ácido gálico e colocadas em balões de 25 mL. No mesmo balão adicionou-se 9 mL de água

deionizada e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica, SP, Brasil, lote 35193), a mistura foi agitada e após 5 minutos adicionou-se 10 mL da solução Na_2CO_3 7 % (Êxodo, SP, Brasil, lote CS5179RA) e o volume foi completado com água deionizada. Após permanecer por 90 minutos a temperatura ambiente e protegido contra luz, a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 750 nm em espectrofotômetro (UV-VIS lambda 40, Perkin Elmer, USA). A solução referência utilizada como branco no espectrofotômetro foi acondicionada da mesma forma, com 1 mL de água ultra pura (Milli-Q). A curva padrão está apresentada no Anexo B.

Para a medição de fenóis totais das amostras dos extratos secos de cajurú, estes foram inicialmente diluídos em etanol (pureza 99,5 % v/v, Synth, Brasil) em proporção (20 mg/mL etanol), a partir do extrato diluído foi preparada a diluição aquosa, tomando 1 mL do mesmo e depositada em um balão volumétrico de 5mL, completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a construção da curva padrão, verificando que o valor obtido de absorbância estivesse dentro da faixa de absorbância da curva padrão. Foram realizadas amostras em triplicata.

4.4.2. Flavonoides Totais

Para a quantificação dos flavonoides totais foi empregado o método desenvolvido por ZHISHEN et al. (1999) e os resultados expressos em mg equivalente de catequina (mg EC)/g. Para construção da curva padrão foi seguido o procedimento a seguir: dissolveu-se 0,5 g de catequina (pureza 98%, Sigma Aldrich, USA, lote 356B270) em 100 mL de água deionizada em balão volumétrico de 100 mL. Em balões volumétricos colocou-se volumes de 0,0; 0,4; 0,8; 1,0; 1,4; 1,8 e 2,0 mL da solução estoque em 100 mL de água deionizada. Em balões de 10 mL foram colocados 1 mL de cada solução padrão de catequina, em seguida foi adicionado 4 mL de água deionizada e 0,3 mL de solução NaNO_2 5 % (Ecibra,

SP, Brasil, lote 17746); a mistura foi agitada e após 5 minutos, adicionou-se 0,3 mL de solução AlCl_3 10 % (Ecibra, SP, Brasil, lote 17375). Esperados 6 minutos adicionou-se 2 mL de NaOH (Êxodo, SP, Brasil, lote HS6012RA) 1M e o volume foi completado com água deionizada. Em espectrofotômetro (UV-VIS lambda 40, Perkin Elmer,USA). A absorvância foi lida em comprimento de onda de 510 nm. A solução referência utilizada como branco no espectrofotômetro foi preparada da mesma forma, com 1 mL de água ultra pura (Milli-Q). A curva padrão está apresentada no Anexo B.

Para a medição de flavonoides totais das amostras dos extratos secos de cajurú, estes foram inicialmente diluídos em etanol (pureza 99,5% v/v, Synth, Brasil) em proporção (10 mg/mL etanol), a partir do extrato diluído foi preparada a diluição aquosa, tomando 1 mL do mesmo e depositada em um balão volumétrico de 5mL, completando o volume com água ultra pura (Milli-Q). Seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a construção da curva padrão, verificando que o valor obtido de absorvância estivesse dentro da faixa de absorvância da curva padrão. Foram realizadas avaliações em triplicata.

4.4.3. Quantificação de Antocianinas pelo Método do pH diferencial

A quantificação de antocianinas dos extratos de cajurú (*A. chica*), foi realizada pelo método do pH diferencial (GIUSTI & WROLSTAD, 2001). Aproximadamente 20 mg de extratos foram pesados e transferidos para balões volumétricos de 25 mL e avolumadas com dois sistemas tampão: cloreto de potássio/ ácido clorídrico para o pH 1,0 (0,025M) e cloreto de potássio/acetato de sódio para o pH 4,5 (0,4M). Após 30 minutos em repouso ao abrigo da luz, em seguida foram efetivadas as medidas em máximos de absorção na região visível a 510 nm e a 700 nm utilizando o espectrofotômetro (UV-VIS lambda 40, Perkin Elmer,USA). A absorvância foi calculada a partir da Equação 4.5.

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700nm})_{pH\ 1,0} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700nm})_{pH\ 4,5} \quad (4.5)$$

A concentração dos pigmentos antociânicos monoméricos foi calculada e representada em cianidina-3-glicosídeo através da utilização da Equação 4.6

$$AM = \frac{A \times MM \times FD}{\epsilon \times b} \quad (4.6)$$

Onde:

AM = concentração de antocianinas monoméricas (g/L);

A = absorvância calculada pela equação 4.5;

MM = massa molar da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g.mol⁻¹);

ϵ = coeficiente de absorvância molar da cianidina-3-glicosídeo (26.900 L.cm⁻¹.mg⁻¹);

FD = fator de diluição;

b = caminho óptico da cubeta usada no espectrofotômetro (cm);

4.4.4. Análise qualitativa e quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise química dos extratos foi realizada a fim de monitorar os três pigmentos antociânicos do tipo 3-desoxiantocianidinas: pigmento (1) 6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium, pigmento (2) 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (3) carajurina 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium presentes na *A. chica* Verlot, além da luteolina.

Como não há padrões disponíveis para os dois primeiros pigmentos (1)(6,7,3',4'-tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e (2) 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxi flavilium) não foi possível a quantificação dos mesmos.

As análises cromatográficas foram realizadas no CPQBA, Campinas, pela química Ilza Maria de Oliveira Sousa. Foram utilizados padrões de luteolina (Sigma-Aldrich, Código L9283-10MG, Lote 071M4048V, pureza ≥ 98 % TLC) e carajurina (isolada no CPQBA) para a construção das curvas padrões que estão dispostas no Anexo D.

Para análise qualitativa dos pigmentos 1 e 2 e quantitativa do pigmento (3) carajurina foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Devia et al., (2002). Acetonitrila (grau CLAE, Mallinckrodt), ácido tri-fluoroacético (TFA) (Merck) e água ultrapurificada (Milli-Q, Millipore) com condutividade de 18 m Ω foram usados para o preparo da fase móvel usada no desenvolvimento dos cromatogramas. Para análise quantitativa da luteolina foi seguida a metodologia descrita por Wang & Li, (2007). Metanol (grau CLAE) e ácido fosfórico (1M ajustado a pH 2 com água ultrapurificada) foram usados para o preparo da fase móvel.

Aliquotas de aproximadamente 10 mg de extratos brutos foram dissolvidas em aproximadamente 2,0 mL de MeOH grau CLAE e submetidas ao processo de limpeza por extração em fase sólida (EFS) para posterior análise em CLAE.

Para extração em fase sólida, as amostras foram solubilizadas e eluídas em cartucho C-18 (STRATA Phenomenex, 100mg/3mL) acoplado em um Manifold (J.T.BAKER) sob vácuo, condicionado com 6 mL de solução de H₃PO₄ (pH 2,0), e fração de condicionamento foi descartada. Foram empregados aproximadamente 10,0 mL de MeOH grau CLAE para eluição de cada amostra e a fração limpa por EFS foi avolumada para 10 mL, em seguida filtrada em filtro de 0,45 μ m e armazenada em frasco âmbar para análise por CLAE.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo Shimatzu sistema SCL-10A; LC-10AT; FCV-10AL; CTO-10AS, com detector de UV em arranjo de diodos Shimatzu (modelo SPD-M10A) e coluna C-18 (Phenomenex Gemine (4,6 mm x 250mm i.d. 3 μ m)), com vazão de 1 mL/min para a detecção a

350 nm e 0,5 mL/min para a detecção a 470 nm, para análise da luteolina e dos pigmentos 1, 2, e 3, respectivamente, presentes nos extratos de *A. chica*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria-Prima

A Tabela 5.1. apresenta as propriedades que caracterizam a amostra de folhas secas e trituradas da *Arrabidaea chica*.

Tabela 5.1 Caracterização da matéria-prima

Propriedades	<i>A. chica</i>
Voláteis+Umidade (%VU)	6,11 ± 0,06
Umidade (%U)	5,3 ± 0,3
Diâmetro médio das partículas (mm)	0,536
Densidade real das partículas (g/cm³)	1,32 ± 0,01
Densidade aparente do leito (g/cm³)	0,27 ± 0,02
Porosidade	0,797

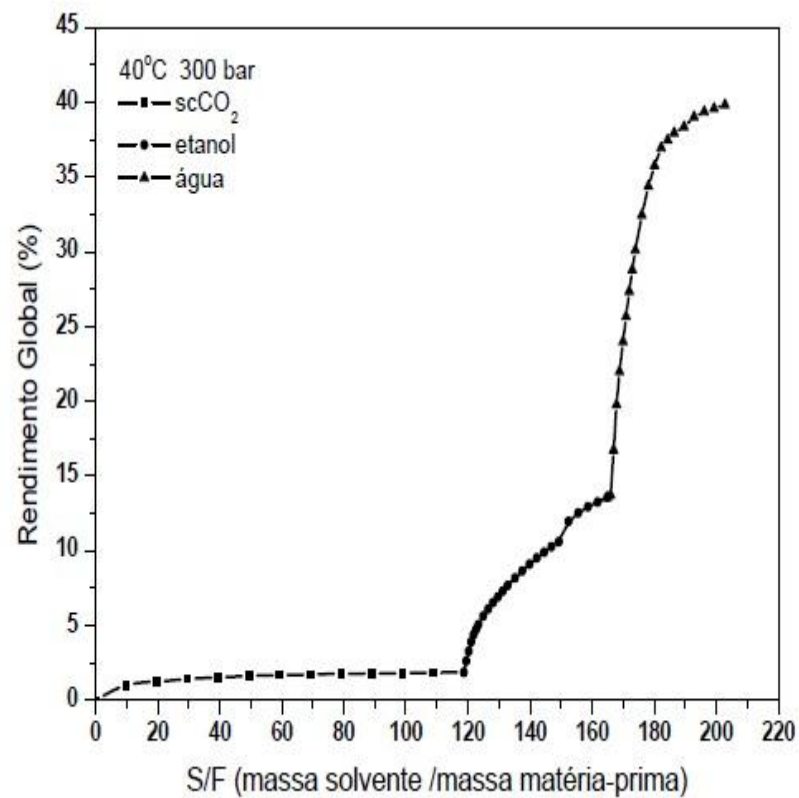
Observa-se, na Tabela 5.1., uma diferença de 0,8 % entre a umidade obtida pelo método gravimétrico (%VU) e a obtida pelo método de Karl Fischer (%U), sendo esta explicada pela evaporação de outras substâncias voláteis além da água durante a secagem em estufa.

A amostra de folhas de crajirú, seca e triturada, apresentou densidade real e aparente de 1,32 e 0,268 g/cm³ respectivamente, resultando em uma porosidade de leito de 0,797. O diâmetro médio de partículas é de 0,536 mm, formado pela média de material retido nas peneiras de meshes 8, 12, 16, 24, 32, 48 e fundo, com as porcentagens de material de diâmetros médios geométricos distribuídos como: 0,02 % (2,89 mm), 0,32 % (1,81 mm), 1,14 % (1,18 mm), 42,65 % (0,843 mm), 21,64 % (0,596 mm), 14,18 % (0,3873 mm) e 19,51 % (0,212 mm).

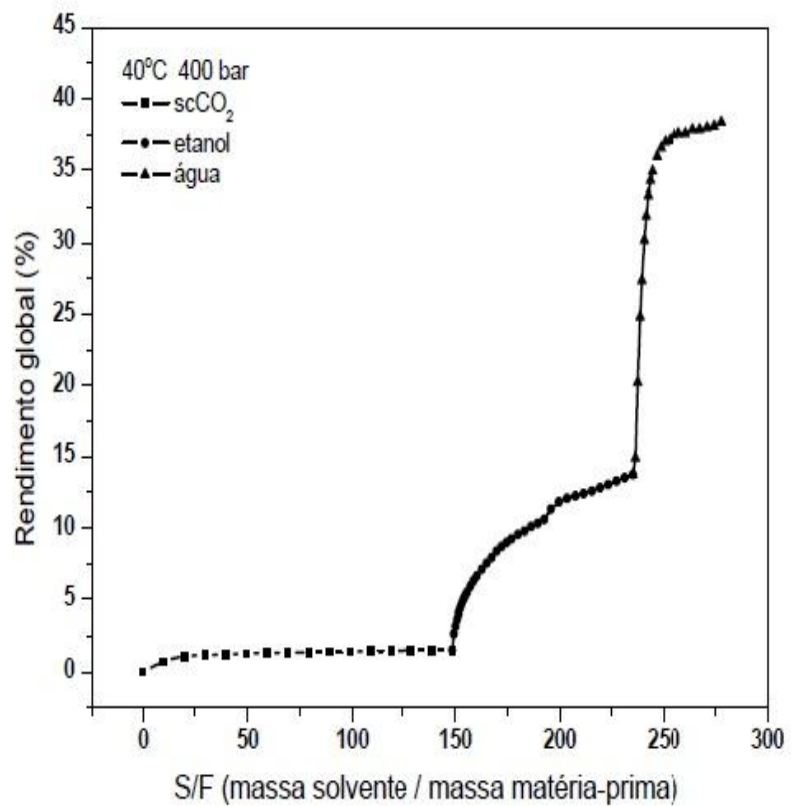
5.2. Cinética de Extração

5.2.1. Extração Sequencial em Leito Fixo em Três Etapas

Foram construídas quatro curvas de cinéticas de extração, com três diferentes solventes (scCO₂, etanol e água) nas condições de 40 °C e 300 bar (Figura 5.1 a), de 40 °C e 400 bar (Figura 5.1 b), de 50 °C e 300 bar (Figura 5.2 c) e de 50 °C e 400 bar (Figura 5.2 d). As curvas cinéticas de extração foram construídas com intuito de avaliar o comportamento da extração em termos de massa extraída (ou rendimento de extração) em função do tempo.

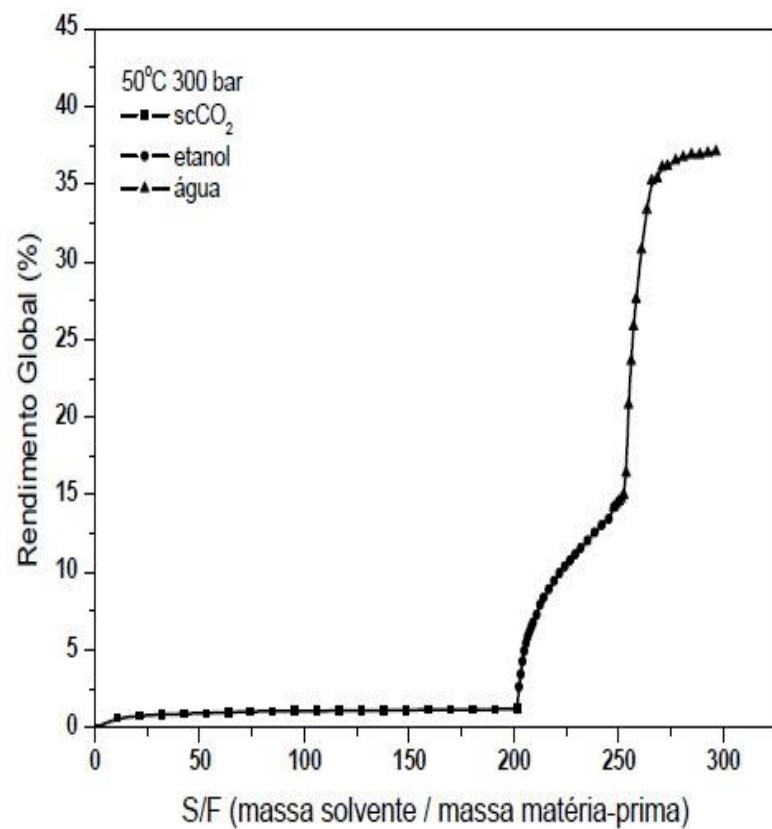


(a)

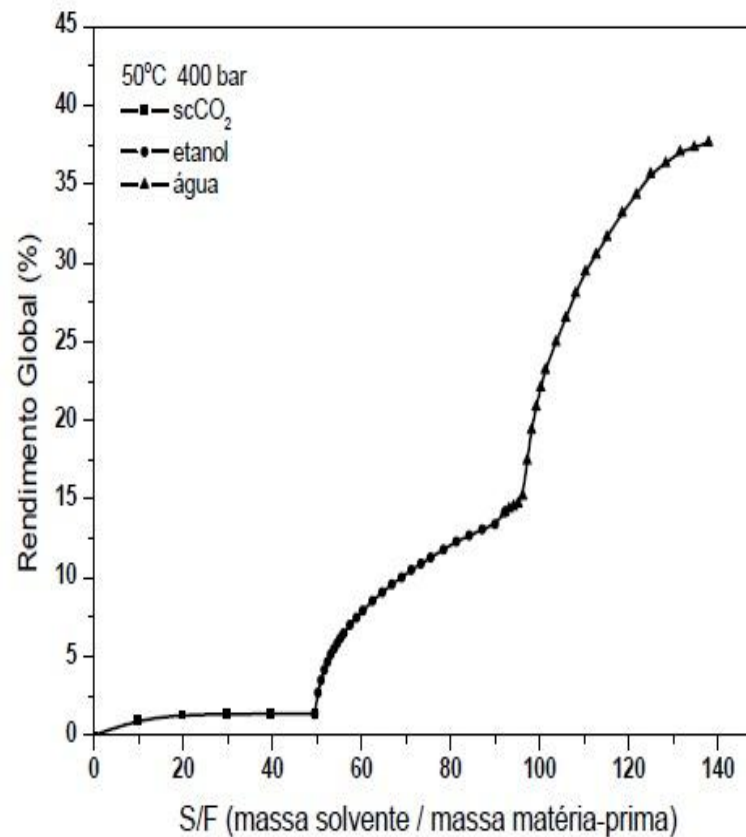


(b)

Figura 5.1 (a) Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra *A. chica*. (b) Cinética de extração a 40 °C e 400 bar de amostra de *A. chica*.



(c)



(d)

Figura 5.2 (c) Cinética de extração a 50 °C e 300 bar de amostra *A. chica*. (d) Cinética de extração a 50 °C e 400 bar de amostra de *A. chica*.

Estas curvas mostram o rendimento acumulado de extrato seco (descontando a massa de ácido cítrico incorporada) em função de S/F (massa de solvente utilizada na extração/ massa inicial de matéria-prima), indicando com isso a facilidade ou a dificuldade com que os solutos são extraídos. São parâmetros determinantes para essas curvas: a solubilidade dos solutos no scCO₂, no etanol ou na água e a polaridade do solvente, uma vez que a diferença de polaridade dos solventes permite a extração de diferentes compostos desejados em etapas distintas.

Os valores experimentais de rendimento de extração em função da massa de solvente são apresentados no Anexo C e representados nas Figuras 5.1, 5.2 e Figura 5.3. Na primeira etapa da extração com scCO₂ (Figura 5.3) os rendimentos globais variam entre 1,2 a 1,9 %. Na extração etanólica e aquosa subsequentes, os rendimentos de extração variaram entre 11,7 % a 13 % e entre 23 a 26 %, respectivamente. O rendimento total acumulado das três etapas, nas quatro condições operacionais de temperatura e pressão, variaram entre 37 % e 39 %, não diferindo entre si quanto ao rendimento global.

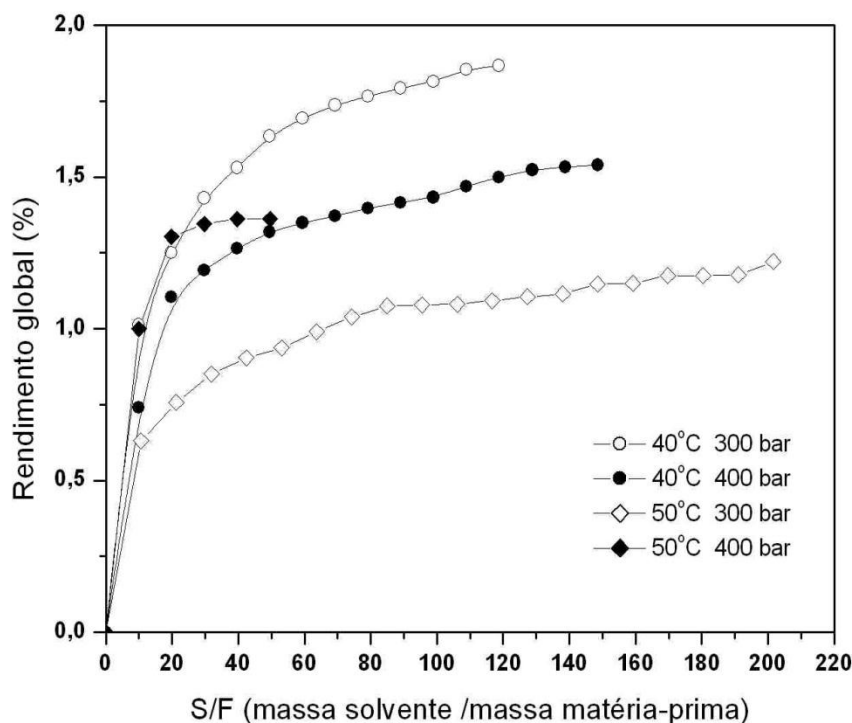


Figura 5.3 Cinética de extração nas quatro condições de operação utilizando como solvente o scCO₂.

Na primeira etapa (Figura 5.3) da extração à 40 °C e 300 bar (Figura 5.1 a), foi possível a extração de 77,9 % em relação ao total obtido na primeira etapa, com apenas 148,5 g (S/F=29,7) de solvente e duração média de uma hora e meia. Na etapa utilizando o etanol, foi possível a extração de 65,3 % do extrato desta etapa, em 300 minutos de extração, utilizando cerca de 150 mL de etanol e na etapa utilizando água, obteve-se um rendimento total de 26,3 %. No entanto ao decorrer da cinética foi visualizado o escurecimento das amostras, sendo necessária a modificação do processo para uma extração convencional aquosa. No processo utilizando a mesma temperatura, 40 °C e pressão de 400 bar (Figura 5.1b), extraiu-se 77,3 % do extrato total da primeira etapa, nos primeiros 148,5 g

de scCO₂ utilizado (S/F = 29,7). A segunda etapa foi realizada durante 1100 minutos e foi possível extrair 58,5 % do extrato nessa segunda etapa, durante os primeiros 300 minutos de extração. Na última etapa do processo, usando água como solvente, foi obtido um rendimento total de 24,6 %. No entanto também foi observado o escurecimento das amostras, sendo necessária a modificação no processo.

Na Figura 5.2 podem ser observadas as curvas de cinéticas de extração na temperatura de 50 °C e pressões de 300 bar e 400 bar. Observa-se que na condição de 50 °C e 300 bar (Figura 5.2a), nas primeiras 148,5 g (S/F=29,7) de scCO₂ foi possível a extração de 69,7% em relação ao total obtido na primeira etapa, já na segunda etapa, utilizando o etanol, nos primeiros 300 minutos de extração, obteve-se um rendimento de 73,59 % em relação ao total obtido nessa etapa e na terceira etapa, usando água como solvente foi obtido um rendimento total 22,9 %. Analisando o processo a 50 °C e 400 bar (Figura 5.2b), observa-se que na primeira etapa, 98,8 % foi obtido nos primeiros 148,5g (S/F=29,7) de scCO₂. Obteve-se um rendimento de 71,3 % durante a etapa de etanol, nos primeiros 300 minutos e na terceira etapa, utilizando a água como solvente, obteve-se um rendimento total de 23,5 % de extração. No entanto, conforme já descrito, a 50 °C também foi observado o escurecimento das amostras, sendo necessária a modificação no processo.

Considerando que nas extrações supercríticas, usou-se uma proporção S/F entre 100 e 200 (100 a 200 gramas de CO₂ por grama de matéria-prima) e obteve-se rendimentos máximos entre 1,2 a 1,9 % (massa de extrato por 100 g de matéria-prima), e que na etapa inicial da extração, com S/F= 30 iniciais extrai-se aproximadamente 80 % do total de extrato, e com S/F=170 restantes, extrai-se aproximadamente os outros 20 %. Adotou-se então S/F =30 para esta primeira etapa (90 minutos de extração ou 148,5 g de CO₂ em aproximadamente 5 g de matéria-prima).

Fazendo-se a mesma análise para a extração etanólica, usou-se uma proporção de S/F entre 42 a 86 (42 a 86 gramas de etanol por grama de matéria-prima) observa-se que o etanol extrai aproximadamente 70 % do total de extrato em 300 minutos iniciais de extração com S/F = 23,5, e os 30% restantes com S/F entre 18,5 a 16,5 finais. Adotou-se então o tempo de 300 minutos para extração etanólica.

Na extração aquosa, usou-se uma proporção S/F entre 38 a 47 (38 a 47 gramas de água por grama de matéria-prima) com rendimentos entre 23 a 26 % e pode-se observar pelas Figuras 5.1 e 5.2 que a extração é muito rápida, com apenas S/F=10 iniciais se extrai mais de 70 % do total de extrato. No entanto foi observado também o escurecimento das amostras, devido provavelmente a ação enzimática, sendo necessária a modificação no processo. Optou-se por fazer a última etapa (extração aquosa) por processo convencional na mesma temperatura do processo.

Depois de estabelecidos os intervalos de extração, foram realizados mais dois experimentos de cada condição experimental para o cálculo de rendimento global de extração.

5.2.2. Extração Sequencial em Leito Fixo em Duas Etapas

Através das cinéticas obtidas nas quatro condições experimentais e com base em testes preliminares cromatográficos, foi escolhida a condição de 40 °C e 300 bar para a realização das cinéticas de extração em duas etapas (Figuras 5.4; 5.5 e 5.6). A primeira etapa consistiu em uma extração prévia com scCO₂, utilizando 148,5g de solvente (S/F=30) e a segunda etapa foi realizada com mistura de scCO₂, etanol e água em diferentes proporções conforme descrito na seção de material e métodos 4.3.1.

As Figuras 5.4; 5.5 e 5.6 mostram às curvas de extração correspondentes à extração em leito fixo em duas etapas, onde a primeira etapa foi feita com scCO₂. Observa-se aumento no rendimento global de extração à medida que aumenta-se a proporção de água na mistura, sendo obtido um baixo rendimento (3,56 %) na cinética com mistura 80,8 % de scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água (Figura 5.4). Já nas misturas com 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1 % água (Figura 5.5) e 78,4 % scCO₂, 10,8 % etanol, 10,8 % água (Figura 5.6) os rendimentos obtidos foram de 31,7 % e 36,36 %, respectivamente.

Dificuldades no controle operacional foi encontrado no decorrer da cinética de extração, usando à mistura 78,4 % scCO₂, 10,8 % etanol, 10,8 % água. Isso provavelmente se deu devido à ocorrência de duas fases no sistema de extração (SEABRA et al., 2010). Por essa razão, optou-se pela retirada dessa condição experimental nos processos seguintes.

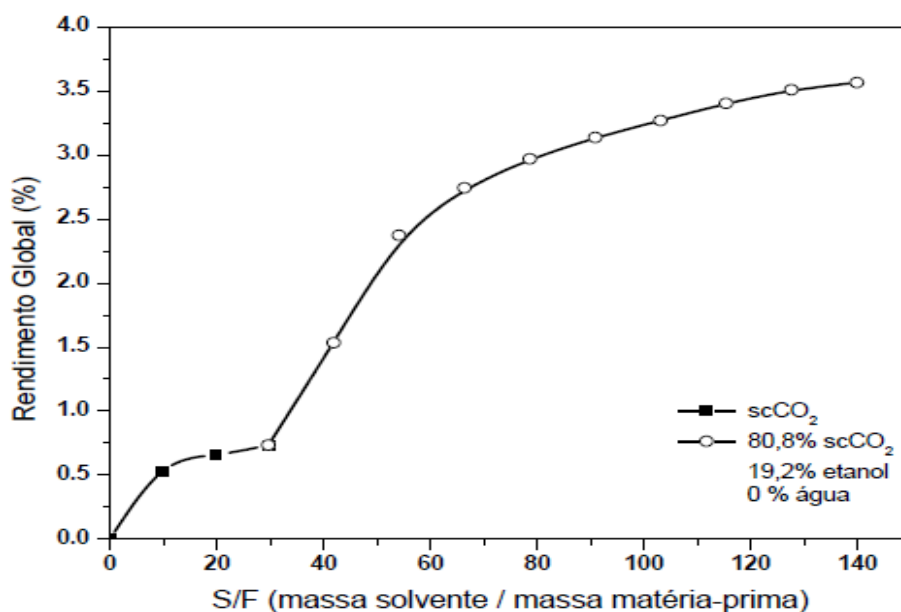


Figura 5.4 Cinética de extração a 40°C e 300 bar de amostra *A. chica* em duas etapas. segunda etapa: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol, 0 % água

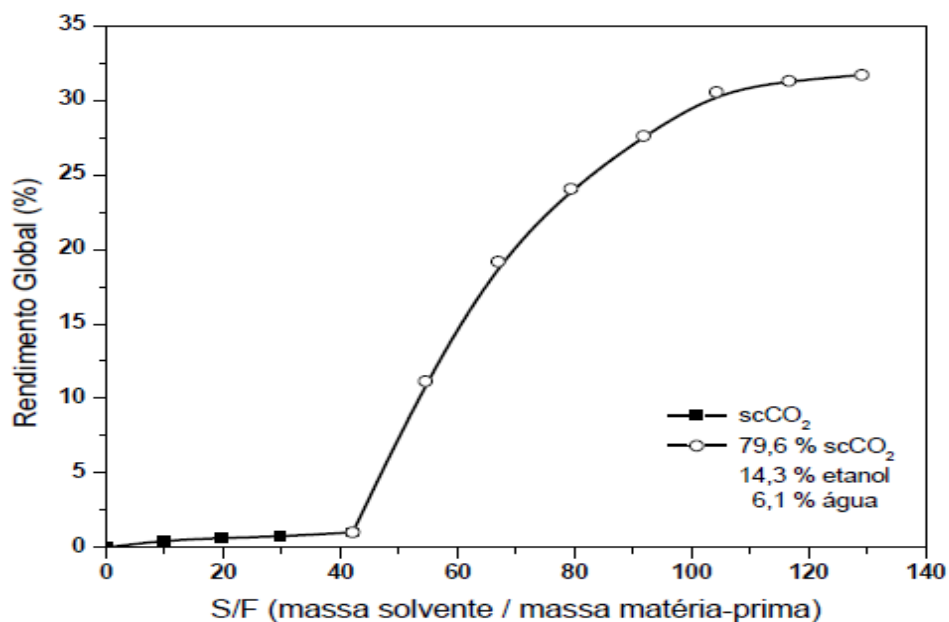


Figura 5.5 Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra *A. chica* em duas etapas: segunda etapa: 79,6 % CO₂, 14,3 % etanol, 6,1 % água

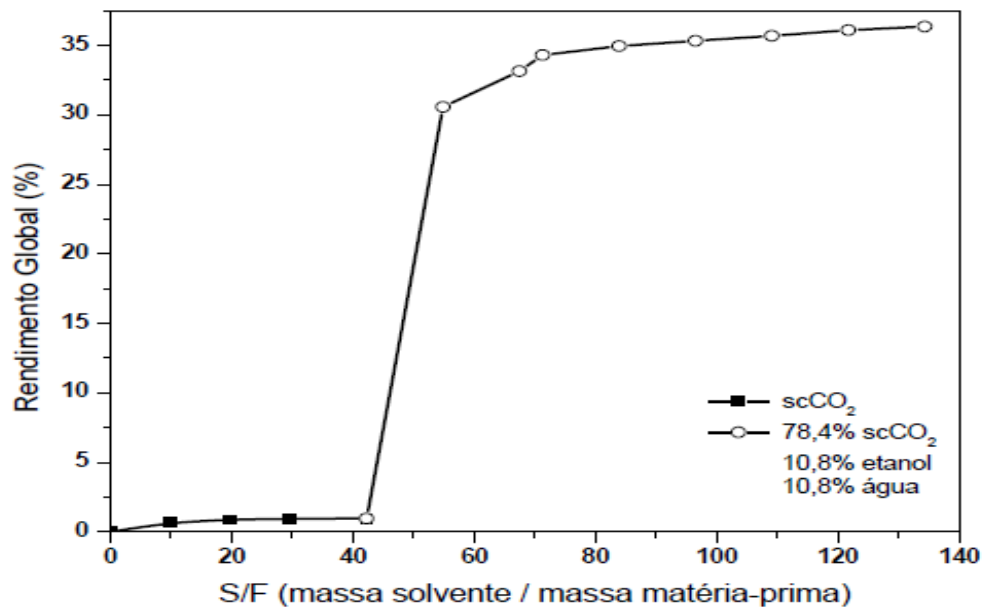


Figura 5.6 Cinética de extração a 40 °C e 300 bar de amostra *A. chica* em duas etapas. segunda etapa: 78,4 % scCO₂, 10,8 % etanol, 10,8 % água.

5.3. Rendimento de Extração

A Tabela 5.2 apresenta os valores de rendimento global de extração, de concentração e de rendimento de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais obtidos dos extratos de *A. chica*.

Tabela 5.2 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos de amostra de *A. chica* obtidos por meio da extração sequencial em leito fixo em três etapas.

Condição Experimental	Extrato	X _o (%)*	Y _o (%**)	Fenólicos Totais		Flavonoides Totais	
				C ₁	R	C ₂	R
40 °C - 300 bar	scCO ₂	0,7±0,1	-	69,3±1,5	0,5	131,1±0,9	0,9
	Etanólico	8,2±1,3	17,2±1,3	107±1	18,4	101,1±2,6	17,4
	Aquoso***	13,6±2,3	19,5±2,4	60,2±1,1	11,74	22±4	4,3
40 °C - 400 bar	scCO ₂	0,8±0,3	-	64,7±0,87	0,5	219,9±0,4	1,8
	Etanólico	9,5±2,1	18,5±2,1	75,8±1,3	14,0	85,3±1,7	15,8
	Aquoso***	13,1±2,6	18,9±0,0	40,5±0,8	7,65	17,9±3,0	3,4
50 °C - 300 bar	scCO ₂	0,8±0,16	-	39,8±1,5	0,3	125,8±0,2	1,0
	Etanólico	10,8±1,8	19,8±1,8	115,0±0,5	22,8	72,3±0,1	14,3
	Aquoso***	15,2±0,8	21,1±0,1	42,8±0,79	9,0	16,9±0,1	3,6
50 °C - 400 bar	scCO ₂	1,5±0,3	-	33,0±1,5	0,5	89,2±1,8	1,3
	Etanólico	10,8±1,5	19,6±1,9	126,9±0,5	24,9	48,7±3,2	9,6
	Aquoso***	13,6±0,9	19,5±0,9	27,8±0,2	5,4	9,7±0	1,9

*X_o: Rendimento global de extração (%), b.s.), descontando o ácido cítrico adicionado ** Y_o: Rendimento total de extração, não descontando a massa de ácido cítrico adicionada *** extrato aquoso convencional obtido a partir do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica). C₁: concentração (mg EAG/g extrato), C₂: concentração (mg EC/g extrato), R: rendimento (mg/g mp).

Na Figura 5.7 comparam-se os rendimentos globais dos extratos obtidos por extração com scCO₂ na primeira etapa, extração com etanol em uma segunda etapa e a extração aquosa convencional do resíduo 2 (resíduo da extração

etanólica) em um terceira etapa. Os resultados foram calculados a partir das médias dos experimentos conduzidos em triplicata.

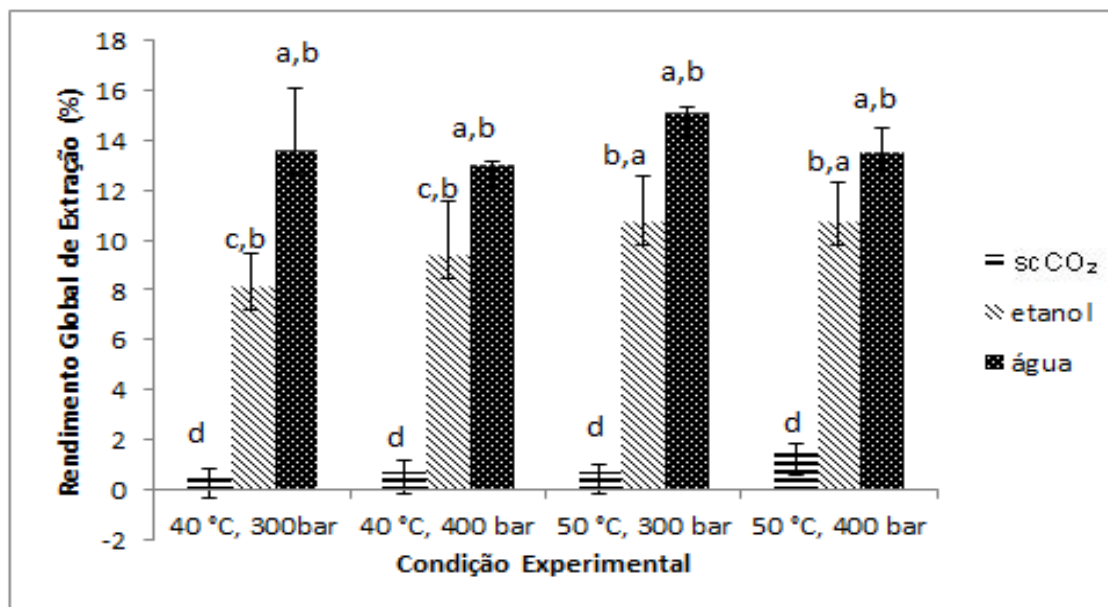


Figura 5.7 Valores médios dos rendimentos obtidos na extração sequencial em leito fixo em três etapas da amostra de *A. chica*. As barras representam valor da média \pm DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).

Através da Tabela 5.2 e Figura 5.7 observa-se que os maiores valores de rendimento foram obtidos quando utilizou-se a água como solvente, indicando que a polaridade do solvente influi sobre o rendimento de extração. As condições 40 °C e 300 bar, 40 °C e 400 bar, 50 °C e 400 bar, apresentaram um rendimento em torno de 13% e na condição de 50 °C e 300 bar, de aproximadamente 15 %, valores superiores quando comparado as extrações com etanol (solvente menos polar do que água) e scCO₂ (solvente apolar). Quando comparadas as diferentes condições experimentais, os rendimentos de extração na etapa aquosa não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

No processo de extração utilizando scCO₂, foi observado um aumento de rendimento de extração com aumento da temperatura e da pressão, mas não apresentaram diferenças significativas nas diferentes condições experimentais. Porém, quando comparado com os outros solventes das outras duas etapas, etanol e água, respectivamente, houve diferença estatisticamente significativa. Na segunda etapa, utilizando etanol, os rendimentos dos processos também apresentaram um aumento de rendimento de extração com aumento da temperatura e da pressão, mas não diferiram significativamente quando comparados nas diferentes condições experimentais. No entanto, na condição de 40 °C e 300 bar, o extrato etanólico diferiu-se estatisticamente dos extratos aquosos de todas as condições de temperatura e pressão estudadas. O extrato etanólico obtido na condição 40 °C e 400 bar apresentou também diferença significativa do extrato aquoso obtido na condição de 50 °C e 300 bar.

Em outras palavras os resultados, demonstraram que as condições de temperatura e pressão influenciam pouco no rendimento global obtido nos diferentes extratos. Por outro lado, a polaridade do solvente exerceu uma forte influência no rendimento global, uma vez que o CO₂ é apolar, e a polaridade vai aumentando de acordo com o caráter do solvente: etanol (polaridade=5,2) e água (polaridade=9,0) (BYERS, 2013).

A Tabela 5.3 apresenta os valores de rendimento global de extração, concentração e rendimento de fenóis totais e concentração e rendimento de flavonoides totais dos extratos de *A. chica* obtidos em extração sequencial em leito fixo em duas etapas a 40 °C e 300 bar, com extração prévia com scCO₂ na primeira etapa, uma mistura em diferentes proporções de scCO₂, etanol e água na segunda etapa, seguido de extração aquosa convencional do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica). Os resultados foram calculados a partir das médias dos experimentos conduzidos em triplicata.

Tabela 5.3 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos de amostra de *A. chica* obtidos em duas etapas da amostra de *A. chica* a 40 °C e 300 bar, com extração prévia com scCO₂ na primeira etapa, uma mistura em diferentes proporções de scCO₂, etanol e água na segunda etapa, seguido de extração aquosa convencional do resíduo 2.

Condição Experimental	Extrato	X _o (%) [*]	Y _o (%) ^{**}	Fenólicos Totais		Flavonoides Totais	
				C ₁	R	C ₂	R
80,8% CO₂, 19,2% etanol, 0% água	scCO ₂	0,7±0,1	-	69,3±1,5	0,5	131,1±0,86	0,9
	Mistura	2,4±0,2	-	178,2±0,8	4,3	373,2±1,2	9,1
	Aquoso ^{***}	17,9±2,1	23,9±2,1	60,3±1,3	14,4	24,1±0,32	5,8
79,6% CO₂, 14,3% etanol, 6,1% água	scCO ₂	0,7±0,1	-	69,3±1,5	0,5	131,1±0,86	0,9
	Mistura	50,2±19,6	-	62,1±0,6	31,2	31,5±3,2	15,8
	Aquoso ^{***}	1,6±0,2	7,48±0,3	13,1±1,4	1,0	12,5±0,0	0,9

*X_o: Rendimento global de extração (%; b.s.), descontando o ácido cítrico adicionado ** Y_o: Rendimento total de extração, não descontando a massa de ácido cítrico adicionada *** extrato aquoso convencional obtido a partir do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica). C₁: concentração (mg EAG/g extrato), C₂: concentração (mg EC/g extrato), R: rendimento (mg/g mp).

Na Figura 5.8 comparam-se os rendimentos globais dos extratos obtidos na segunda etapa (misturas constituídas de scCO₂/etanol/água) e na extração aquosa. Observa-se novamente que o caráter do solvente utilizado influenciou significativamente no rendimento global de extração. Na proporção empregada (80,8:19,2:0) scCO₂, etanol, água, respectivamente, obteve-se um rendimento aproximadamente de 2,4 % ± 0,2, rendimento inferior (exceptuando-se o extrato supercrítico) a todos os rendimentos obtidos nesse trabalho. À medida que aumentou-se a quantidade de água presente na mistura de 0 % para 6,1 %, o rendimento aumentou de 2,4 % para 50,2 %. Porém, essa condição experimental foi obtida com um alto desvio padrão, reflexo da dificuldade encontrada na estabilização do sistema, provavelmente devido à presença de duas fases (L-V)

geradas. Comparando os dados referentes ao extrato aquoso convencional a partir do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica), observamos um esgotamento do leite na proporção (79,6:14,3:6,1) scCO₂, etanol, água, respectivamente, com rendimento de 1,61 % evidenciando que a maioria dos compostos extraíveis foram obtidos na segunda etapa do processo.

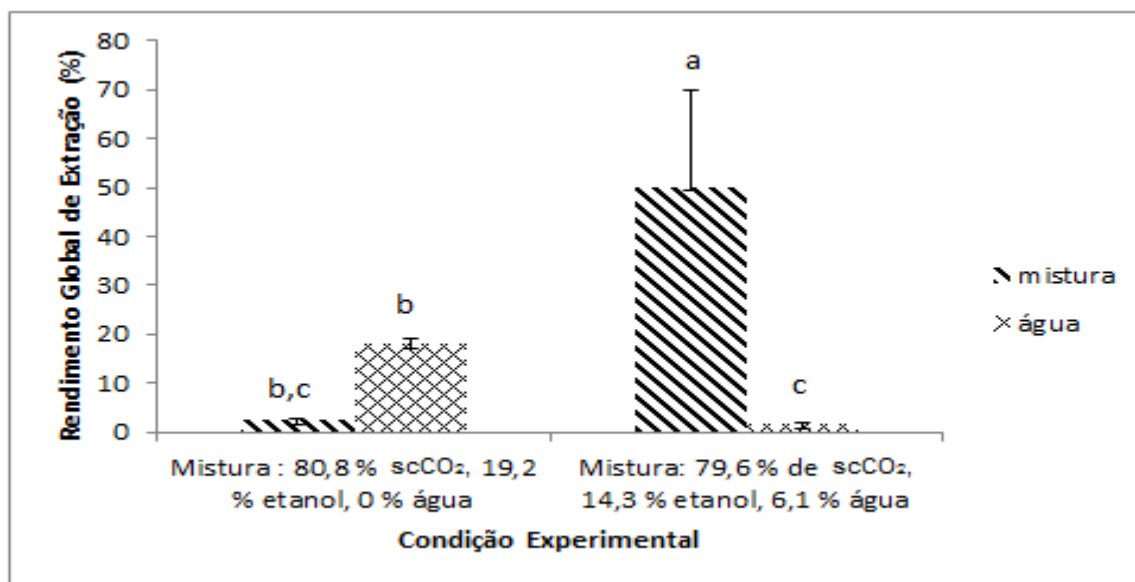


Figura 5.8 Valores médios dos rendimentos obtidos na extração sequencial em leito fixo em duas etapas da amostra de *A. chica* a 40 °C e 300 bar, com extração prévia com scCO₂ na primeira etapa, uma mistura em diferentes proporções de scCO₂, etanol e água na segunda etapa seguido de extração aquosa convencional do resíduo 2 (resíduo da extração etanólica). As barras representam valor da média ± DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).

Com o intuito de comparação de dados, foram realizadas seis extrações convencionais de amostras de *A. chica*, sendo uma etanólica utilizando somente etanol acidificado com ácido cítrico 0,3 %, duas extrações hidroalcoólicas 70:30

(v/v) acidificadas com ácido cítrico 0,3 %, sendo uma realizada a temperatura e pressão ambiente e a outra realizada a 40 °C e 300 bar na unidade de extração em leito fixo descrita na seção 4.3.1 deste trabalho, e três extrações aquosas: 40 °C com água acidificada com ácido cítrico 0,3 % , 50 °C e 80 °C com água acidificada com ácido cítrico 0,3 %. Os dados de rendimentos de extração, fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos convencionais estão mostrados na Tabela 5.4 e Figura 5.10.

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3 % a 40 °C e 300 bar na unidade de extração em leito fixo, em uma primeira etapa foi obtido a curva de cinética de extração, plotando rendimento global por tempo (Figura 5.9).

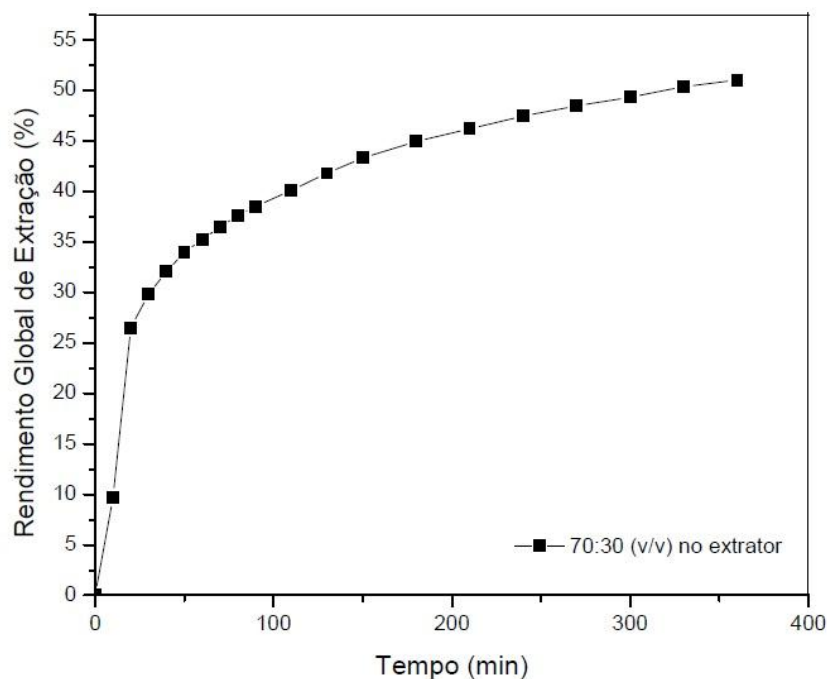


Figura 5.9 Cinética de extração convencional hidroalcoólica 70:30 (v:v) acidificada com ácido cítrico 0,3 % a 40 °C e 300 bar na unidade de extração em leito fixo.

Analisando a Figura 5.9, observa-se que logo nos primeiros 20 minutos de extração obteve-se um rendimento superior a 26 % e ao fim dos 360 minutos estudados o leito não foi esgotado. Uma vez que, para a obtenção dos demais extratos convencionais etanólicos ou hidroalcoólicos, o tempo de extração é em média de 270 minutos e para obtenção dos extratos etanólicos em leito fixo foi estabelecido o tempo de 300 minutos, adotou-se para essa condição um tempo total de extração também de 300 minutos.

Durante a realização desta cinética foi observada nos dois primeiros frascos de amostragem uma grande quantidade de material sólido no fundo, e com a realização da duplicata desse processo esse fato não foi observado, evidenciando que possivelmente tenha ocorrido alguma falha operacional no processo. Sendo assim, a curva de cinética foi desconsiderada para os cálculos de rendimento de extração global para esse processo.

Na Tabela 5.4 verifica-se um baixo rendimento de 3,0% na extração convencional etanólica. No entanto, à medida que usa-se uma mistura hidroalcoólica com 70 % de etanol esse rendimento aumenta para 29 % e 22,9 %, valores observados para as extrações realizadas a temperatura ambiente e pressão atmosférica e para a extração realizada em extrator de leito fixo a 40 °C e 300 bar, respectivamente.

Tabela 5.4 Rendimentos de extração, compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos diferentes extratos convencionais da amostra de *A. chica*.

Extrato convencional	Condição Experimental	X _o (%) [*]	Y _o (%) ^{**}	Fenólicos Totais		Flavonóides Totais	
				C ₁	R	C ₂	R
Etanólico	100 %	3,0±0,5	7,48±0,5	112,9±0,6	8,4	108,4±1,8	8,1
	70:30	29,0±2,3	33,5±2,3	122±1	40,9	82,6±0,1	27,7
Hidroalcoólico	70:30 no extrator	22,9±0,9	31,9±0,9	100,2±0,5	32,0	96,6±2,2	30,8
	40°C	17,5±2,3	23,4±2,3	39,2±1,7	9,2	21,4±1,3	5,0
Aquoso	50°C	18,8±1,6	18,8±1,6	119,3±1,2	22,4	43,3±3,3	8,1
	80°C	18,6±0,6	24,4±0,5	67,5±1,7	16,5	33,2±0,8	8,1

*X_o: Rendimento global de extração (% b.s.), descontando o ácido cítrico adicionado ** Y_o: Rendimento total de extração, não descontando a massa de ácido cítrico adicionada. C₁: concentração (mg EAG/g extrato), C₂: concentração (mg EC/g extrato), R: rendimento (mg/g mp).

Na Figura 5.10 observa-se que os extratos hidroalcoólicos obtidos diferiram estatisticamente entre si, o que demonstra que para esse caso, a temperatura e pressão influenciaram estatisticamente para o rendimento global de extração.

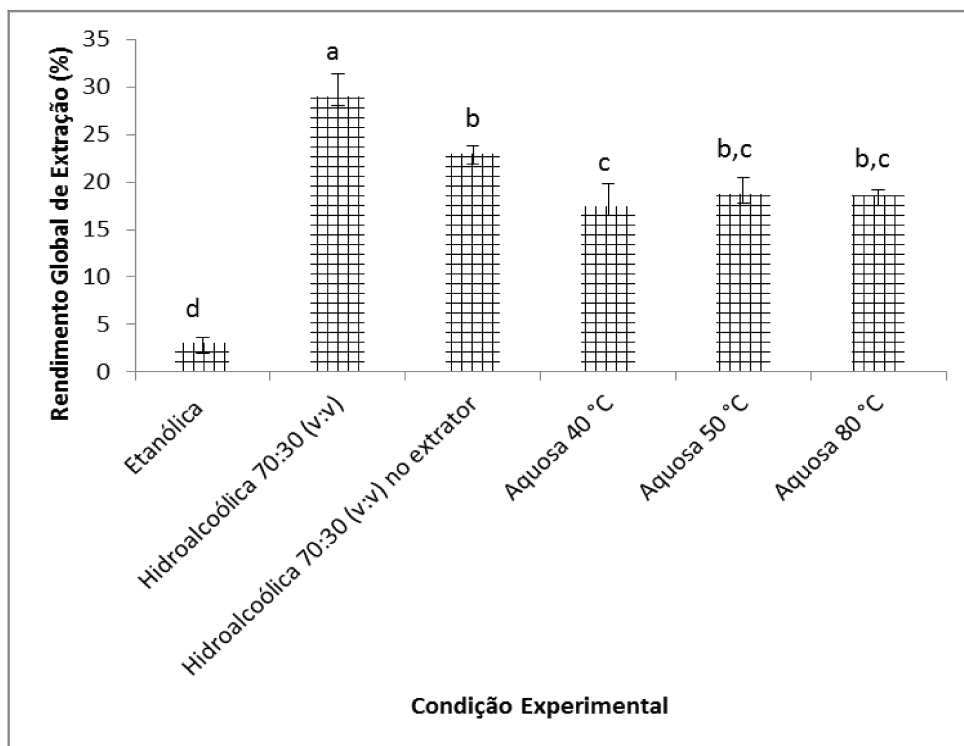


Figura 5.10 Valores médios dos rendimentos obtidos nas extrações convencionais de amostra de *A. chica*. As barras representam valor da média \pm DP dos ensaios em triplicata, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (Teste de Tukey a nível de 5 % de significância).

Os extratos aquosos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo que o maior rendimento obtido foi 18,8 %, na extração a 50 °C sem adição de ácido cítrico.

5.4. Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais

A Figura 5.11 apresenta os dados das Tabelas 5.2, 5.3 e 5.4 para a concentração de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos em extração sequencial (processos sequenciais em três ou duas etapas) e dos extratos obtidos

por processos convencionais. Observa-se que os extratos etanólicos obtidos tanto de forma convencional quanto no extrator em leito fixo apresentaram conteúdos de compostos fenólicos totais superiores aos conteúdos com outros solventes, sendo que o processo realizado com a mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % de etanol e 0 % de água foi o que apresentou maior concentração de compostos fenólicos (178,2 mg EAG/g extrato). Tal fato foi observado também por Correa (2010), que estudou o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos da *Cúrcuma longa* e *Bindens pilosa* e verificou uma alta concentração de compostos fenólicos tanto nos extratos que envolviam o etanol em uma etapa quanto no extrato com scCO₂ e etanol, em duas etapas.

Nos extratos aquosos ou no extrato da mistura que contém uma fração de água (79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol e 6,1 % de água), a concentração dos compostos fenólicos foi inferior comparada aos demais solventes. Porém, o extrato obtido convencionalmente a 50 °C sem adição de ácido cítrico apresentou um teor de 119,3 mg EAG/g de extrato, bem superior aos demais extratos aquosos.

Todos extratos obtidos com scCO₂ apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Observou-se uma diminuição dos compostos fenólicos com o aumento da temperatura e pressão, sendo a maior concentração (69,3 mg EAG/g extrato) obtida na condição de operação 40 °C e 300 bar.

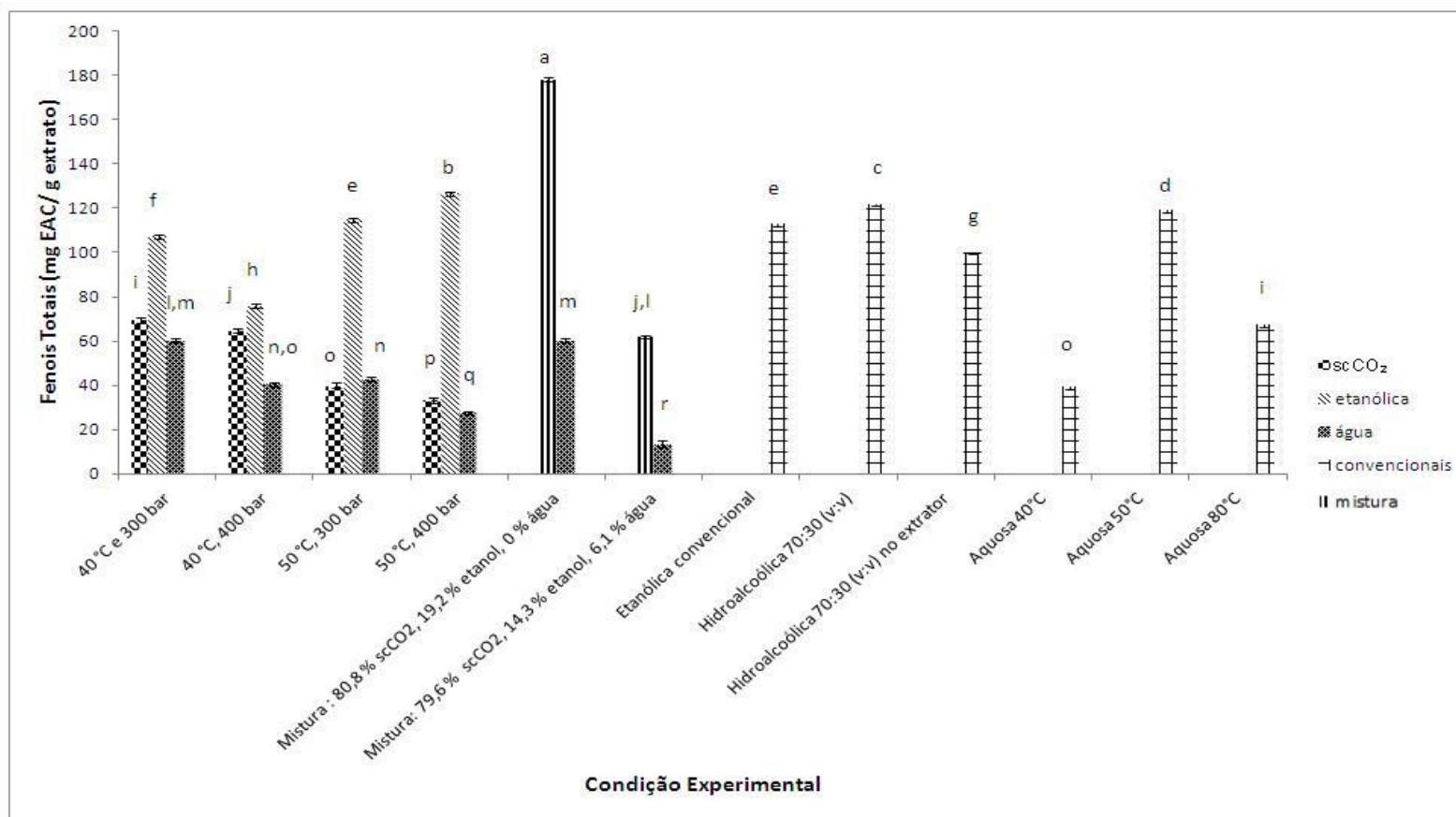


Figura 5.11 Teor de compostos fenólicos totais para os diferentes extratos obtidos em leito fixo (em duas ou três etapas), com os respectivos extratos aquosos convencionais e os extratos convencionais. As barras representam os valores médio dos ensaios, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Na Figura 5.12, estão representados os dados da Tabela 5.2, 5.3 e 5.4 para a concentração de flavonoides totais nos extratos obtidos em extração sequencial (processos sequenciais em três ou duas etapas) e dos extratos obtidos convencionalmente.

Em geral, os extratos obtidos com scCO₂ apresentaram concentração de flavonoides totais superiores quando comparados com os outros solventes, sendo que a maior concentração obtida foi de 373,2 mg EC/ g extrato no processo realizado com a mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % de etanol e 0 % de água. Os extratos obtidos com scCO₂ na condição de 40 °C e 300 bar e 50 °C e 300 bar, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que demonstra que a temperatura não influenciou na concentração de flavonoides totais nesses extratos. O extrato obtido com scCO₂ na condição de 50 °C e 400 bar não apresentou diferença estatisticamente significativa no teor de flavonoides totais quando comparado aos dois extratos convencionais hidroalcoólicos.

Os extratos etanólicos obtidos nos processo em extrator em leito fixo, em três etapas, apresentaram diferenças estatisticamente significativas. No entanto, o extrato etanólico obtido na condição de 50 °C e 300 bar não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao teor de flavonoides totais, quando comparado com o extrato etanólico convencional.

A concentração de flavonoides nos extratos obtidos no processo de extração em leito fixo em três etapas, diminuiu com o aumento da pressão e temperatura. Os extratos aquosos obtidos convencionalmente apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que evidencia a influência da temperatura no teor de flavonoides totais.

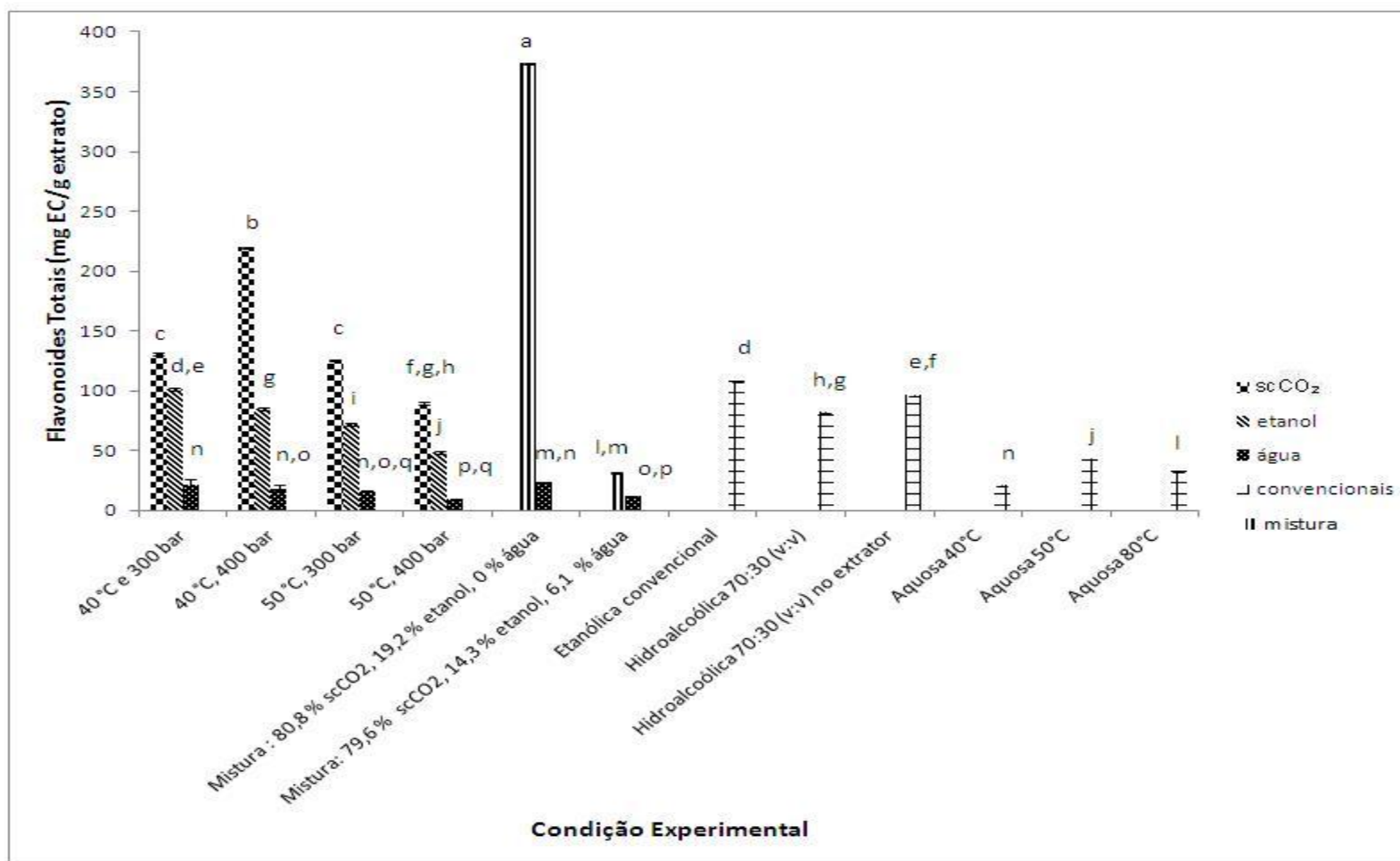


Figura 5.12 Teor de flavonoídes totais para os diferentes extratos obtidos em leito fixo (em duas ou três etapas), com os respectivos extratos aquosos convencionais e os extratos convencionais. As barras representam os valores médio dos ensaios, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Port's (2011) estudou o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais em uma infusão feita com 0,5 gramas de folhas de *A. chica* e água destilada a $98\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e obteve um teor de 266,94 mg EAG/g de compostos fenólicos totais e 9,61 mg EC/g de flavonoides totais. Observa-se que o valor de compostos fenólicos relatado por Port's (2011) é bem superior aos encontrados neste trabalho, porém o valor de flavonoides totais é inferior a todos relatados neste trabalho. Esse fato pode ser explicado pela diferença de metodologias utilizadas.

Observou-se que o teor de flavonoides totais nos extratos supercríticos foi superior ao teor de compostos fenólicos totais (Tabelas 5.2 e 5.3), não sendo observado nos extratos etanólicos e aquosos. Estes valores mostraram um perfil diferente dos valores que se esperava, pois os flavonoides estão incluídos na classe dos compostos fenólicos totais. Correa (2010), apresentou valores praticamente iguais entre teores de flavonoides e compostos fenólicos totais nos extratos supercríticos. Isto se deve a alguma classe específica de fenólicos que são extraídos com scCO₂.

Silva et al., (2007) obtiveram um extrato misto de amostra de *A. chica* com metanol, etanol, água destilada e ácido clorídrico (69:20:10:1) sob agitação magnética por 24 horas. O extrato obtido apresentou rendimento de 10,2 mg EAG/g de folhas secas e 0,06 mg EC/g de folhas secas, para compostos fenólicos totais e flavonoides totais, respectivamente, valores inferiores ao encontrado neste trabalho. No entanto, os autores utilizaram matéria-prima fresca (resultado em base úmida), e neste trabalho foram utilizadas amostras secas, o que pode ter resultado na concentração destes compostos, tanto para compostos fenólicos totais como para flavonóides.

5.5. Quantificação de Antocianinas pelo Método do pH Diferencial

Testes preliminares para quantificação de antocianinas monoméricas pelo método de pH diferencial foram realizados com os diferentes extratos de *A. chica*. No entanto, quando colocadas em solução tampão pH 1,0 apresentaram uma coloração amarelada enquanto em solução tampão pH 4,5 apresentaram uma coloração laranja (Figura 5.13).

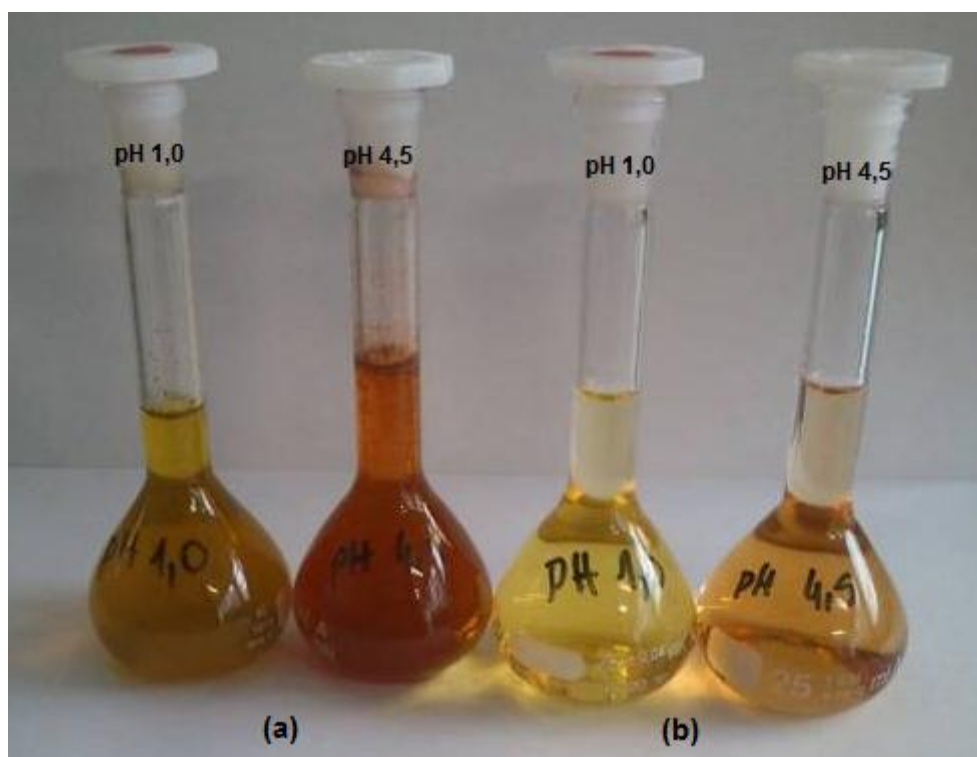


Figura 5.13 Soluções em diferentes valores de pH, utilizados para análise de pH diferencial nos extratos de *A. chica* (a) mistura 80,8% de scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água, (b) extrato convencional aquoso 50 °C

O princípio usado para quantificação de antocianinas monoméricas pelo método de pH diferencial para maioria das frutas não apresentam absorvância significativa em pH 4,5 (GIUSTI & WROLSTAD, 2001) e em soluções ácidas apresentam coloração do avermelhada ao violeta (AWIKA et al., 2004). No entanto

as 3-desoxiantocianidinas presentes na *A. chica* mostraram absorvência significativa em pH 4,5, sendo assim o método pH diferencial para quantificação de antocianinas não é apropriado para *A. chica*.

Awika et al. (2004) estudaram as propriedades das 3-desoxiantocianidinas provenientes do sorgo e verificaram a produção de um pigmento amarelo (apigeninidina) e laranja (luteolinidina) em solventes ácidos, indicando que o método de pH diferencial não é o mais apropriado para estimar as antocianinas monoméricas no sorgo.

O mais importante é mostrar que as 3- desoxiantocinidinas apresentam maior estabilidade em valores de pH maiores do que as antocianinas monoméricas (AWIKA et al., 2004).

5.6. Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todos os extratos obtidos neste trabalho foram codificados e encaminhados para o CPQBA para análise cromatográfica qualitativa e quantitativa. A concentração do pigmento 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium (carajurina) e da flavona (luteolina) presentes nos extratos de *A. chica* foram obtidas através da curva de calibração por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de UV em arranjos de diodos. Além disso foram monitorados os pigmentos 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium, 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium, pigmentos 1 e 2, respectivamente.

A Tabela 5.5 apresenta os picos dos quatro marcadores analisados por CLAE (componente, tempos de retenção, massa molar e metodologia utilizada).

Tabela 5. 5 Picos e tempos de retenção dos marcadores utilizados

Pico	Componente	TR (min)	MM (g/mol)	Metodologia
1*	6,7,3',4' – tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium	22	301	Devia et al., 2002
2*	6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilium	24	285	Devia et al., 2002
3*	6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (Carajurina)	30	299	Devia et al., 2002
4**	2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-chromenona (Luteolina)	16	286	Wang & Li, 2007

TR: tempo de retenção; MM: massa molar, * 470 nm ** 350 nm

Os cromatogramas obtidos por CLAE estão representados nas Figuras 5.14, 5.15 e 5.16. A Figura 5.14 (2º etapa: mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água) e Figura 5.15 (2º etapa: mistura: 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol e 6,1 % água) mostram o efeito da mistura utilizada na segunda etapa do processo (40 °C e 300 bar). Observa-se que a presença da água na mistura (Figura 5.15) ocasionou uma diminuição na concentração dos compostos extraídos. Na Figura 5.16 observa-se os cromatogramas a partir dos extratos obtidos por scCO₂, etanol, água na condição de 40 °C e 300 bar e mostram qualitativamente uma diferença de composição entre os extratos. Os extratos com scCO₂ foram mais seletivos, pois extraíram uma menor quantidade de compostos diferentes quando comparados com os extratos etanólicos e aquosos (Figura 5.16).

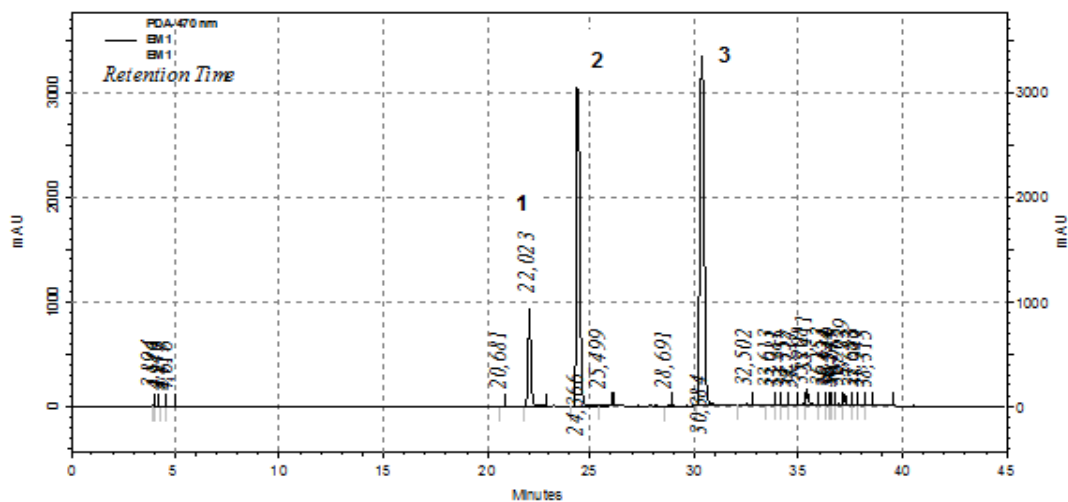


Figura 5.14 Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO_2 , 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

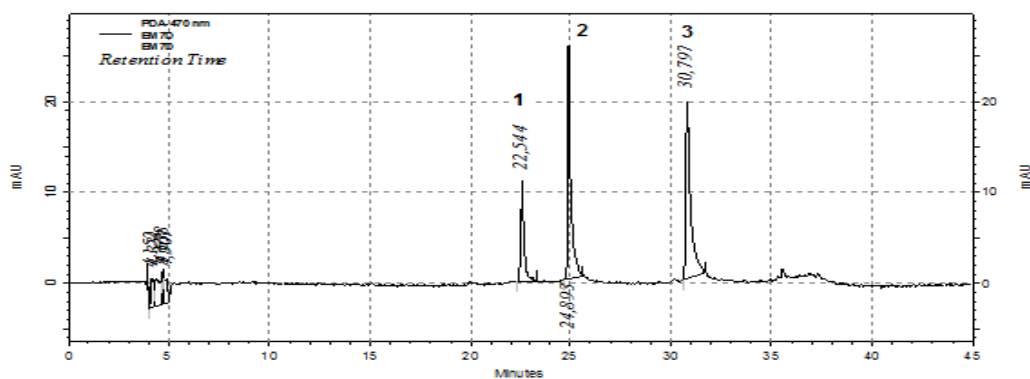
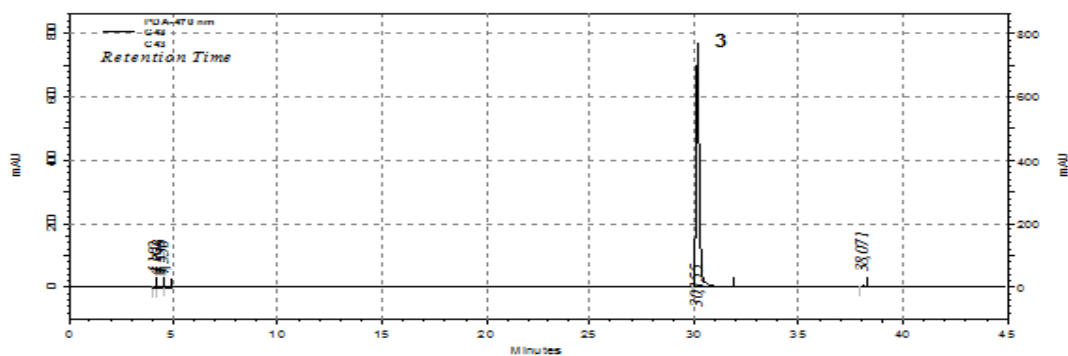
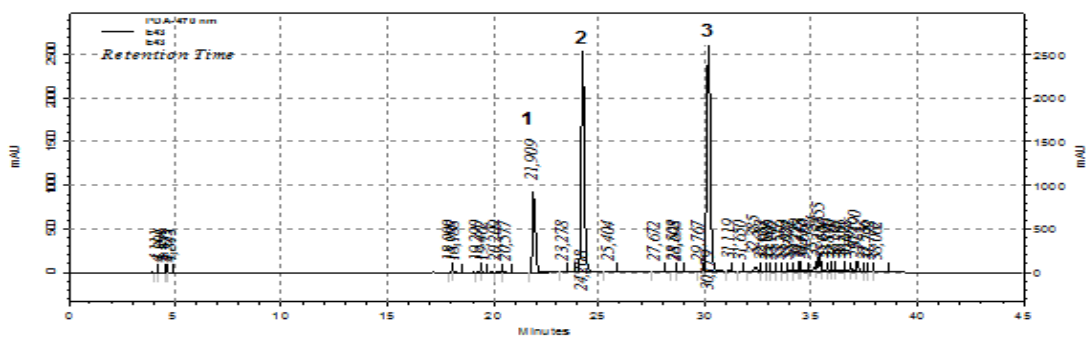
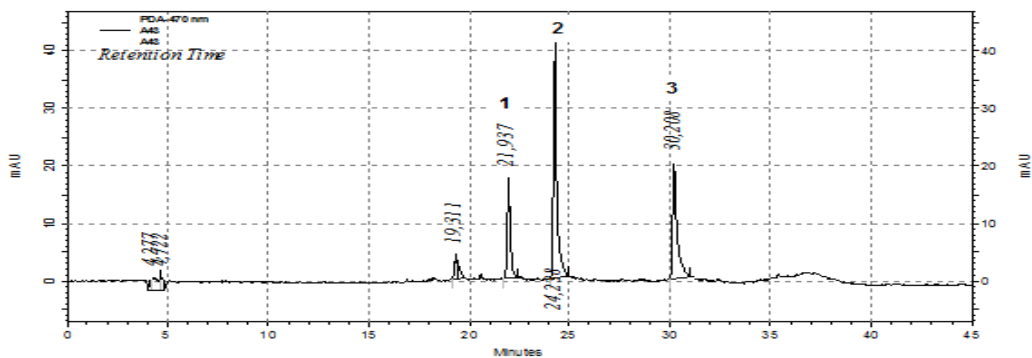


Figura 5.15 Cromatograma do extrato 2° etapa: mistura 79,6 % scCO_2 , 14,3 % etanol, 6,1% água (EM7) a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

(a) scCO₂

(b) etanólico



(c) aquoso residual

Figura 5.16 Cromatograma dos extratos de *A. chica* a 40 °C e 300 bar em três etapas (a) scCO₂ (C43) (b) etanol (E43) (c) aquoso residual (A43). Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

Na Tabela 5.6, reúnem-se os valores dos rendimentos globais de todos os extratos e as respectivas concentrações de carajurina e luteolina, que foram obtidas pela análise cromatográfica, cujos cromatogramas encontram-se nos Anexos E e F. A concentração de carajurina e de luteolina foi apresentada em porcentagem mássica (grama de soluto por 100 gramas de extrato) e o rendimento de extração foi calculado considerando o rendimento global e a concentração no extrato, obtendo-se o rendimento de extração em mg de soluto extraído por grama de amostra de folhas de *A. chica*. Como não existem padrões dos outros dois pigmentos antociânicos (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium, as concentrações não puderam ser calculadas. Desta forma a concentração foi calculada utilizando-se a curva padrão da carajurina e a concentração foi expressa como equivalente de carajurina.

Tabela 5.6 Concentração e rendimento de extração da carajurina e luteolina presentes no extratos de *A. chica*

Código	Amostra	Y _o (%)	Carajurina (3)		Luteolina		(1)*	(2)*	Σ CE
			C (%)	R	C	R	CE	CE	CE
C43	1° etapa: scCO ₂ , 40 °C e 300 bar	0,65*	3,28	0,213	0	0	0	0	3,28
E43	2° etapa: etanol acidificado, 40 °C e 300 bar	17,2	8,13	6,66	0,225	0,184	2,05	6,40	16,6
A43	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 40 °C	19,5	0,49	0,956	0	0	0,28	0,77	1,54
C44	1° etapa: scCO ₂ , 40 °C e 400 bar	0,82*	3,68	0,302	0	0	0	0	3,68
E44	2° etapa: etanol acidificado, 40 °C e 400 bar	18,5	8,15	15,1	0,19	0,180	1,78	6,04	16,0
A44	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 40 °C	18,9	0,36	0,680	0	0	0,197	0,58	1,14
C53	1° etapa: scCO ₂ , 50 °C e 300 bar	0,83*	3,82	0,317	0	0	0	0	3,82
E53	2° etapa: etanol acidificado, 50 °C e 300 bar	19,8	7,38	14,6	0,224	0,241	1,59	5,4	14,4
A53	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 50 °C	21,1	0,38	0,802	0	0	0,25	0,705	1,34
C54	1° etapa: scCO ₂ , 50 °C e 400 bar	1,5*	0,34	0,051	0	0	0	0	0,34
E54	2° etapa: etanol acidificado, 50 °C e 400 bar	19,6	9,27	18,2	0,151	0,163	1,72	5,84	16,8
A54	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 50 °C	19,5	0,5	0,975	0	0	0,292	0,850	1,64
C43	1° etapa: scCO ₂ , 40 °C e 300 bar	0,65*	3,28	0,213	0	0	0	0	3,28
EM1	2° etapa: 80,8 % scCO ₂ , 19,2 % etanol, 0 % água, 40 °C e 300 bar	2,44*	7,71	1,88	0,611	0,149	0,526	3,53	11,8
AM1	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 40 °C	23,9	0,43	1,03	0,090	0,161	0,260	0,70	1,39
C43	1° etapa: scCO ₂ , 40 °C e 300 bar	0,65*	3,28	0,213	0	0	0	0	3,28
EM7	2° etapa: 79,6 % scCO ₂ , 14,3 % etanol, 6,1 % água, 40 °C e 300 bar	50,2*	2,52	12,7	0,209	1,049	0,971	2,29	5,78
AM7	3° etapa: aquosa acidificada convencional residual, 40 °C	7,48	0	0	0	0	0	0	0
ECE7	hidroalcolica convencional no extrator etanol agua (70:30) (v:v) acidificada	31,9	7,09	22,6	0,515	1,178	1,90	6,01	15,0
EC7	hidroalcolica convencional etanol agua (70:30) (v:v) acidificado	33,5	5,78	19,4	0,901	2,611	1,90	5,00	12,7
EC1	etanólica convencional etanol 100 % - acidificado	7,48	10,01	7,48	0,228	0,068	1,82	6,24	18,1
A40	aquosa acidificada convencional, 40 °C	23,4	0,6	1,40	0	0	0,324	0,915	1,84
A50	aquosa convencional, 50 °C (não acidificada)	18,8*	1,02	1,92	0,147	0,276	0,536	1,29	2,85
A80	aquosa acidificada convencional, 80 °C	24,4	0,73	1,78	0,107	0,199	0,570	1,19	2,49

* Y_o = Rendimento (% b.s.), extratos sem adição de ácido cítrico **C** = concentração (% mássica); **R** = rendimento (mg/g de folhas); **Y_o** = rendimento global de extração (excluindo ácido cítrico adicionado) (1)* e (2)* = compostos (1) e (2) do carajurá. CE = concentração em equivalente de carajurina.

Na Figura 5.18. comparam-se as concentrações de carajurina nos diferentes extratos obtidos de *A. chica*. Em geral, os extratos etanólicos apresentaram uma maior concentração de carajurina quando comparados com outros solventes. Além disso, observa-se que a extração prévia com scCO₂ melhora a concentração dos extratos etanólicos nos processos sequenciais em três etapas. Porém, como mostrado pelos cromatogramas, os extratos supercríticos apresentaram apenas a carajurina, uma vez que o CO₂ supercrítico foi mais seletivo, fato que pode ser explicado pela polaridade da carajurina [menor quantidade de grupos OH comparado aos pigmentos (1) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (2) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium (Figura 5.17). Nos extratos obtidos com scCO₂, observa-se que na temperatura de 50 °C, o aumento da pressão ocasiona uma diminuição consideravelmente da concentração de carajurina. A maior concentração de carajurina nos extratos obtidos por scCO₂ foi obtido na condição de 50 °C e 300 bar (C53). Nos extratos etanólicos obtidos a maior concentração de carajurina foi obtida no extrato convencional etanólico (EC1), no entanto esse extrato possui um baixo rendimento de extração, conseqüentemente obtém-se um baixo rendimento de carajurina no extrato. Os extratos aquosos apresentaram baixa concentração de carajurina, sendo a maior concentração obtida no extrato convencional á 50 °C (A50).

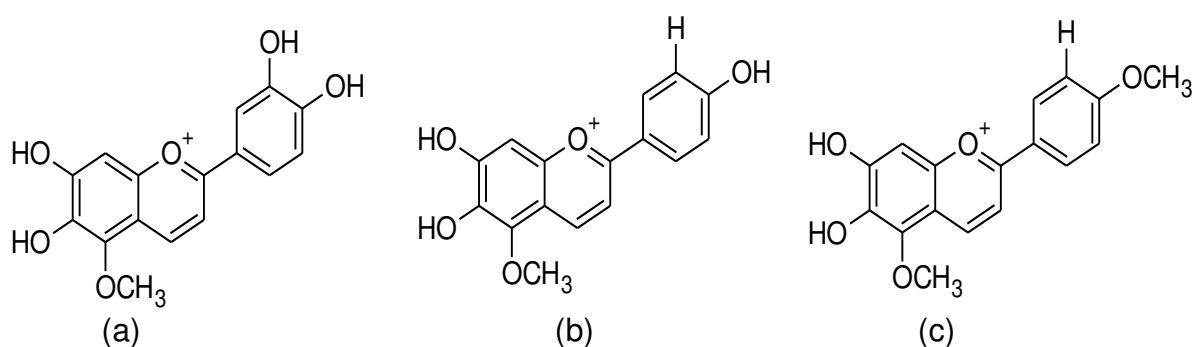


Figura 5.17 Estrutura molecular (a) 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium (b) 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium, (c) carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium)

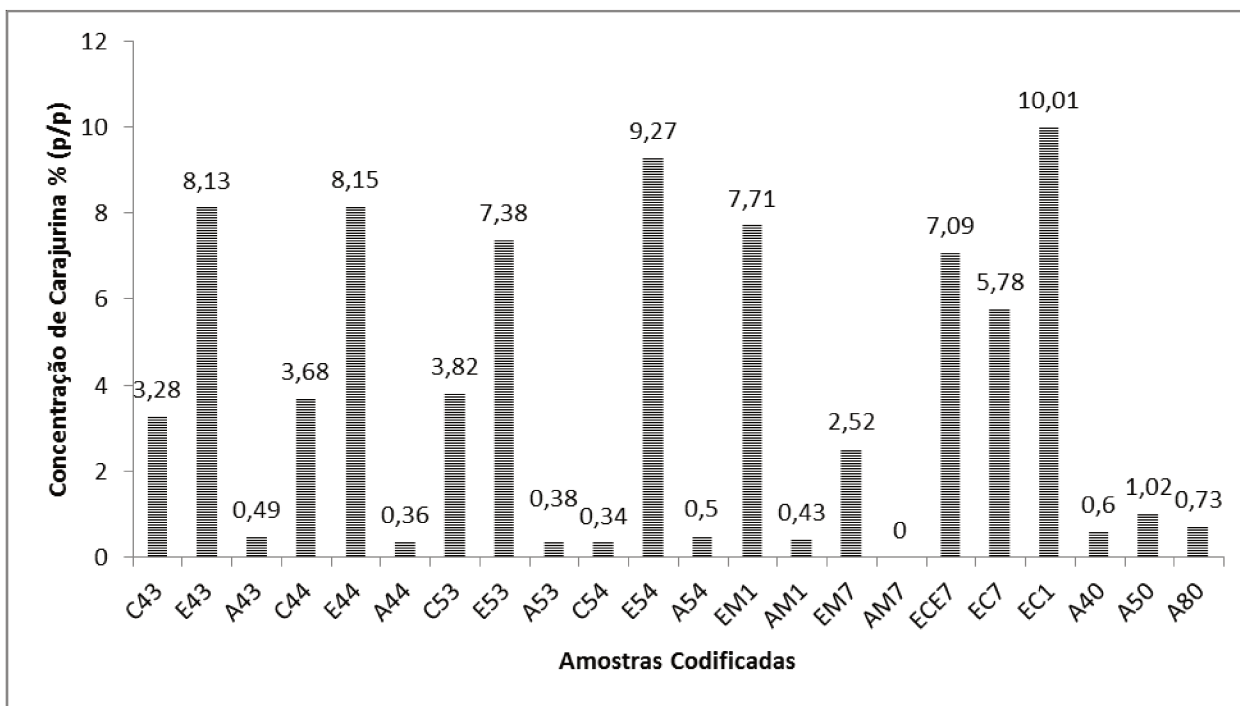


Figura 5.18 Concentração de carajurina nos diferentes extratos obtidos de *A. chica*

A Figura 5.19 mostra a estrutura molecular da luteolina. A presença de 4 grupos hidroxil torna a luteolina uma molécula com insolúvel no dióxido de carbono. Esse fato, explica a ausência de luteolina nos extratos de *A. chica* obtidos com scCO_2 .

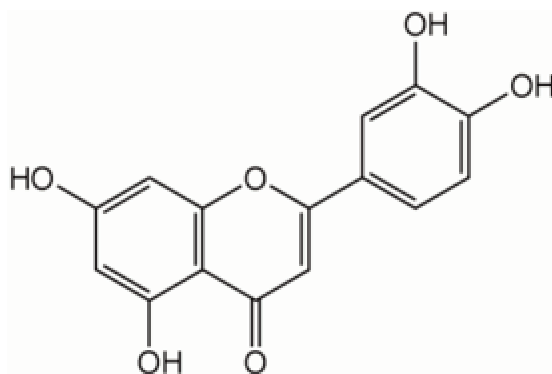


Figura 5.19 Estrutura molecular da luteolina

A concentração de luteolina obtida nos diferentes extratos de *A. chica* pode ser observada pela Figura 5.20. A maior concentração obtida foi no extrato convencional hidroalcolico 70:30 (v:v) (EC7). Nos processos sequenciais em etapas, o maior rendimento de luteolina obtido foi no extrato da mistura 80,8% scCO₂, 19,2% etanol e 0% de água (EM1), uma vez que o etanol como co-solvente é capaz de formar interações do tipo dipolo-dipolo com os fenóis, facilitando a extração de luteolina.

Os extratos aquosos obtidos não apresentaram concentração de luteolina ou apresentaram baixa concentração de luteolina como por exemplo, os extratos convencionais á 50 °C (A50), 80 °C (A80) e o aquoso residual da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % de água (AM1).

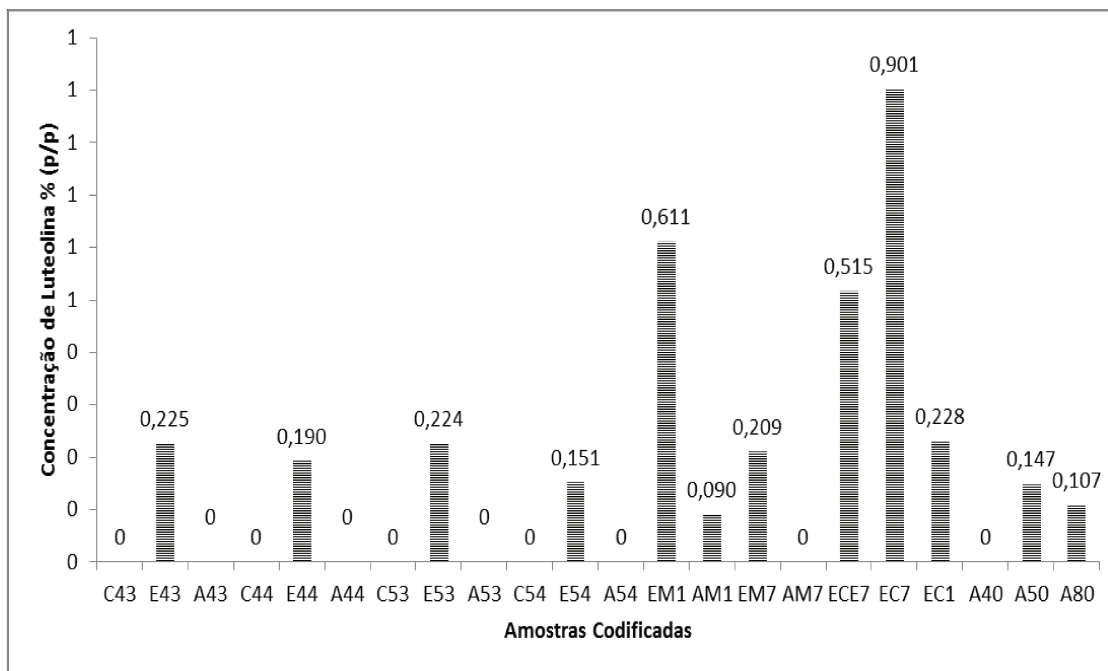


Figura 5.20 Concentração de luteolina nos diferentes extratos obtidos de *A. chica*

6. CONCLUSÕES GERAIS

No processo de extração sequencial em três etapas, nas quatro condições operacionais de temperatura e pressão (40 °C - 300 bar; 40 °C -400 bar; 50 °C – 300 bar; 50 °C- 400 bar), na primeira etapa utilizando-se como solvente o scCO₂, e na segunda etapa utilizando o etanol como solvente, foi observado um aumento de rendimento de extração com o aumento da temperatura e da pressão, porém não de forma estatisticamente significativa. Na terceira etapa, utilizando água como solvente, os extratos obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo assim conclui-se que as condições de temperatura e pressão estudadas neste trabalho pouco influenciaram no rendimento global. No entanto, o maior rendimento global alcançado foi na condição experimental de 50 °C e 300 bar.

Na extração sequencial em três etapas a 40 °C e 300 bar, onde a segunda etapa consiste na mistura scCO₂/etanol/água, observou-se que o caráter do solvente utilizado influenciou significativamente no rendimento global de extração, sendo o maior rendimento de extração alcançado com a mistura contendo água.

Nos extratos hidroalcolícos obtidos de forma convencional, observou-se que a temperatura e pressão influenciou estatisticamente no rendimento global de extração. Já o extrato etanólico obtido de forma convencional apresentou um baixo rendimento global de extração. Em relação aos extratos aquosos obtidos de forma convencional, as temperaturas estudadas não influenciaram no rendimento global de extração.

Em termos de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, o processo realizado com a mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % de etanol e 0 % de água foi o que apresentou maior concentração tanto de compostos fenólicos como de flavonoides totais.

Os extratos etanólicos apresentaram uma maior concentração de carajurina quando comparado com outros solventes. Além disso, observou-se que a extração prévia com scCO_2 melhorou a concentração dos extratos etanólicos nos processos sequenciais em três etapas. Mas os extratos obtidos por scCO_2 apresentaram extratos só contendo carajurina, uma vez que o CO_2 supercrítico foi mais seletivo para este composto de menor polaridade. Já em relação ao teor de luteolina a maior concentração obtida foi no extrato convencional hidroalcoólico 70:30 (v:v).

Sugestões para Trabalhos Futuros

Diante dos resultados apresentados e conclusões sugere-se:

- ❖ Fracionar compostos antociânicos em extratos hidroalcoólicos de folhas de crajirú (*Arrabidaea chica*) usando o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) como anti-solvente com o intuito de avaliar as três antocianinas majoritárias [pigmento (1) - 6,7,3',4'- tetra-hidroxi-5-metoxi flavilium, pigmento (2) - 6,7,4'- trihidroxi-5-metoxi flavilium e pigmento (3) - carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi flavilium)];
- ❖ Testar novas proporções etanol/água na extração convencional e na fracionada com scCO₂.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; SHAHIDI, F.; Compositional characteristics and antioxidant component of cherry *Laurel Varieties* and *Pekmez*; **Journal of Food Science**, 2005, 70(1), p. S47.

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

A.O.C.S. – American Oil Chemists' Society. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**, 6th ed., v, 1, p, 1 (Ca 23–55), AOCS Press, Champaign, 1998.

ARO, A. A.; SIMÕES, G. F.; ESQUISATTO, M. A. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; OLIVEIRA, A. L. R.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of Achilles tendon. **Injury**, 2012.

ASAE Standards. **Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving**. ASAE, S319.3, 547, 1997.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Properties of 3- Deoxyanthocyanins from Sorghum. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52, 4388-4394, 2004.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; FERREIRA I. C.F.R.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C. Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry**, v.127, p. 169–173, 2011.

BARROSO, W. B. G.; OLIVEIRA, L.; SILVEIRA, C. C. F.; DUTRA, L. V. Prospective Technological Study of Plant Species through Patent Documents. **Revista CENIC. Ciências Biológicas**, v. 41, p. 1-14, 2010.

BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, p. 3248S-54S, 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

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

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

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2^a. edição. São Paulo: Varela, p.111, 1995.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5797-5808, 2001.

BYERS, J. A. **Phenomenex catalog**. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>, 2013.

CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M.L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL ; C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

CAO, J.; XIA, X.; CHEN, X.; XIAO, J.; WANG, Q. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. **Food and Chemical Toxicology**. V. 51, p.242–250, 2013.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 3015 – 3041, 1927.

CORRÊA, P.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, P. 31-39, 1926.

CORREA, H. A. M. **Compostos bioativos de extratos naturais: combinação de processos de extração com dióxido de carbono supercrítico, etanol e água**. Tese de doutorado: Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2010.

CSEKE, L. J., KIRAKOSYAN, A., KAUFMAN, P. B., WARBER, S. L., DUKE, J. A., BRIELMANN, H.L. **Natural Products From Plants**. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 2006.

DALMOLIN, I.; MAZUTTI, M. A.; BATISTA, E. A.C.; MEIRELES, M. A. A.; OLIVEIRA, J. V. Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v 42, p. 797-801, 2010.

DEVIA, B., LLABRES, G., WOUTERS, J., DUPONT, L., ESCRIBANO-BAILON, M.T., PASCUAL-TERESA, S., ANGENOT, L., TITS, M. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**. Anal. V. 13, p. 114-120, 2002.

DIEHL, L. C. P. Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico. Tese de doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos -. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2008.

DUNFORD, N.T., KING, J.W., LIST, G.R. Supercritical fluid in food engineering, in: TZIA, C a LIADAKIS, G. **Extraction Optimization in Food Engineering**, cap. 3, CRC Press, Boca Raton, Fl, 2003.

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; BORDIGNON, L. M. T.; Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. **Boletim Ceppa**, v. 21, n.2, p. 351-366, 2003.

FARIAS - CAMPOMANES, A. M. Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica e convencional dos resíduos de uva provenientes do processamento de pisco. Dissertação de mestrado: Faculdade de Engenharia de Alimentos -. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2012.

FRANCIS, F. J. Food colorants: Anthocyanins. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, 28, 273-314, 1989.

GIUSTI, M. WROSTALD, R.E. Characterization and measurement of Anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. (Ed.), **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, New York, 2001.

HOLLMAN, P. C. H; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chemistry Toxicological**, v. 37, n. 9/10, p. 937-9342, 1999.

JORGE, M. P. **Atividade cicatrizante do estrato bruto de Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl). Verlot**. Dissertação de mestrado; Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, Campinas, São Paulo, 2008.

JORGE, M. P.; MADJAROF C.; RUIZA, A. L. T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, R. A. S.; SOUSA, I. M. O.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p. 361-366, 2008.

KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G. P. C.; LUZ, A. I.R. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**: Comunicado Técnico. EMBRAPA, v.50, p. 1-4, 2000.

KERIO, L.C.; WACHIRA , F.N.; WANYOKO, J.K.; ROTICH, M.K. Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. **Food Chemistry**, v. 131, p. 31–38, 2012.

KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N.; CHIA, T.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933, 2003.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins—More Than Nature's Colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 239-240, 2004.

LEE, H. S.; HONG, V. Review: Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 221-234, 1992.

LEE, J. H.; CHOUNG, M. Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1686–1693, 2011.

LEE J. H., PARK K. H., LEE M., KIM H., SEO W. D., KIM J. Y., BAEK I., JANG D. S., HA T. J. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. **Food Chemistry**, v.136 , p.843-852, 2013.

LOPES, T. J., XAVIER, M. F., QUADRI, M. G. N., QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, p. 291-297, 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, 2005 .

MAMEDE, M. E. O; PASTORE, G. M. Compostos Fenólicos Do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante. **Boletim do CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 233-252. 2004.

MANACH, C; SCALBERT, A; MORAND, C; RÉMÉSY, C; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability, **American Journal of Clinical Nutrition**, Vol. 79, No. 5, 727-747, 2004

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-180.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, p. 95-111, 2004.

OLIVEIRA, P. A. **Estudo da estabilidade e da estabilização das antocianinas do bagaço de uva seibel 2**. 98f. Dissertação de mestrado: Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2001.

PAVIANI, L. C., DARIVA, C., MARCUCCI, M. C.; CABRAL, F. A. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of popolis. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33. P. 15–27, 2010.

PELLERIN, P. Extraction of natural raw materials for the flavor industry. **Perfumer & Flavorist**, v. 56, p. 37-41, 1991.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995–2018, 1998.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Columbus, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica Brasileira** Dissertação de mestrado: Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2011.

QUISPE-CONDORI, S. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: Artemisia annua, Cordia verbenácea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgare.**Tese de doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos -. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2005.

RIZVI, S. S. H.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, p. 55-65, 1986.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MARTINEZ-CORREA, H. A.; PAVIANI, L. C.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 164-173, 2011.

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

SCOGIN, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. **Biochemical and Sistematics Ecology**, v. 8, p. 273-276, 1980.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic, p. 331, 1995.

SHI J., YI C., XUE S. J., JIANG Y., MA Y., LI D., Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂, **Journal of Food Engineering**, v 93, p 431-436, 2009.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry** v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SINGLETON V. L., ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v.33, p.35-52, 2005.

TAKEMURA, O. S., IINUMA, M., TOSA, H., MIGUEL, O. G., MOREIRA, E. A., NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. **Phytochemistry**, v.38, p.1299-1300, 1995.

TAFFARELLO, D. **Extratos de Arrabidaea chica (Humb. & Bompl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: Otimização da extração e avaliação farmacológica.** Dissertação de Mestrado; Interunidade em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2008.

TERAN, E. Processos extrativos e estrutura química do princípio ativo. In: **JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3; ENCONTRO RACINE DE FITOTERAPIA E FITOCOSMÉTICA, 1.**, : Racine Qualificação e Assessoria S/C Ltda, Campinas, São Paulo. p.1-33, 1997.

TERCI, D. B. L; **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas.** Tese de Doutorado; Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2004.

UQUICHE, E., DEL VALLE, J. M. ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin, **Journal of Food Engineering**, v.65, n.1, p.55-66, 2004.

VASAPOLLO, G.; LONGO, L.; RESTIO, L.; CIURLIA, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of Lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, n. 1- 2, p. 87-96, 2004.

VELASCO, R. J., VILLADA, H. S., CARRERA, J. E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. **Información Tecnológica**. v. 18, p. 53-65, 2007.

VON POSER, G.L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemistry Systems Ecology**, v. 28, p. 351-366, 2000.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, n.4, p.555-559, 1999.

ZORN, B., GARCIA-PIÑERES A. J., CASTRO, V., MURILLO, R., MORA, G., MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831-835, 2001.

WANG, L. H.; LI, W. H. General method for determining flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using hplc with a photodiode array detector. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 41, p 225-231, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Caracterização da Matéria-Prima

Tabela A.1. Valores de Voláteis + Umidade determinados pelo método gravimétrico das amostras de *A. chica*.

Ensaio	Amostra úmida (bu) (g)	Amostra seca (bs) (g)	Umidade (%)
1	2,0052	1,8827	6,109
2	2,0036	1,8798	6,179
3	2,0005	1,8795	6,048
Média			6,112 ± 0,06

Tabela A. 2. Teor de água determinado pelo método de *Karl Fischer* para amostra de *A. chica*

Ensaio	Amostra (g)	Umidade (%)
1	0,2056	5,181
2	0,2078	5,042
3	0,2022	5,666
Média		5,296 ± 0,32

Tabela A.3 Dados para cálculo do diâmetro médio das partículas das folhas da A. chica

Mesh	di (mm)	di+1	$(di \cdot di+1)^{0,5}$	Wi massa (g)	log d	wi.log d	%
6	3,54	-	-	-	-	-	-
8	2,36	3,54	2,89040	0,17	0,46096	0,07836	0,0177
12	1,4	2,36	1,81769	3,04	0,25952	0,78894	0,317
16	1,0	1,4	1,18322	10,94	0,07306	0,79932	1,140
24	0,71	1,0	0,84261	409,14	-0,07437	-30,42808	42,65
32	0,5	0,71	0,59582	207,6	-0,22489	-46,68630	21,64
48	0,3	0,5	0,38730	141,14	-0,41195	-58,14324	14,71
Fundo*	0,15	0,3	0,21213	187,16	-0,67339	126,03237	19,51

* Adotou-se que para o produto retido no fundo o diâmetro seria 0,15 mm (média aritmética entre 0 e 0,3 mm).

Tabela A. 4 Densidade aparente das folhas secas, trituradas e peneiradas da A. chica.

Ensaio	Massa (g)	Densidade aparente (g/cm ³)
1	2,9414	0,2941
2	2,6013	0,2601
3	2,6656	0,2666
4	2,4928	0,2493
MÉDIA	2,6753	0,268 ± 0,0191

ANEXO B – Curva de Calibração para Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Flavonoides Totais

Tabela B. 1. Valores de absorbância para determinação da curva de calibração de ácido gálico

Concentração diluição (mg/mL)	Absorbância	Média	Desvio Padrão
0,02	0,0934	0,0940	0,0008
	0,0938		
	0,0949		
0,04	0,1995	0,1998	0,0009
	0,2008		
	0,199		
0,05	0,2394	0,2396	0,0003
	0,24		
	0,2394		
0,07	0,3316	0,3329	0,0013
	0,3342		
	0,333		
0,09	0,4181	0,4194	0,0011
	0,42		
	0,42		
0,1	0,4816	0,4822	0,0009
	0,4817		
	0,4832		

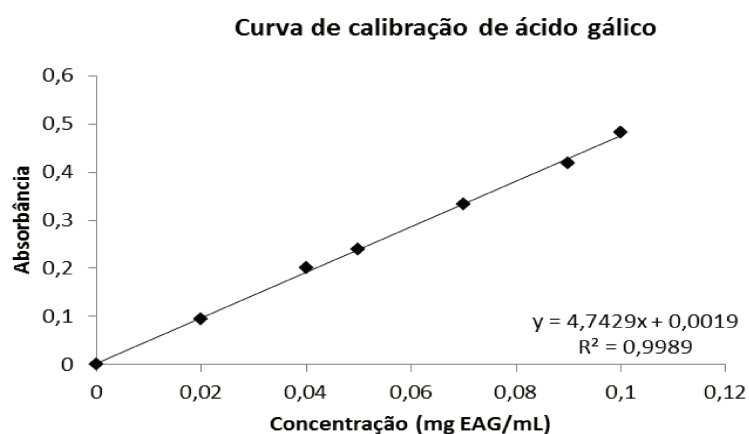
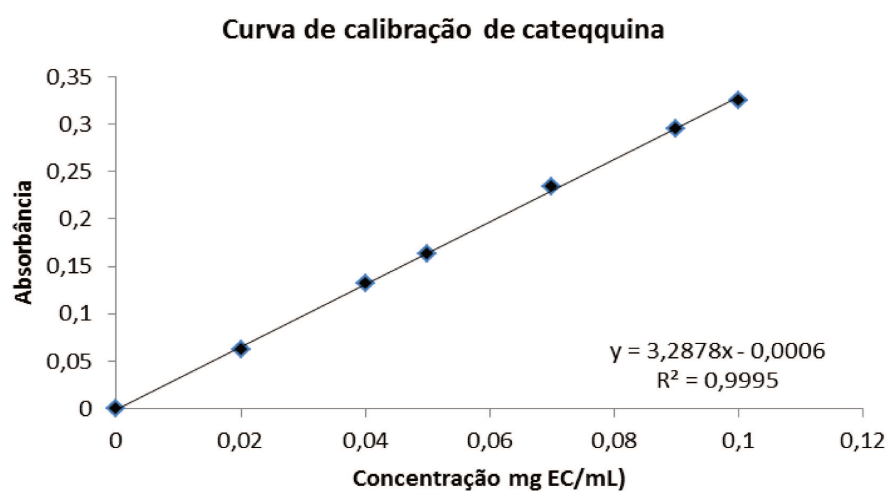


Figura B. 1. Curva de calibração de ácido gálico

Tabela B. 2. Valores de absorvância para determinação da curva de calibração de catequina

Concentração diluição (mg/mL)	Absorbância	Média	Desvio Padrão
0,02	0,0621	0,0618	0,0004
	0,062		
	0,0614		
0,04	0,1327	0,1322	0,0004
	0,1322		
	0,1319		
0,05	0,1636	0,1635	0,0002
	0,1632		
	0,1636		
0,07	0,2348	0,2344	0,0007
	0,2348		
	0,2335		
0,09	0,2953	0,295	0,0004
	0,2947		
0,1	0,3248	0,3254	0,0007
	0,3261		
	0,3252		

**Figura B. 2.** Curva de calibração de catequina

ANEXO C – Dados Experimentais Obtidos nas Extrações da Amostra de A. chica.

Tabela C.1 Corrida 1: Cinética de extração 40 °C e 300 bar da amostra A. chica

Massa inicial da amostra: 5,0043 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F *	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0	0
1	30	49,5	9,891	0,0507	0,0507	1,013
2	60	99	19,783	0,0119	0,0626	1,251
3	90	148,5	29,674	0,0090	0,0716	1,431
4	120	198	39,566	0,0050	0,0766	1,531
5	150	247,5	49,457	0,0052	0,0818	1,635
6	180	297	59,349	0,0030	0,0848	1,695
7	210	346,5	69,240	0,0021	0,0869	1,737
8	240	396	79,132	0,0015	0,0884	1,766
9	270	445,5	89,023	0,0013	0,0897	1,792
10	300	495	98,915	0,0011	0,0908	1,814
11	330	544,5	108,806	0,0020	0,0928	1,854
12	360	594	118,698	0,0006	0,0934	1,866
1e	370	597,925	119,482	0,0382	0,1316	2,630
2e	380	601,85	120,267	0,0327	0,1643	3,283
3e	390	605,775	121,051	0,0313	0,1956	3,909
4e	400	609,7	121,835	0,0234	0,2190	4,376
5e	410	613,625	122,620	0,0180	0,2370	4,736
6e	420	617,55	123,404	0,0162	0,2532	5,060
7e	440	625,4	124,973	0,0291	0,2823	5,641
8e	460	633,25	126,541	0,0231	0,3054	6,103
9e	480	641,1	128,110	0,0217	0,3271	6,536
10e	500	648,95	129,678	0,0194	0,3465	6,924
11e	520	656,8	131,247	0,0195	0,3660	7,314
12e	540	664,65	132,816	0,0186	0,3846	7,685
13e	570	676,425	135,169	0,0247	0,4093	8,179
14e	600	688,2	137,522	0,0234	0,4327	8,647
15e	630	699,975	139,875	0,0231	0,4558	9,108
16e	660	711,75	142,228	0,0205	0,4763	9,518

Continuação						
17e	690	723,525	144,581	0,0193	0,4956	9,903
18e	720	735,3	146,934	0,0184	0,5140	10,271
19e	750	747,075	149,287	0,0167	0,5307	10,605
20e	790	762,775	152,424	0,0683	0,5990	11,970
21e	830	778,475	155,561	0,0285	0,6275	12,539
22e	870	794,175	158,699	0,0198	0,6473	12,935
23e	910	809,875	161,836	0,0163	0,6636	13,261
24e	950	825,575	164,973	0,0158	0,6794	13,576
1a	960	830,575	165,972	0,0074	0,6868	13,724
2a	970	835,575	166,971	0,1514	0,8382	16,750
3a	980	840,075	167,871	0,1513	0,9895	19,773
4a	990	845,075	168,870	0,1114	1,1009	21,999
5a	1000	850,575	169,969	0,1003	1,2012	24,003
6a	1010	855,575	170,968	0,0834	1,2846	25,670
7a	1020	860,575	171,967	0,0842	1,3688	27,352
8a	1030	865,575	172,966	0,0722	1,4410	28,795
9a	1040	870,575	173,965	0,0658	1,5068	30,110
10a	1060	881,075	176,064	0,1180	1,6248	32,468
11a	1080	891,575	178,162	0,0959	1,7207	34,384
12a	1100	901,575	180,160	0,0688	1,7895	35,759
13a	1120	912,075	182,258	0,0595	1,8490	36,948
14a	1140	922,575	184,356	0,0257	1,8747	37,462
15a	1160	933,075	186,455	0,0244	1,8991	37,949
16a	1190	949,075	189,652	0,0204	1,9195	38,357
17a	1220	965,075	192,849	0,0330	1,9525	39,016
18a	1250	981,575	196,146	0,0171	1,9696	39,358
19a	1280	997,575	199,344	0,0114	1,9810	39,586
20a	1312	1015,075	202,841	0,0123	1,9933	39,832

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.2. Corrida 2: Extração a 40 °C e 300 bar da amostra A. chica

Massa inicial da amostra: 5,0027 g

Amostra	Tempo (min)	Massa Solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,684	0,0375	0,0375	0,749
1e	390	384	76,758	0,3636	0,4011	8,018

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.3. Corrida 3: Extração a 40 °C e 300 bar da amostra A. chica

Massa inicial da amostra: 5,0048 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,671	0,024	0,024	0,4795
1e	390	384	76,728	0,4836	0,5076	10,14266

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.4. Corrida 4: Cinética de extração a 40 °C e 400 bar da amostra A. chica

Massa inicial de amostra: 4,9961 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0	0
1	30	49,5	9,908	0,037	0,037	0,741
2	60	99	19,815	0,0182	0,0552	1,105
3	90	148,5	29,723	0,0044	0,0596	1,193
4	120	198	39,631	0,0036	0,0632	1,265
5	150	247,5	49,539	0,0027	0,0659	1,319
6	180	297	59,446	0,0015	0,0674	1,349
7	210	346,5	69,354	0,0011	0,0685	1,371
8	240	396	79,262	0,0013	0,0698	1,397
9	270	445,5	89,170	0,0009	0,0707	1,415
10	300	495	99,077	0,0009	0,0716	1,433
11	330	544,5	108,985	0,0018	0,0734	1,469
12	360	594	118,893	0,0015	0,0749	1,499
13	390	643,5	128,800	0,0012	0,0761	1,523
14	420	693	138,708	0,0005	0,0766	1,533
15	450	742,5	148,616	0,0003	0,0769	1,539
1e	460	746,425	149,402	0,0577	0,1346	2,694
2e	470	750,35	150,187	0,0268	0,1614	3,231
3e	480	754,275	150,973	0,0237	0,1851	3,705
4e	490	758,2	151,758	0,0187	0,2038	4,079
5e	500	762,125	152,544	0,017	0,2208	4,419
6e	510	766,05	153,330	0,0153	0,2361	4,726
7e	520	769,975	154,115	0,014	0,2501	5,006

Continuação						
8e	530	773,9	154,901	0,0123	0,2624	5,252
9e	540	777,825	155,686	0,0105	0,2729	5,462
10e	560	785,675	157,258	0,0212	0,2941	5,887
11e	580	793,525	158,829	0,0203	0,3144	6,293
12e	600	801,375	160,400	0,0163	0,3307	6,619
13e	630	813,15	162,757	0,0235	0,3542	7,090
14e	660	824,925	165,114	0,0216	0,3758	7,522
15e	690	836,7	167,471	0,0192	0,395	7,906
16e	720	848,475	169,827	0,0234	0,4184	8,375
17e	750	860,25	172,184	0,0153	0,4337	8,681
18e	780	872,025	174,541	0,0143	0,448	8,967
19e	810	883,8	176,898	0,0129	0,4609	9,225
20e	850	899,5	180,040	0,0157	0,4766	9,539
21e	890	915,2	183,183	0,0114	0,488	9,768
22e	930	930,9	186,325	0,0165	0,5045	10,098
23e	970	946,6	189,468	0,0111	0,5156	10,320
24e	1010	962,3	192,610	0,0133	0,5289	10,586
25e	1050	978	195,753	0,0361	0,565	11,309
26e	1100	997,625	199,681	0,0263	0,5913	11,835
27e	1150	1017,25	203,609	0,0121	0,6034	12,077
28e	1200	1036,875	207,537	0,0085	0,6119	12,248
29e	1250	1056,5	211,465	0,0079	0,6198	12,406
30e	1300	1076,125	215,393	0,009	0,6288	12,586
31e	1350	1095,75	219,321	0,0116	0,6404	12,818
32e	1400	1115,375	223,249	0,011	0,6514	13,038
33e	1450	1135	227,177	0,0124	0,6638	13,286
34e	1500	1154,625	231,105	0,0115	0,6753	13,517
35e	1550	1174,25	235,033	0,011	0,6863	13,737
1a	1560	1180,25	236,234	0,0584	0,7447	14,906
2a	1570	1185,65	237,315	0,2656	1,0103	20,222
3a	1580	1191,25	238,436	0,2296	1,2399	24,817
4a	1590	1195,65	239,317	0,128	1,3679	27,379
5a	1600	1201,65	240,518	0,1416	1,5095	30,214
6a	1610	1206,25	241,438	0,084	1,5935	31,895
7a	1620	1211,25	242,439	0,072	1,6655	33,336
8a	1630	1216,25	243,440	0,048	1,7135	34,297
9a	1640	1221,25	244,441	0,0312	1,7447	34,921
10a	1660	1232,25	246,642	0,0525	1,7972	35,972
11a	1680	1242,25	248,644	0,03	1,8272	36,573
12a	1700	1252,25	250,646	0,021	1,8482	36,993

Continuação						
13a	1720	1263,25	252,847	0,006	1,8542	37,113
14a	1740	1274,25	255,049	0,018	1,8722	37,473
15a	1760	1286,25	257,451	0,0045	1,8767	37,563
16a	1790	1303,25	260,853	0	1,8767	37,563
17a	1820	1320,25	264,256	0,014	1,8907	37,844
18a	1850	1337,25	267,659	0	1,8907	37,844
19a	1880	1355,25	271,262	0,006	1,8967	37,964
20a	1910	1372,25	274,664	0,006	1,9027	38,084
21a	1940	1389,25	278,067	0,014	1,9167	38,364

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.5. Corrida 5: Extração a 40 °C e 400 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial da amostra: 4,9917 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,749	0,0276	0,0276	0,553
1e	390	384	76,928	0,4962	0,5238	10,493

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.6. Corrida 6: Extração a 40 °C e 400 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial da amostra: 5,0011 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,635	0,0367	0,0367	0,734
1e	390	384	76,783	0,5652	0,6019	12,035

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.7.Corrida 7: Cinética de extração a 50 °C e 300 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial da amostra: 4,9951 g

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0	0
1	30	49,5	9,910	0,0315	0,0315	0,631
2	60	99	19,819	0,0063	0,0378	0,757
3	90	148,5	29,729	0,0047	0,0425	0,851
4	120	198	39,639	0,0027	0,0452	0,905
5	150	247,5	49,549	0,0016	0,0468	0,937
6	180	297	59,458	0,0027	0,0495	0,991
7	210	346,5	69,368	0,0024	0,0519	1,039
8	240	396	79,278	0,0018	0,0537	1,075
9	270	445,5	89,187	0,0002	0,0539	1,079
10	300	495	99,097	0,0001	0,054	1,081
11	330	544,5	109,007	0,0006	0,0546	1,093
12	360	594	118,917	0,0006	0,0552	1,105
13	390	643,5	128,826	0,0005	0,0557	1,115
14	420	693	138,736	0,0016	0,0573	1,147
15	450	742,5	148,646	0,0001	0,0574	1,149
16	480	792	158,555	0,0013	0,0587	1,175
17	510	841,5	168,465	0	0,0587	1,175
18	540	891	178,375	1E-04	0,0588	1,177
19	570	940,5	188,285	0,0022	0,061	1,221
1e	580	944,425	189,070	0,0704	0,1314	2,631
2e	590	948,35	189,856	0,0403	0,1717	3,437
3e	600	952,275	190,642	0,0421	0,2138	4,280
4e	610	956,2	191,428	0,0332	0,247	4,945
5e	620	960,125	192,213	0,0248	0,2718	5,441
6e	630	964,05	192,999	0,0203	0,2921	5,848
7e	640	967,975	193,785	0,0167	0,3088	6,182
8e	650	971,9	194,571	0,0152	0,324	6,486
9e	660	975,825	195,356	0,0134	0,3374	6,755
10e	680	983,675	196,928	0,026	0,3634	7,275
11e	700	991,525	198,500	0,0327	0,3961	7,930
12e	720	999,375	200,071	0,0222	0,4183	8,374
13e	750	1011,15	202,428	0,0275	0,4458	8,925
14e	780	1022,925	204,786	0,0271	0,4729	9,467

Continuação						
15e	810	1034,7	207,143	0,0248	0,4977	9,964
16e	840	1046,475	209,500	0,021	0,5187	10,384
17e	870	1058,25	211,858	0,0197	0,5384	10,779
18e	900	1070,025	214,215	0,0195	0,5579	11,169
19e	930	1081,8	216,572	0,0198	0,5777	11,565
20e	970	1097,5	219,715	0,0244	0,6021	12,054
21e	1010	1113,2	222,858	0,0263	0,6284	12,580
22e	1050	1128,9	226,001	0,0232	0,6516	13,045
25e	1090	1144,6	229,145	0,0202	0,6718	13,449
24e/a	1120	1156,375	231,502	0,0379	0,7097	14,208
1a	1130	1161,875	232,603	0,0098	0,7195	14,404
2a	1140	1167,075	233,644	0,0091	0,7286	14,586
3a	1150	1172,675	234,765	0,0084	0,737	14,754
4a	1160	1177,975	235,826	0,0119	0,7489	14,993
5a	1170	1183,175	236,867	0,0707	0,8196	16,408
6a	1180	1188,775	237,988	0,2198	1,0394	20,808
7a	1190	1194,375	239,109	0,14	1,1794	23,611
8a	1200	1199,875	240,210	0,1113	1,2907	25,839
9a	1210	1205,375	241,311	0,0882	1,3789	27,605
10a	1230	1217,375	243,714	0,159	1,5379	30,788
11a	1250	1229,375	246,116	0,1275	1,6654	33,341
12a	1270	1240,375	248,318	0,0945	1,7599	35,233
13a	1290	1252,375	250,721	0,0075	1,7674	35,383
14a	1310	1263,375	252,923	0,036	1,8034	36,103
15a	1330	1275,375	255,325	0,003	1,8064	36,163
16a	1360	1293,375	258,929	0,018	1,8244	36,524
17a	1390	1310,375	262,332	0,01	1,8344	36,724
18a	1420	1328,875	266,036	0,008	1,8424	36,884
19a	1450	1347,375	269,739	2,28E-15	1,8424	36,884
20a	1480	1365,375	273,343	0,006	1,8484	37,004
21a	1510	1383,375	276,946	0,004	1,8524	37,084

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.8. . Corrida 8: Extração a 50 °C e 300 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial de amostra: 4,9972 g.

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,717	0,0333	0,0333	0,666
1e	390	384	76,843	0,4938	0,5271	10,548

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.9. Corrida 9: Extração a 50 °C e 300 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial de amostra: 4,9971 g.

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,717	0,0492	0,0492	0,985
1e	390	384	76,844	0,6423	0,6915	13,838

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.10. Corrida 10: Cinética de extração a 50 °C e 400 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial da amostra: 4,9939 g.

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0	0,000
1	30	49,5	9,912093	0,0499	0,0499	0,999
2	60	99	19,82419	0,0152	0,0651	1,304
3	90	148,5	29,73628	0,0021	0,0672	1,346
4	120	198	39,64837	0,0008	0,068	1,362
5	150	247,5	49,56046	0	0,068	1,362
1e	160	251,111	50,28355	0,067	0,135	2,703
2e	170	254,722	51,00663	0,0401	0,1751	3,506
3e	180	258,333	51,72971	0,0321	0,2072	4,149
4e	190	261,944	52,45279	0,026	0,2332	4,670

Continuação						
5e	200	265,555	53,17587	0,0234	0,2566	5,138
6e	210	269,166	53,89896	0,0178	0,2744	5,495
7e	220	272,777	54,62204	0,0172	0,2916	5,839
8e	230	276,388	55,34512	0,0163	0,3079	6,166
9e	240	279,999	56,0682	0,0151	0,323	6,468
10e	260	287,221	57,51437	0,0273	0,3503	7,015
11e	280	294,443	58,96053	0,0231	0,3734	7,477
12e	300	301,665	60,4067	0,0227	0,3961	7,932
13e	330	312,498	62,57594	0,0301	0,4262	8,534
14e	360	323,331	64,74519	0,0271	0,4533	9,077
15e	390	334,164	66,91444	0,0255	0,4788	9,588
16e	420	344,997	69,08368	0,0222	0,501	10,032
17e	450	355,83	71,25293	0,0234	0,5244	10,501
18e	480	366,663	73,42218	0,0199	0,5443	10,899
19e	510	377,496	75,59142	0,0199	0,5642	11,298
20e	550	391,94	78,48375	0,0251	0,5893	11,800
21e	590	406,384	81,37608	0,025	0,6143	12,301
22e	630	420,828	84,26841	0,0197	0,634	12,695
23e	670	435,272	87,16074	0,0188	0,6528	13,072
24e	710	449,716	90,05306	0,0168	0,6696	13,408
25e	740	460,549	92,22231	0,0382	0,7078	14,173
1a	750	465,349	93,18348	0,0105	0,7183	14,384
2a	760	470,349	94,18471	0,0077	0,726	14,538
3a	770	475,549	95,22598	0,0091	0,7351	14,720
4a	780	480,749	96,26725	0,0238	0,7589	15,197
5a	790	485,749	97,26847	0,112	0,8709	17,439
6a	800	490,649	98,24966	0,0973	0,9682	19,388
7a	810	495,649	99,25089	0,0735	1,0417	20,859
8a	820	500,849	100,2922	0,0609	1,1026	22,079
9a	830	506,049	101,3334	0,056	1,1586	23,200
10a	850	518,049	103,7364	0,0885	1,2471	24,972
11a	870	529,049	105,939	0,0765	1,3236	26,504
12a	890	540,049	108,1417	0,078	1,4016	28,066
13a	910	551,049	110,3444	0,069	1,4706	29,448
14a	930	563,049	112,7474	0,054	1,5246	30,529
15a	950	575,049	115,1503	0,0555	1,5801	31,641
16a	980	592,049	118,5544	0,076	1,6561	33,162
17a	1010	608,049	121,7583	0,058	1,7141	34,324
18a	1040	624,049	124,9623	0,066	1,7801	35,645
19a	1070	641,049	128,3664	0,034	1,8141	36,326

Continuação						
20a	1100	657,049	131,5703	0,036	1,8501	37,047
21a	1130	673,049	134,7742	0,014	1,8641	37,328
22a	1160	689,049	137,9781	0,016	1,8801	37,648

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.11. Corrida 11: Extração a 50 °C e 400 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial de amostra: 5,0007 g.

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,696	0,0888	0,0088	1,776
1e	390	384	76,789	0,5609	0,6497	12,992

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.12. Corrida 12: Extração a 50 °C e 400 bar da amostra *A. chica*

Massa inicial de amostra: 5,0062 g.

Amostra	Tempo (min)	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	90	148,5	29,663	0,0266	0,0266	0,531
1e	390	384	76,705	0,6024	0,629	12,564

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.13. Corrida 13: Cinética de extração 40°C e 300 bar em duas etapas.

Segunda etapa: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol, 0 % água.

Massa inicial de amostra: 5,0025 g

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0
1	49,5	9,895	0,0265	0,0265	0,530
2	99	19,790	0,0065	0,033	0,660
3	148,5	29,685	0,0038	0,0368	0,736
4	209,775	41,934	0,0399	0,0767	1,533

Continuação					
5	271,05	54,183	0,042	0,1187	2,373
6	332,325	66,432	0,0185	0,1372	2,743
7	393,6	78,681	0,0113	0,1485	2,969
8	454,875	90,930	0,0084	0,1569	3,136
9	516,15	103,178	0,0066	0,1635	3,268
10	577,425	115,427	0,0067	0,1702	3,402
11	638,7	127,676	0,0053	0,1755	3,508
12	699,975	139,925	0,0028	0,1783	3,564

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.14. Corrida 14: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol, 0 % água.

Massa inicial de amostra: 4,9934 g.

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	148,5	29,739	0,0322	0,0322	0,645
1m	761,25	152,451	0,1187	0,1509	3,022

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.15. Corrida 15: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol, 0 % água

Massa inicial de amostra: 4,9958 g.

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	148,5	29,725	-	-	-
1m	761,25	152,378	0,1149	0,1149	2,298

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.16. Corrida 16: Cinética de extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol e 6,1 % água.

Massa inicial de amostra: 5,0001 g.

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0
1	49,5	9,900	0,0242	0,0242	0,484
2	99	19,800	0,0079	0,0321	0,642
3	148,5	29,699	0,0051	0,0372	0,744
4	210,654	42,130	0,0138	0,051	1,020
5	272,808	54,561	0,5068	0,5578	11,154
6	334,962	66,991	0,4009	0,9587	19,170
7	397,116	79,422	0,2446	1,2033	24,061
8	459,27	91,852	0,1769	1,3802	27,598
9	521,424	104,283	0,1472	1,5274	30,542
10	583,578	116,713	0,0377	1,5651	31,296
11	645,732	129,144	0,0201	1,5852	31,698

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.17. Corrida 17: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol e 6,1% água.

Massa inicial de amostra: 4,9973 g.

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	148,5	29,716	0,0224	0,0224	0,448
1m	770,04	154,091	3,4829	3,5053	70,144

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.18. Corrida 18: Extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol e 6,1 % água.

Massa inicial de amostra: 5,0053 g.

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
1	148,5	29,668	0,0395	0,0395	0,789
1m	770,04	153,845	2,5209	2,5604	51,251

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.19. Corrida 19: Cinética de extração 40 °C e 300 bar em duas etapas. Segunda etapa: 78,4 % scCO₂, 10,8 % etanol e 10,8 % água.

Massa inicial de amostra: 5,0025 g

Amostra	Massa solvente (g)	S/F*	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0
1	49,5	9,895	0,0344	0,0344	0,687
2	99	19,790	0,0095	0,0439	0,876
3	148,5	29,685	0,004	0,0479	0,956
4	211,68	42,315	0,0005	0,0484	0,966
5	274,86	54,945	1,4828	1,5312	30,565
6	338,04	67,574	0,1294	1,6606	33,148
8	357,255	71,415	0,0582	1,7188	34,310
9	420,435	84,045	0,0323	1,7511	34,955
10	483,615	96,675	0,0188	1,7699	35,330
11	546,795	109,304	0,0181	1,788	35,691
12	609,975	121,934	0,0202	1,8082	36,095
13	673,155	134,564	0,0131	1,8213	36,356

* S/F = razão mássica entre solvente e alimentação

Tabela C.20. Dados experimentais das extrações convencionais aquosa obtidos a partir dos resíduos 2.

Condição experimental	Ensaio	Massa do resíduo 2 (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)	Média
40 °C - 300 bar	2.1	1,0013	0,1067	10,656	13,62 ± 2,3
	2.2	1,0073	0,1194	11,853	
	2.3	1,0124	0,1323	13,068	
	3.1	1,0728	0,1589	14,811	
	3.2	1,0128	0,1803	17,802	
	3.3	1,0088	0,1367	13,551	
40 °C - 400 bar	2.1	1,0011	0,1035	10,339	13,05 ± 2,6
	2.2	1,0098	0,1374	13,607	
	2.3	1,0098	0,152	15,052	
	3.1	1,0062	0,0945	9,392	
	3.2	1,0129	0,1463	14,444	
	3.3	1,0483	0,1623	15,482	
50 °C - 300 bar	2.1	1,0014	0,1423	14,210	15,16 ± 0,77
	2.2	1,0004	0,1589	15,884	
	2.3	1,0023	0,1505	15,015	
	3.1	1,0013	0,1602	15,999	
	3.2	1,0142	0,1573	15,510	
	3.3	1,0043	0,1439	14,328	
50 °C - 400 bar	2.1	1,0081	0,0318	3,154*	13,57 ± 0,93
	2.2	1,0043	0,0426	4,241*	
	2.3	1,0062	0,044	4,373*	
	3.1	1,0164	0,1483	14,591	
	3.2	1,0051	0,1344	13,372	
	3.3	1,0248	0,1308	12,763	
40 °C – 300 bar 2° etapa: Mistura: 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0% água	2.1	1,0065	0,1829	18,172	17,93 ± 2,1
	2.2	1,0058	0,1604	15,947	
	2.3	1,009	0,1771	17,552	
	3.1	1,0028	0,2008	20,024	
	3.2	1,005	0,2056	20,457	
	3.3	1,0032	0,1551	15,460	
40°C – 300 bar 2° etapa: Mistura: 79,6% scCO₂, 14,3% etanol e 6,1%água	2.1	1,0057	0,0163	1,620	1,61 ± 0,2
	2.2	1,006	0,0167	1,660	
	2.3	1,0033	0,0195	1,944	
	3.1	1,0373	0,0173	1,668	
	3.2	1,0416	0,0147	1,411	
	3.3	1,046	0,0144	1,377	

* Valores desconsiderados nos cálculos de rendimento devido à incoerência.

Tabela C.21. Dados experimentais da extração convencional etanólica.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	1,0004	0,0344	3,439
2	1,0065	0,0283	2,812
3	1,002	0,0301	3,004
4	1,0023	0,0259	2,584
5	1,0083	0,0393	3,898
6	1,0068	0,0288	2,860
7	1,0031	0,0239	2,383
MÉDIA			2,997 ± 0,52

Tabela C.22. Dados experimentais da extração convencional hidroalcoólica, 70:30 (v/v).

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	10,0088	3,15	31,472
2	10,0068	2,685	26,832
3	10,0085	2,865	28,626
MÉDIA			28,977±2,34

Tabela C.23. Dados experimentais obtidos na cinética referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3%, nas condições experimentais de 40 °C e 300 bar em extrator de leite fixo.

Massa inicial de amostra: 5,0018 g

Ensaio	Tempo (min)	Massa solvente (g)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
0	0	0	0	0	0
1	10	3,925	0,4846	0,4846	9,689
2	20	7,85	0,8422	1,3268	26,526
3	30	11,775	0,1655	1,4923	29,835
4	40	15,857	0,11128	1,60358	32,060
5	50	20,096	0,09558	1,69916	33,971
6	60	24,178	0,06344	1,7626	35,239
7	70	28,26	0,0624	1,825	36,487
8	80	32,499	0,0567	1,8817	37,620
9	90	36,581	0,04524	1,92694	38,525
10	110	45,216	0,0792	2,00614	40,108
11	130	53,851	0,0847	2,09084	41,802
12	150	63,271	0,0756	2,16644	43,313
13	180	76,616	0,0816	2,24804	44,945
14	210	89,961	0,0629	2,31094	46,202
15	240	103,306	0,0629	2,37384	47,459
16	270	116,651	0,051	2,42484	48,479
17	300	129,996	0,0425	2,46734	49,329
18	330	143,341	0,0527	2,52004	50,383
19	360	156,686	0,0323	2,55234	51,028

Tabela C.24. Dados experimentais referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3%, nas condições experimentais de 40°C e 300 bar em extrator de leito fixo (1° repetição).

Massa inicial de amostra: 5,0033 g

Amostra	Tempo (min)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
2.1	100	0,775	0,775	15,490
2.2	200	0,22	0,995	19,887
2.3	300	0,12	1,115	22,285

Tabela C.25. Dados experimentais referente ao extrato convencional 70:30 (v/v) acidificado com ácido cítrico 0,3 %, nas condições experimentais de 40 °C e 300 bar em extrator de leito fixo (2° repetição).

Massa inicial de amostra: 5,002 g

Amostra	Tempo (min)	Massa pontual (g)	Massa acumulada (g)	Rendimento (%)
3.1	100	0,78	0,775	15,494
3.2	200	0,265	1,04	20,792
3.3	300	0,135	1,175	23,490

Tabela C.26. Dados experimentais da extração convencional aquosa acidificada a 40 °C

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	1,004	0,1505	14,990
2	1,0146	0,1817	17,909
3	1,0055	0,1965	19,543
MÉDIA			17,480 ± 2,3

Tabela C.27. Dados experimentais da extração convencional aquosa a 50 °C

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	1,0137	0,1976	19,493
2	1,0140	0,2019	19,911
3	1,0046	0,1697	16,892
MÉDIA			18,764 ± 1,63

Tabela C. 28. Dados experimentais da extração convencional aquosa acidificada a 80 °C

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	1,0055	0,1796	17,862
2	1,0045	0,188	18,716
3	1,0662	0,2039	19,124
MÉDIA			18,567 ± 0,64

ANEXO D – Curvas de calibração de luteolina e carajurina utilizadas na análise por CLAE

Tabela D.1. Valores de concentração para determinação da curva de calibração de luteolina.

Padrão Luteolina (conc (µg/mL))	Área
4,7	383994
4,8	387201
11,75	614802
18,8	1001294
23,5	1355858

Tabela D.2. Valores de concentração para determinação da curva de calibração de carajurina.

Padrão Carajurina (conc (µg/mL))	Área
9,94	247060
19,9	428425
49,7	1745508
74,6	2572032
149,1	5302961

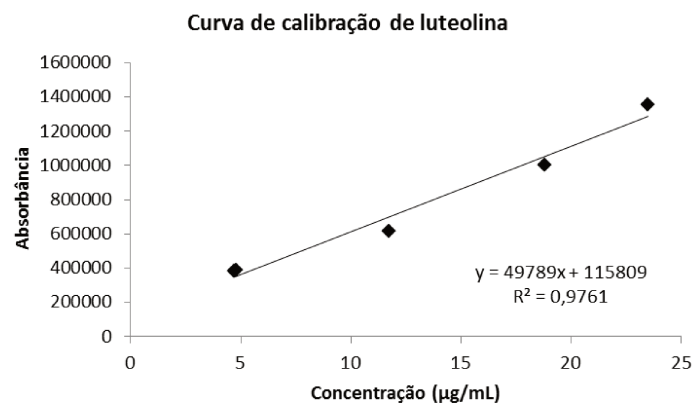


Figura D.1. Curva de calibração de luteolina.

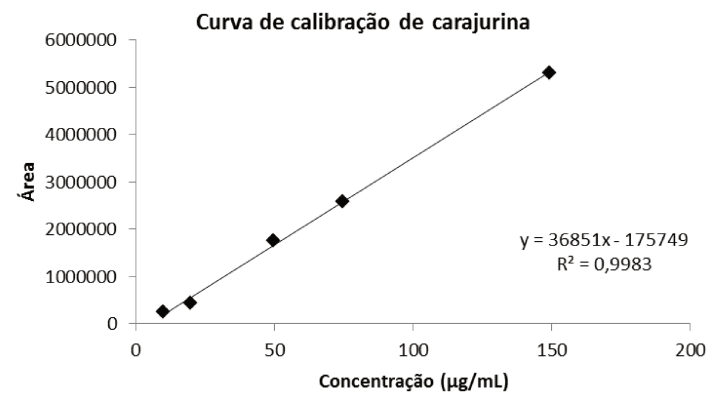


Figura D.2. Curva de calibração de carajurina.

ANEXO E – Cromatogramas dos Extratos de *Arrabidaea chica* obtidos por CLAE – 470nm.

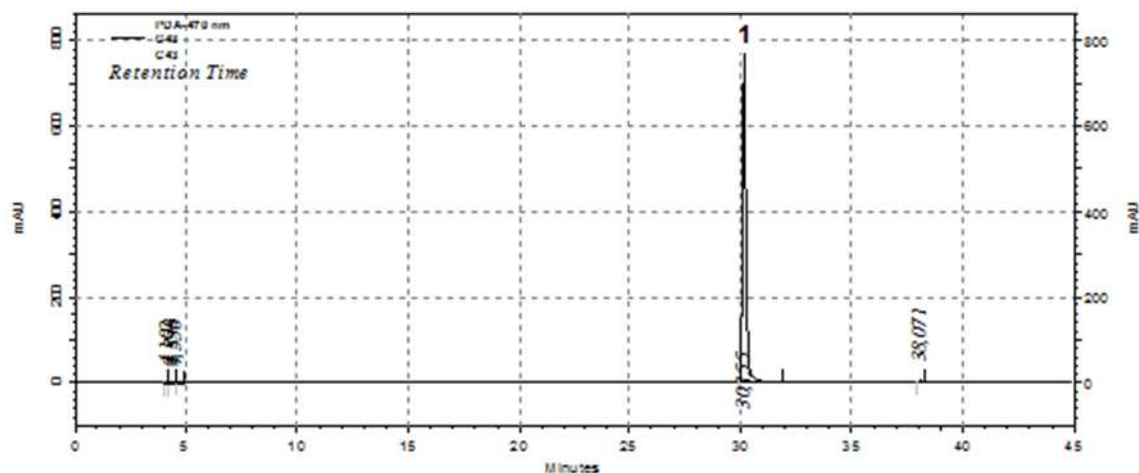


Figura E.1.: Cromatograma do extrato 1ª etapa: scCO₂ a 40 °C e 300 bar (C43) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

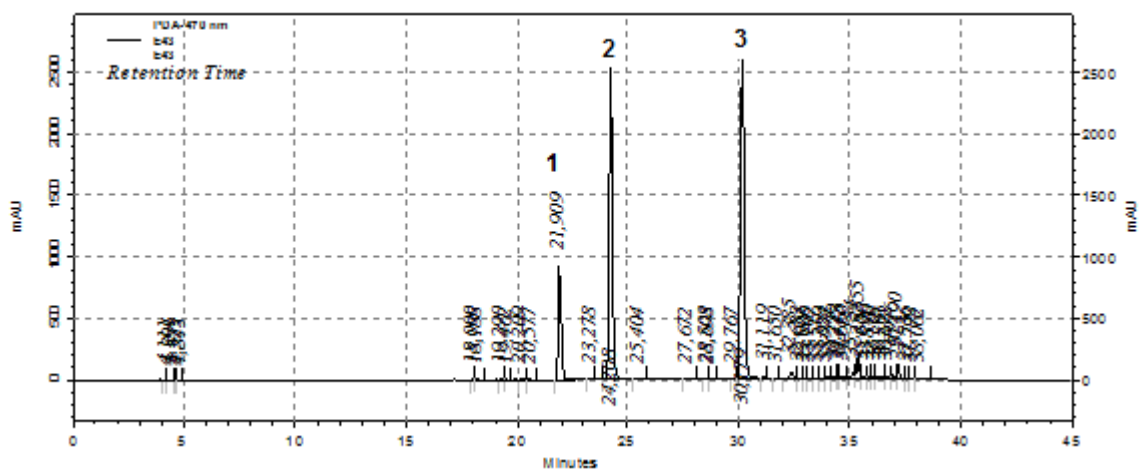


Figura E.2.: Cromatograma do extrato 2ª etapa: etanol a 40 °C e 300 bar (E43) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

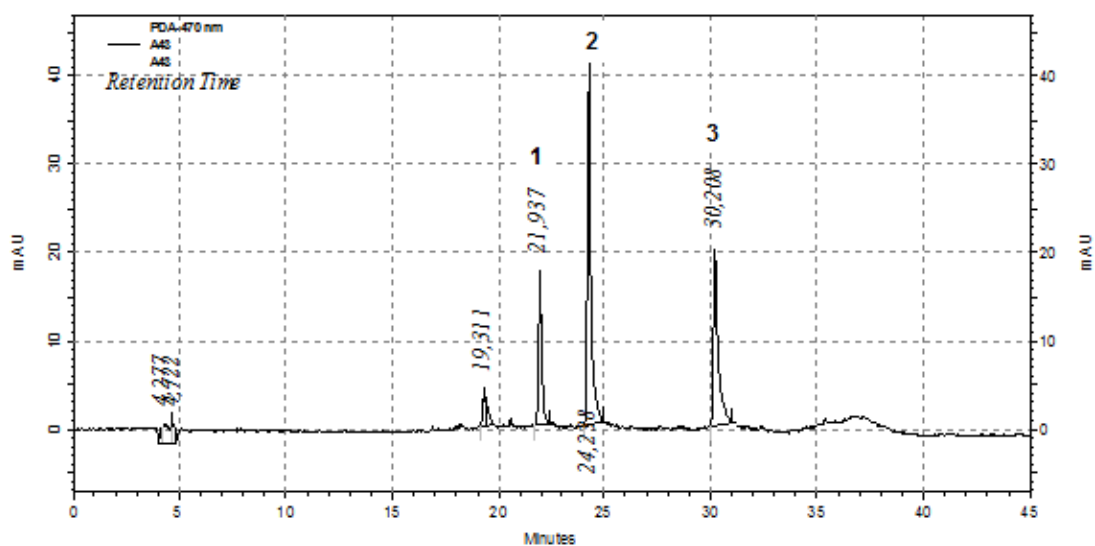


Figura E.3.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 40 °C e 300 bar (A43) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

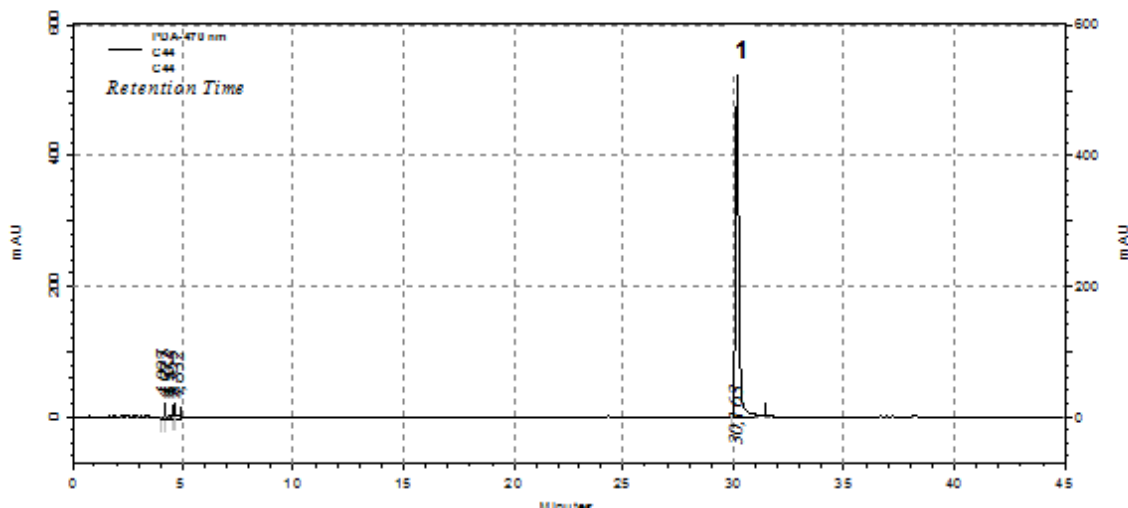


Figura E.4.: Cromatograma do extrato 1ª etapa: scCO₂ a 40 °C e 400 bar (C44) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

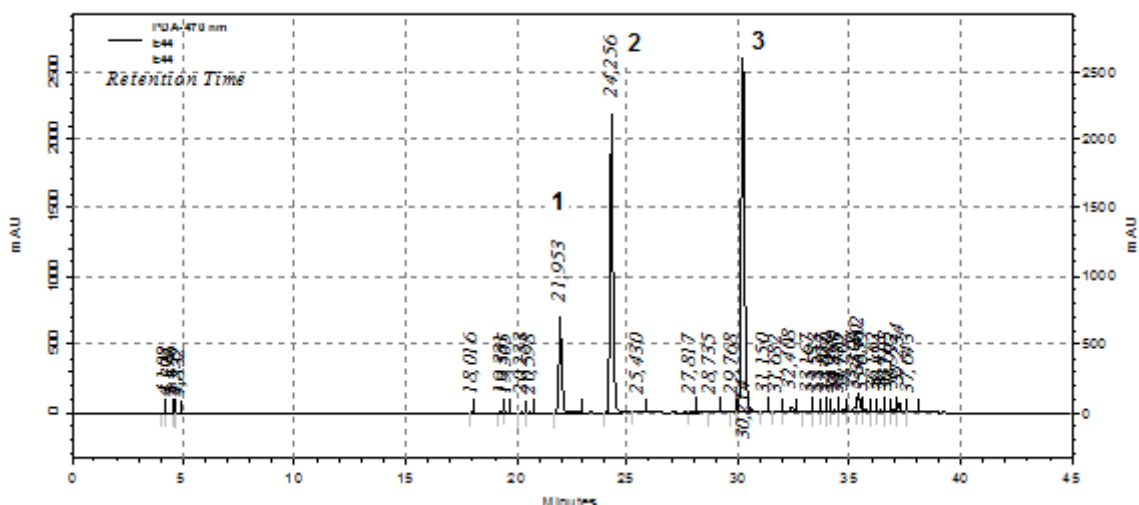


Figura E.5.: Cromatograma do extrato 2ª etapa: etanol a 40 °C e 400 (E44) bar de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

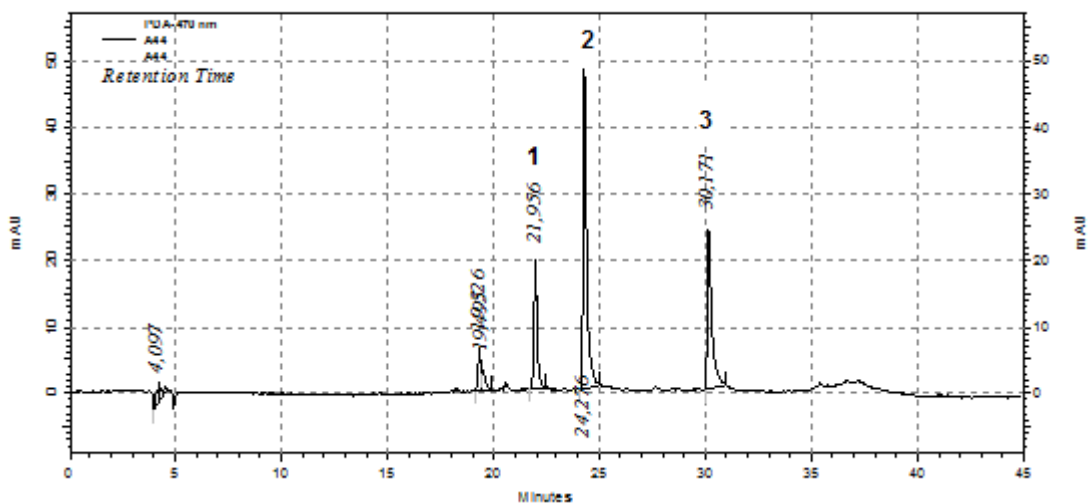


Figura E.6.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 40 °C e 400 bar (A44) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

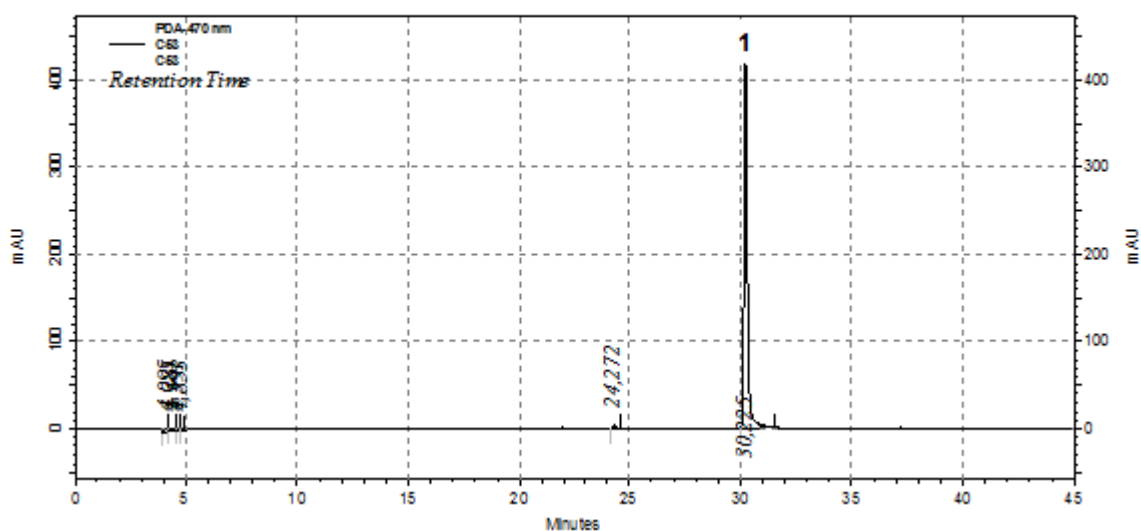


Figura E.7.: Cromatograma do extrato 1ª etapa: scCO₂ a 50 °C e 300 bar (C53) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

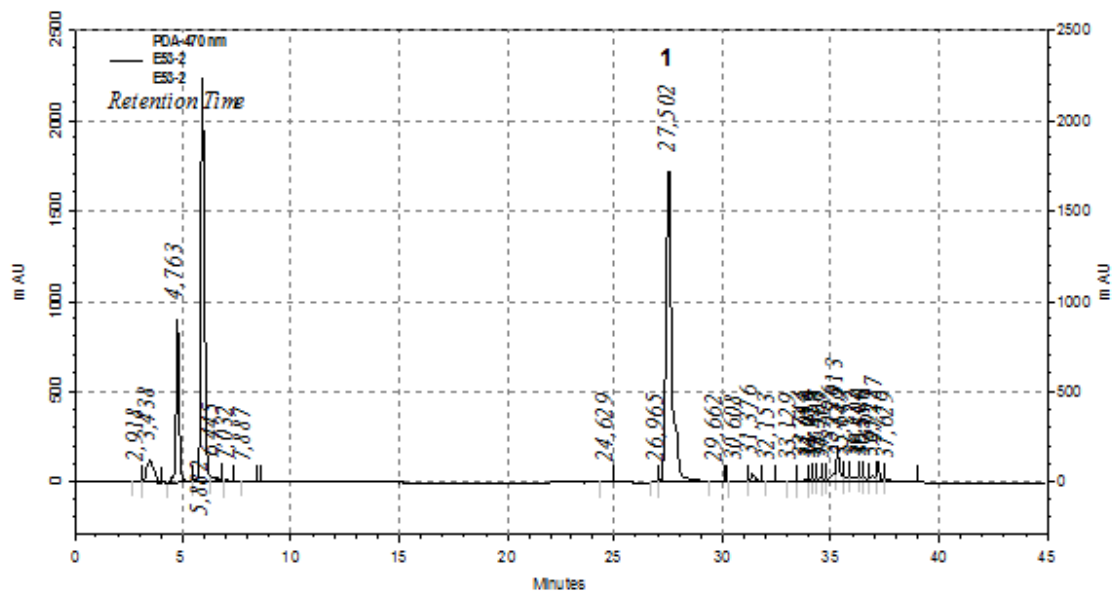


Figura E.8.: Cromatograma do extrato 2ª etapa: etanol a 50 °C e 300 bar (E53) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

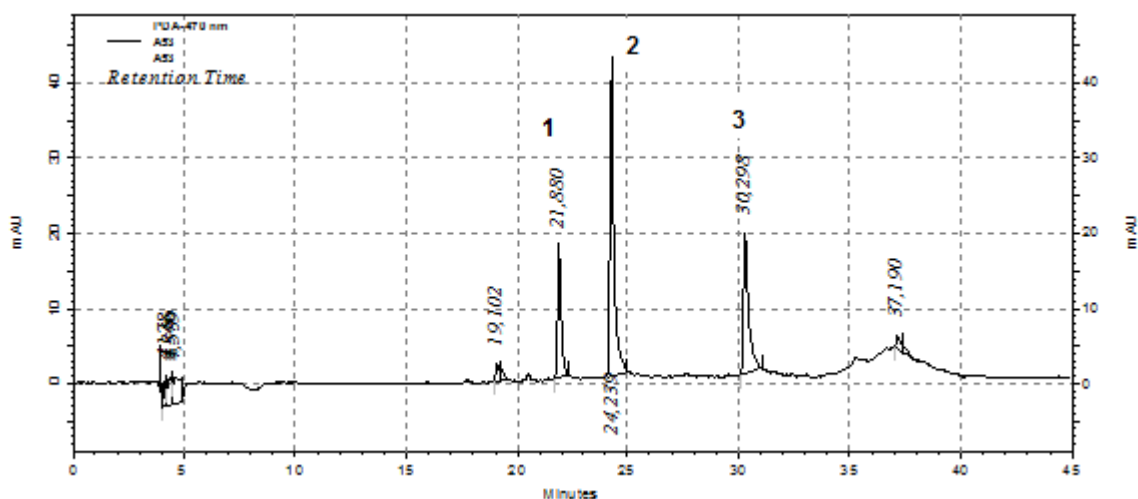


Figura E.9.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 50 °C e 300 bar (A53) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

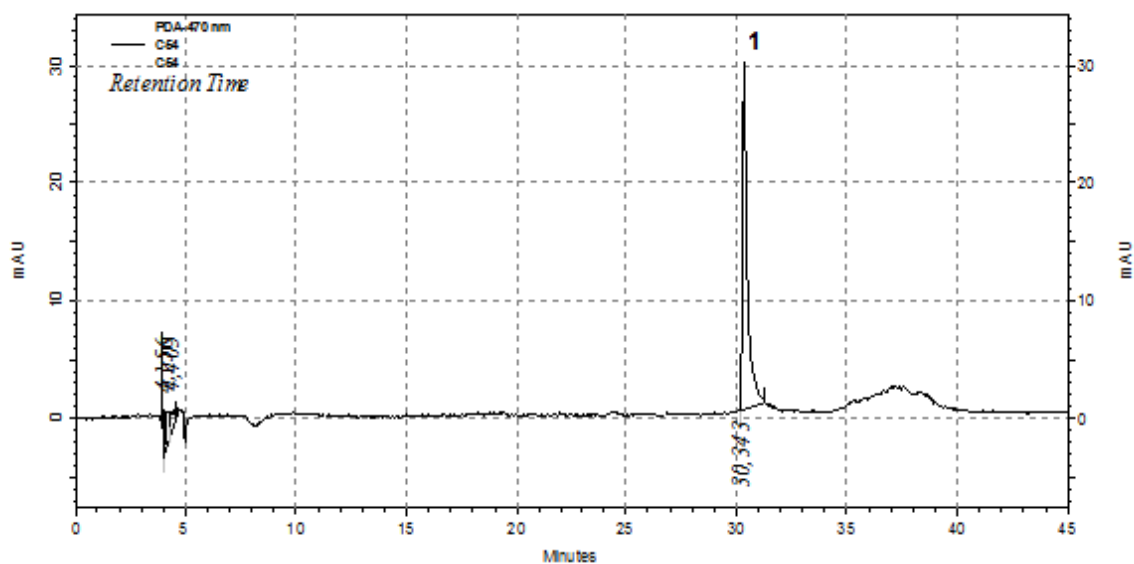


Figura E.10.: Cromatograma do extrato 1ª etapa: scCO₂ a 50 °C e 400 bar (C54) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

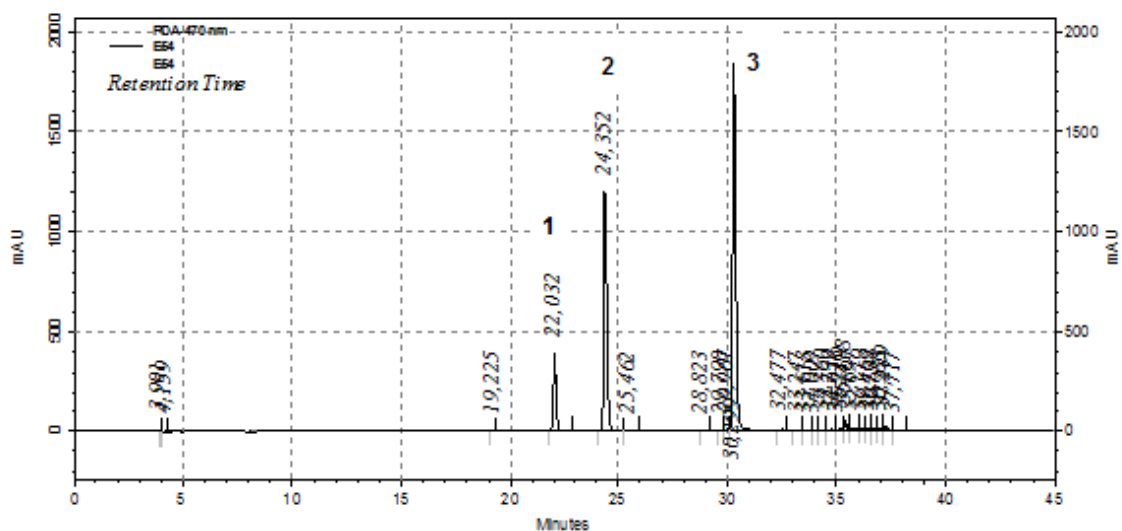


Figura E.11.: Cromatograma do extrato 2ª etapa: etanol a 50 °C e 400 bar (E54) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

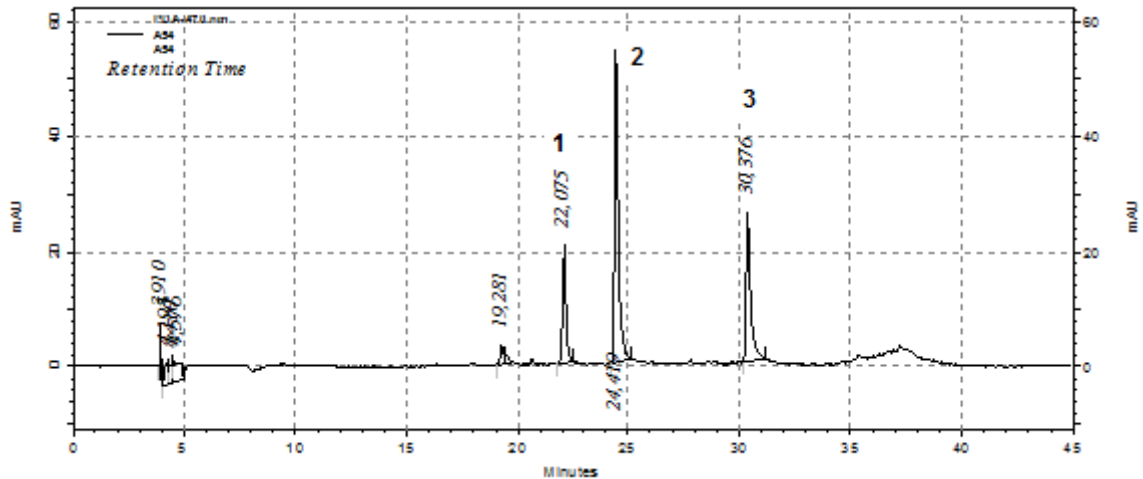


Figura E.12.: Cromatograma do extrato aquoso residual convencional a 50 °C e 400 bar (A54) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

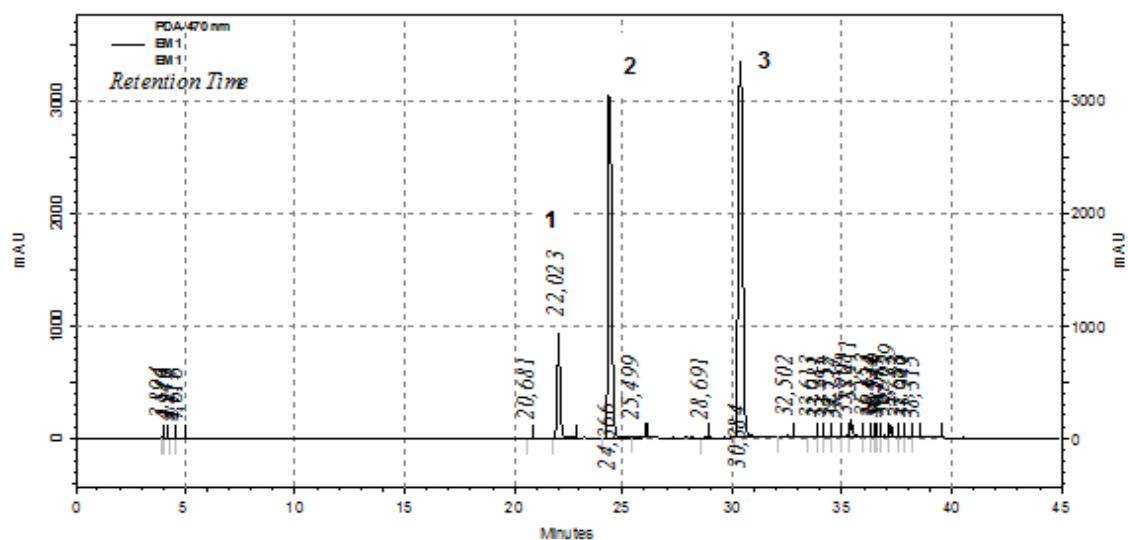


Figura E.13.: Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

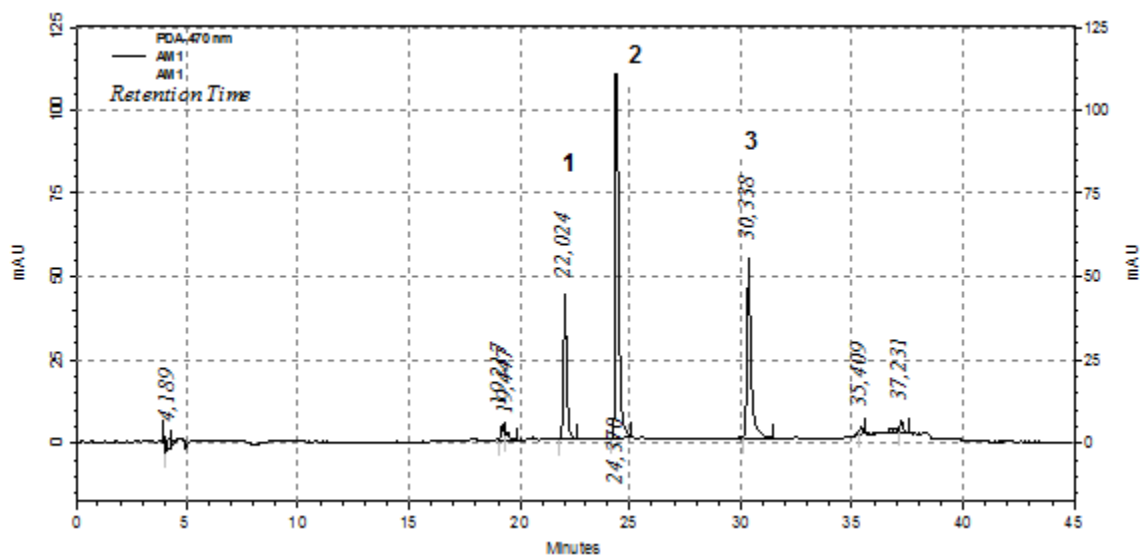


Figura E.14.: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água (AM1) 40 °C e 300 bar de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

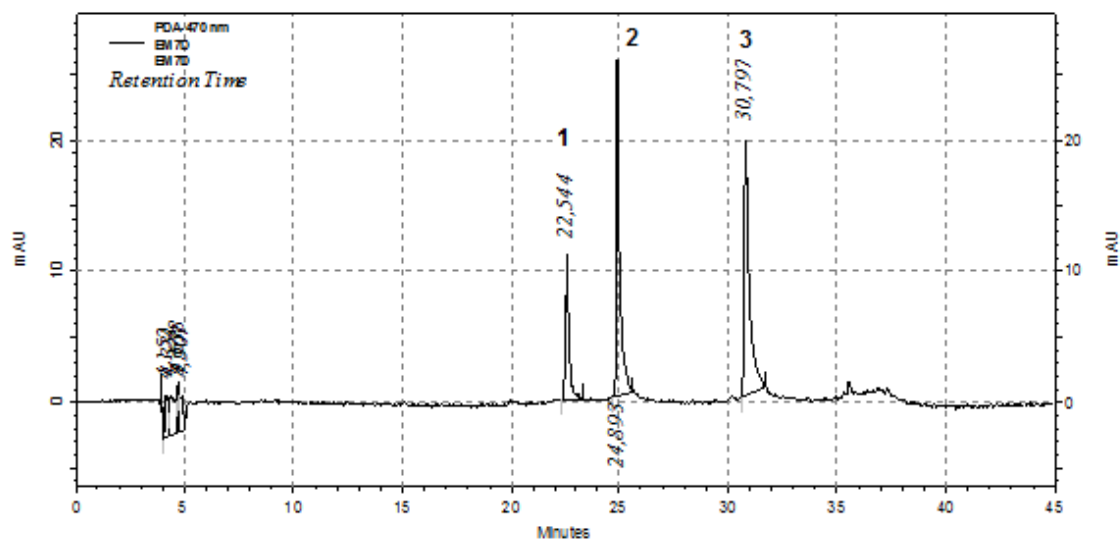


Figura E.15.: Cromatograma do extrato 2º etapa: mistura 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1% água (EM7) a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

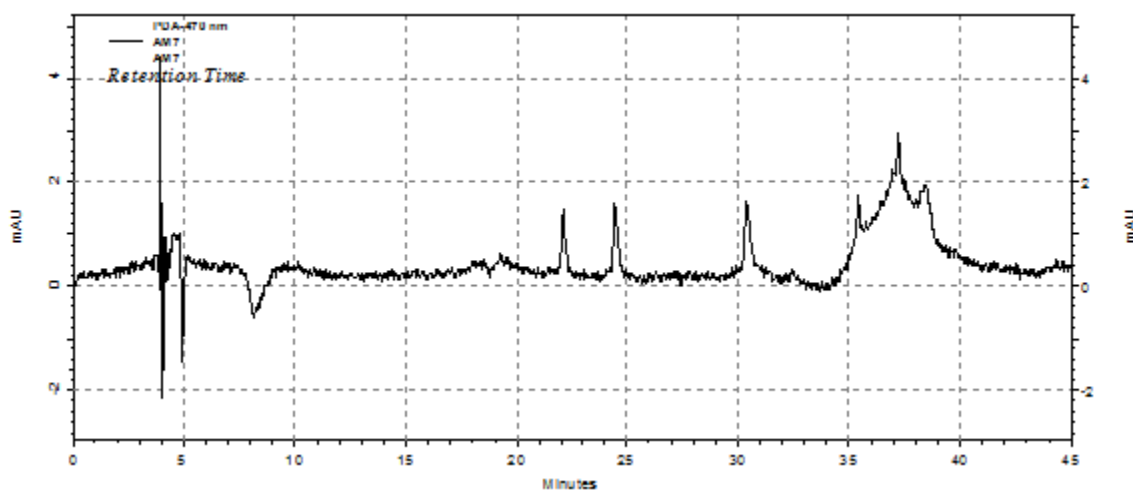


Figura E.16.: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1% água (AM7) a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min.

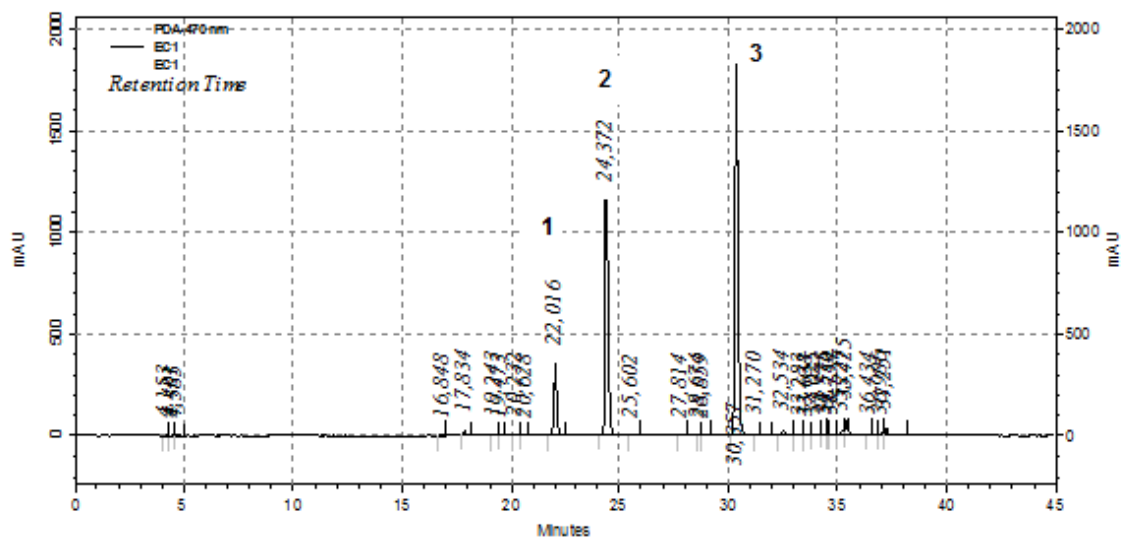


Figura E.17.: Cromatograma do extrato convencional etanólico (EC1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

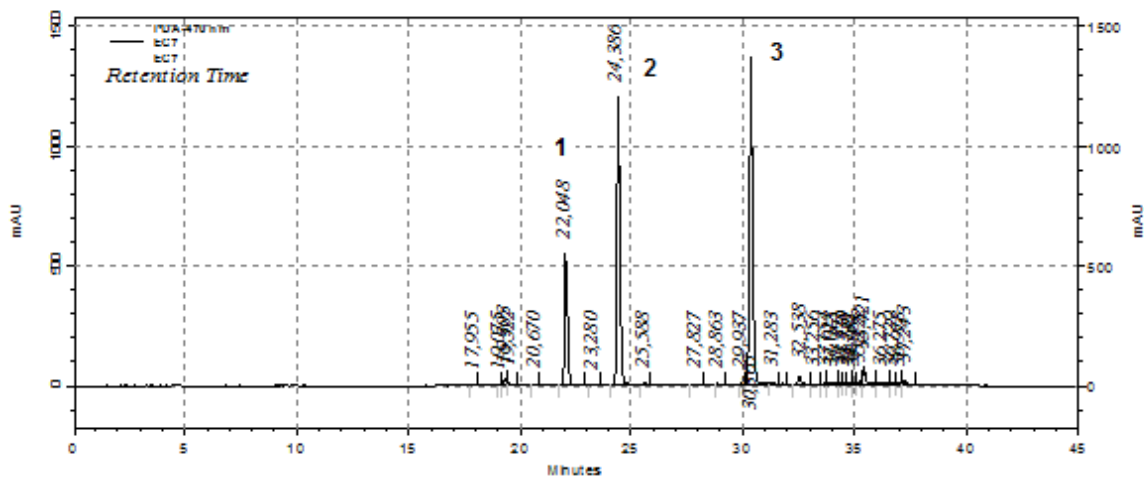


Figura E.18.: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) (EC7) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

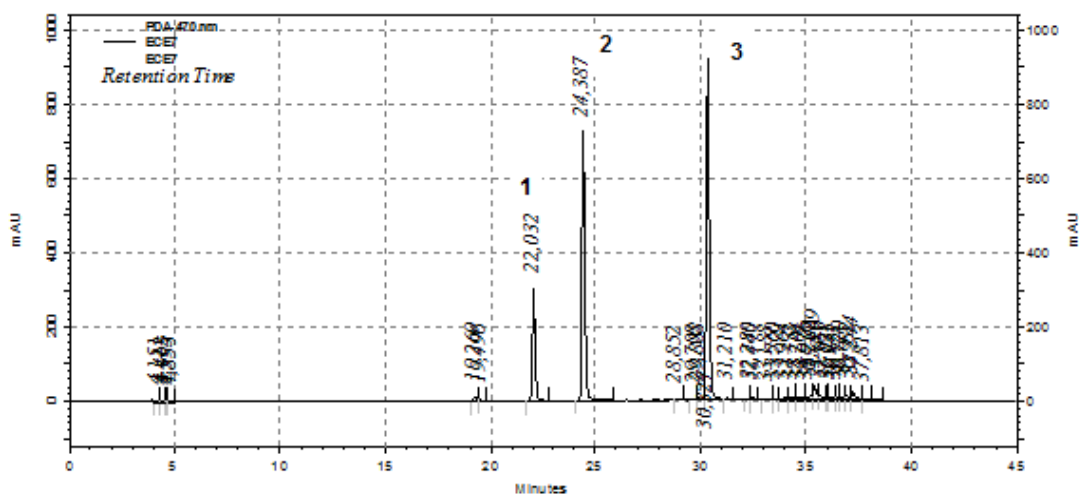


Figura E.19.: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) em extrator em leito fixo a 40 °C e 300 bar (ECE7) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

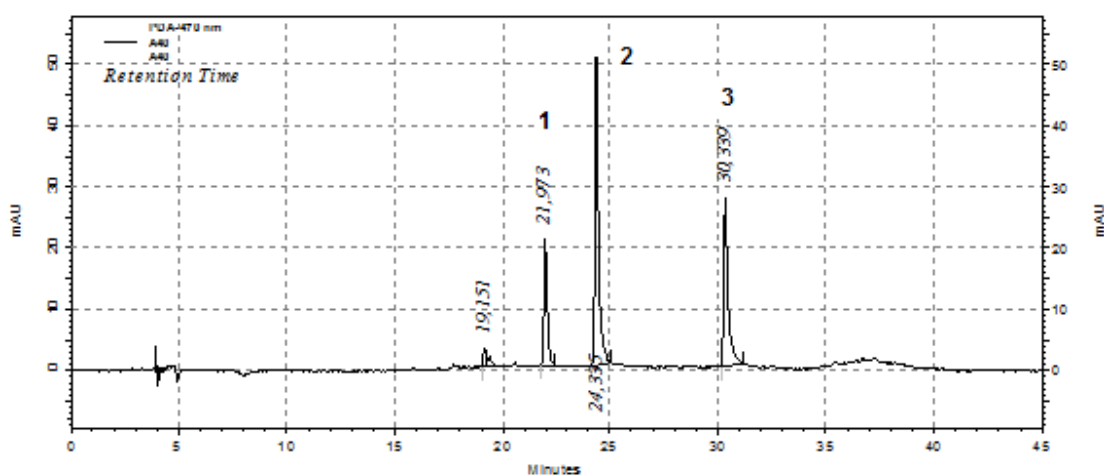


Figura E.20.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 40 °C (A40) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

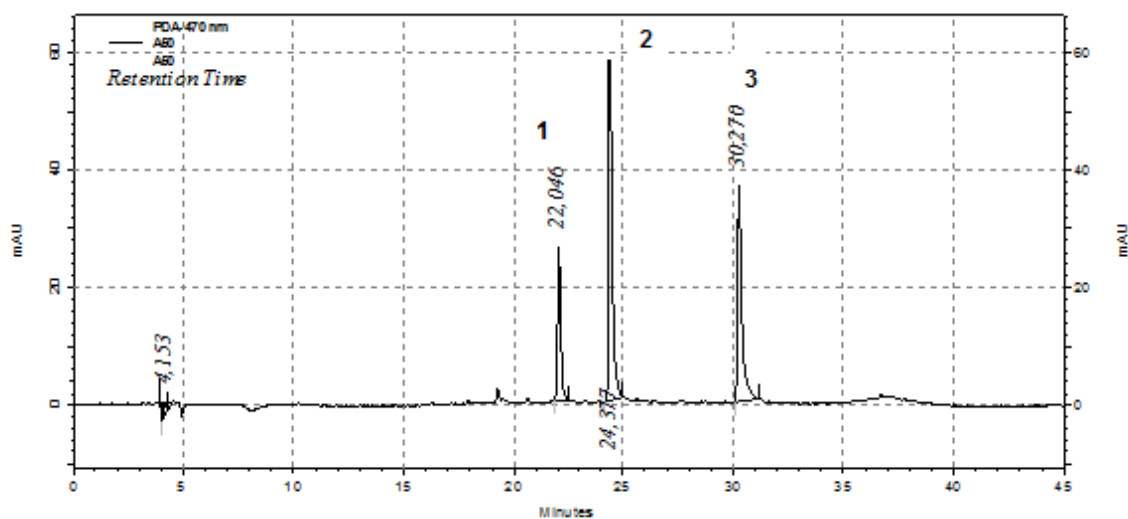


Figura E.21.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 50 °C (A50) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

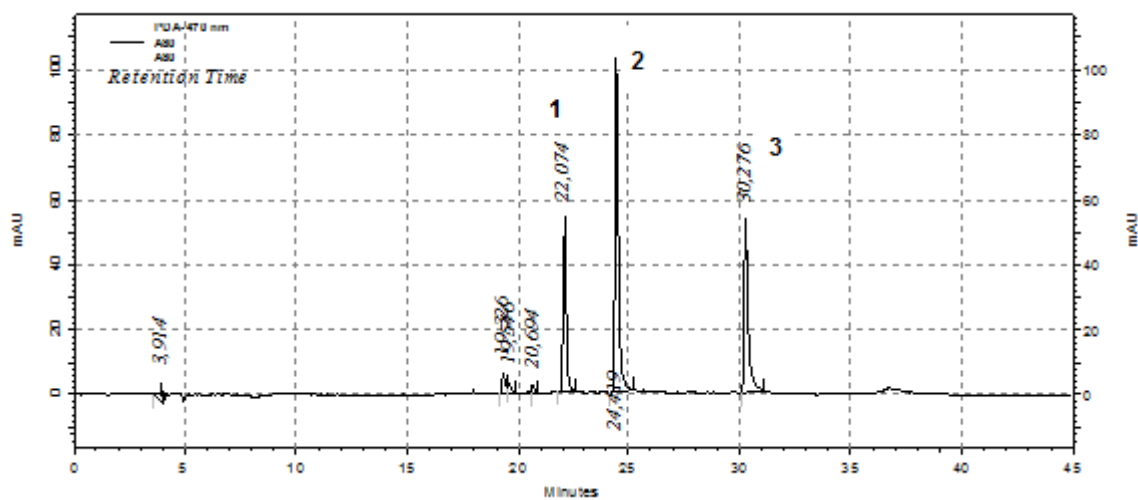


Figura E.22.: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 80 °C (A80) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35°C, $\lambda=470$ nm, fluxo 0,5 mL/min. Pico 1: 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium; Pico 2: 6,7-trihidoxi-5-metoxiflavilium; Pico 3: carajurina (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium).

ANEXO F – Cromatogramas dos extratos de *Arrabidaea chica* obtidos por CLAE – 350nm.

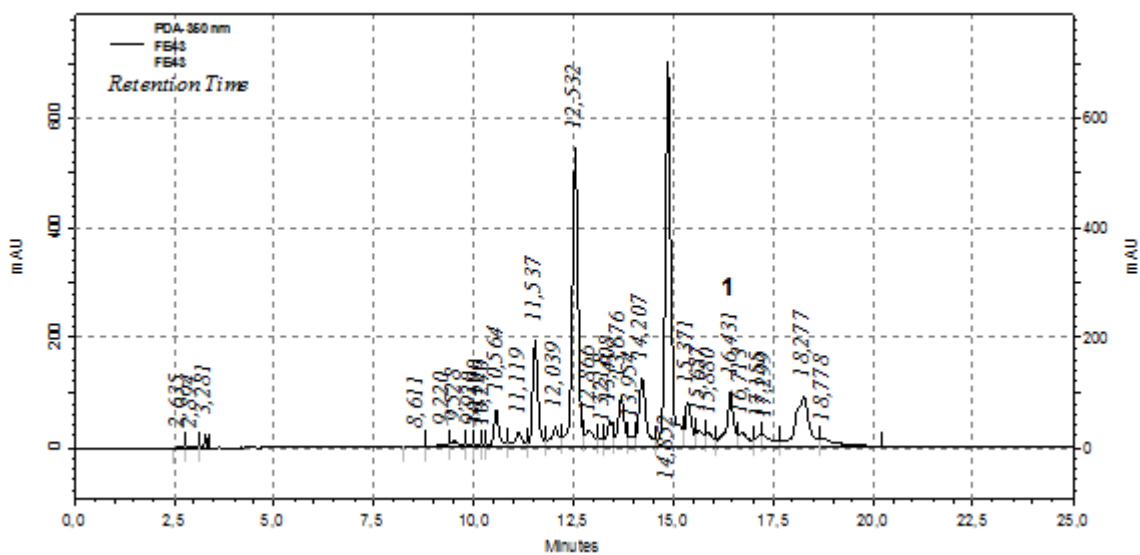


Figura F.1: Cromatograma do extrato 2º etapa: etanol á 40 °C e 300 bar (E43) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR = 16,431).

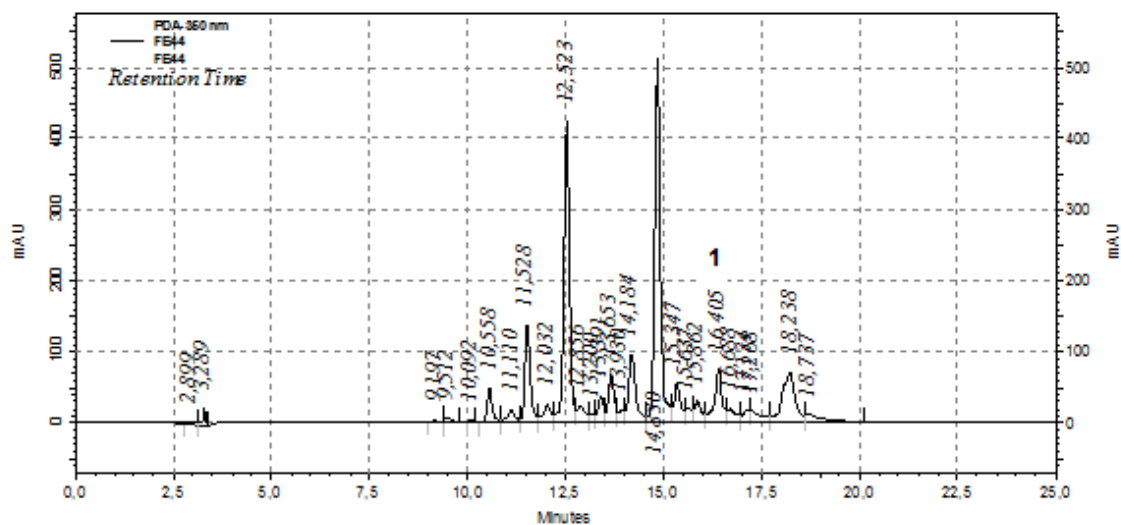


Figura F.2: Cromatograma do extrato 2º etapa: etanol á 40 °C e 400 bar (E44) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,405).

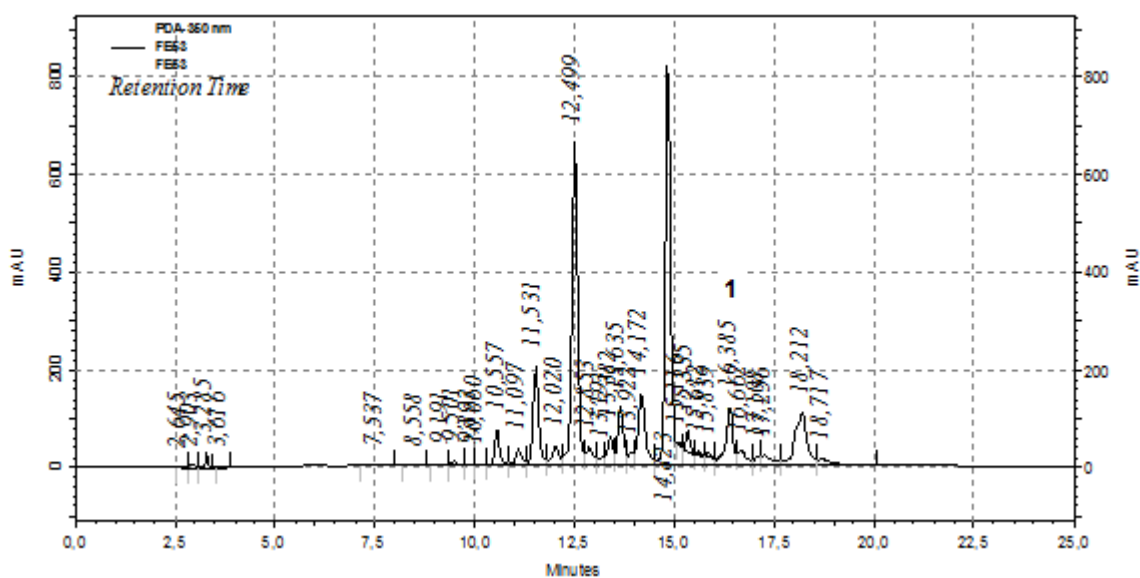


Figura F.3: Cromatograma do extrato 2º etapa: etanol à 50 °C e 300 bar (E53) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,385).

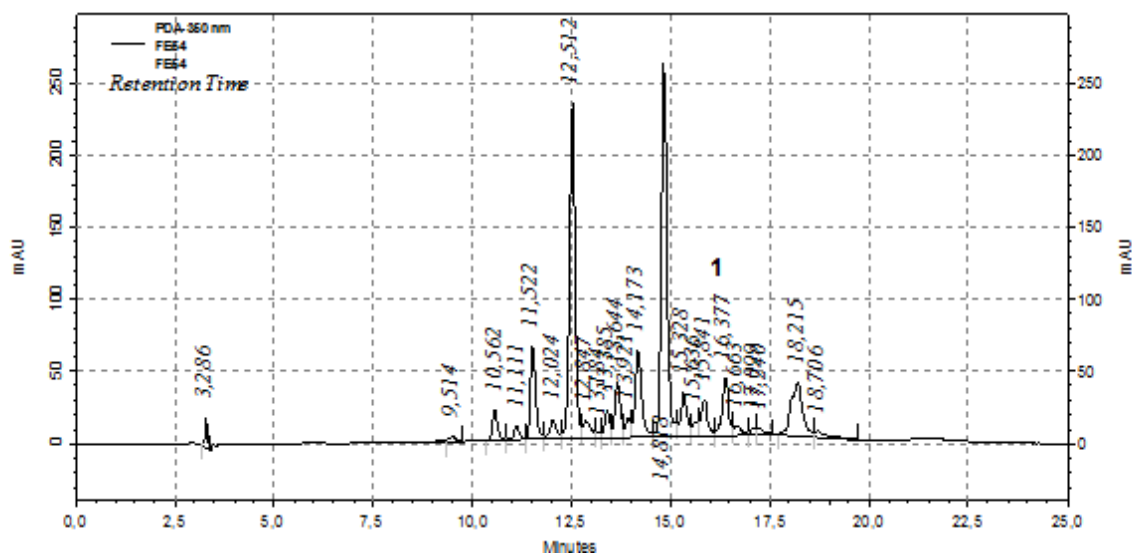


Figura F.4: Cromatograma do extrato 2º etapa: etanol à 50 °C e 400 bar (E54) de *A. chica*, Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,377).

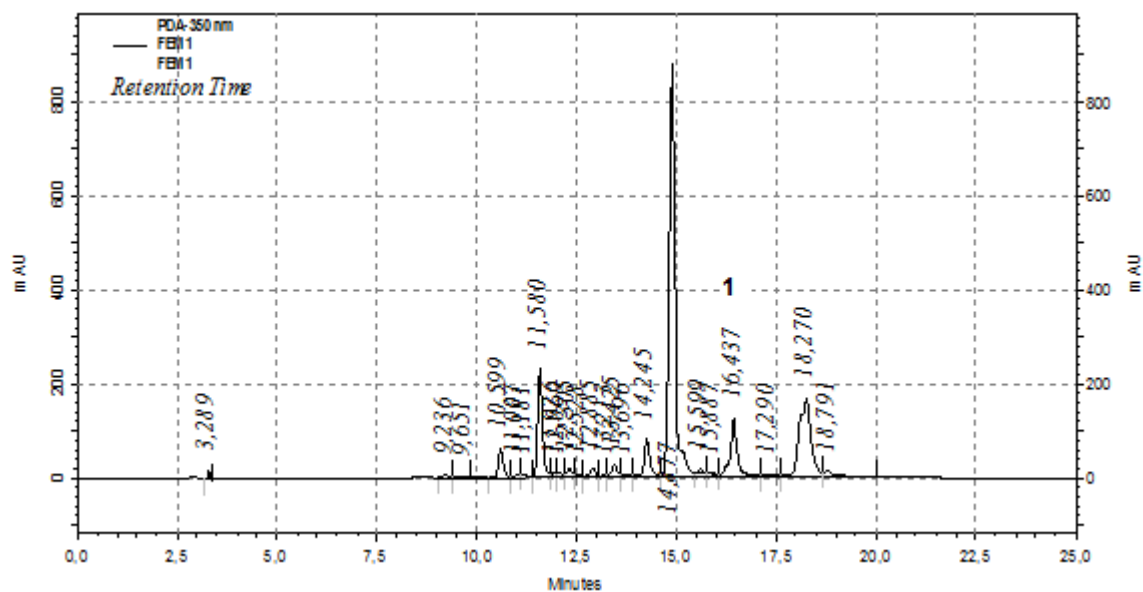


Figura F.5: Cromatograma do extrato da mistura 80,8 % scCO₂, 19,2 % etanol e 0 % água 40 °C e 300 bar (EM1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,437).

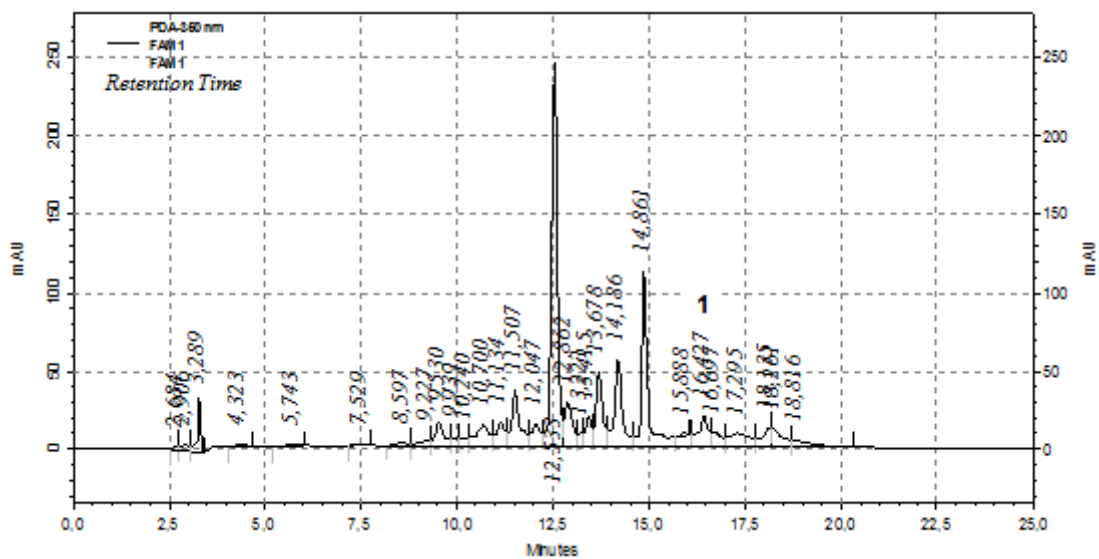


Figura F.6: Cromatograma do extrato convencional residual aquoso da mistura 80,8% scCo₂, 19,2 % etanol e 0% água (AM1) 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,427).

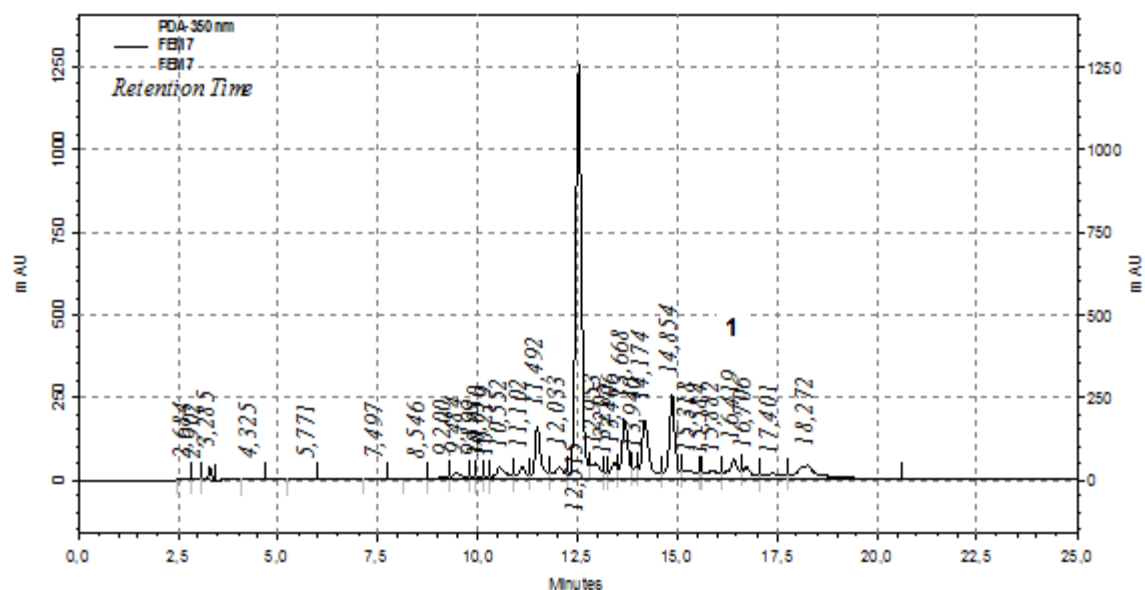


Figura F.7: Cromatograma do extrato 2º etapa: mistura 79,6 % scCO₂, 14,3 % etanol, 6,1 % água a 40 °C e 300 bar de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,419).

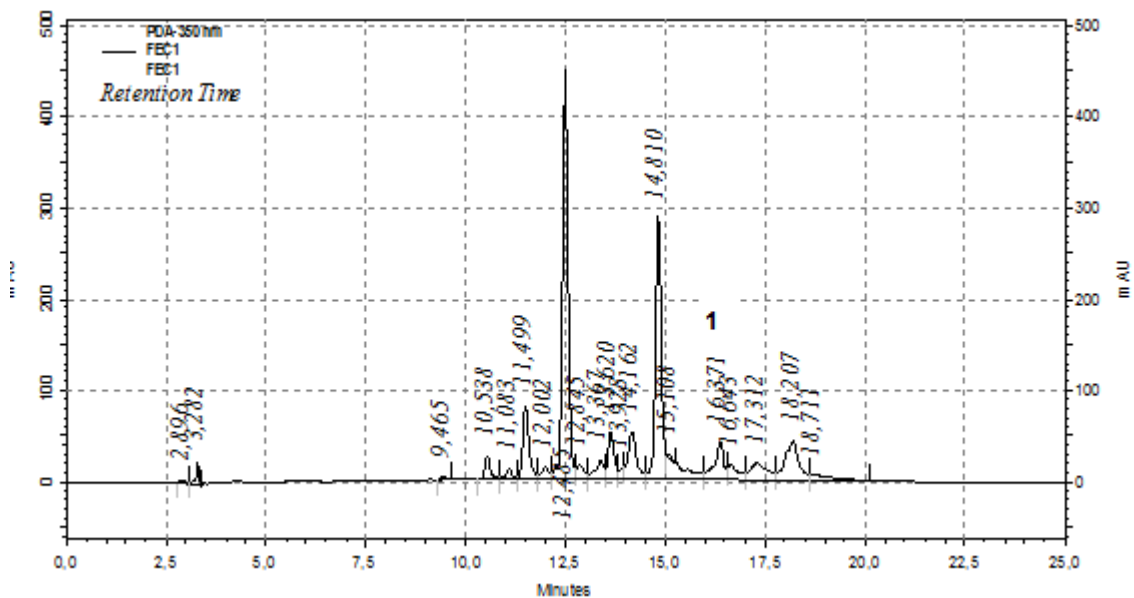


Figura F.8: Cromatograma do extrato convencional etanólico (EC1) de *A.chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,371).

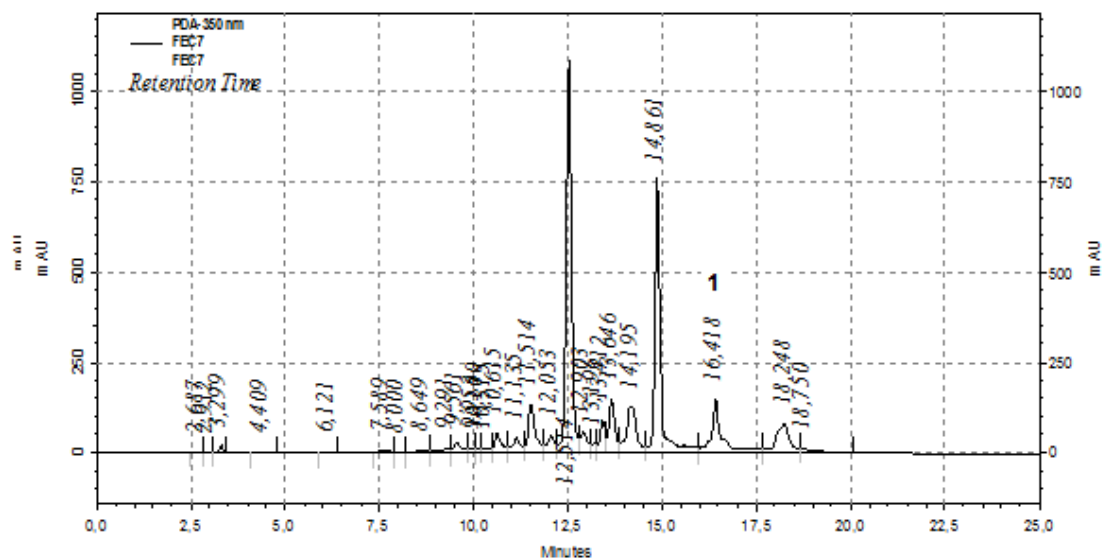


Figura F.9: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) (EC7) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,418).

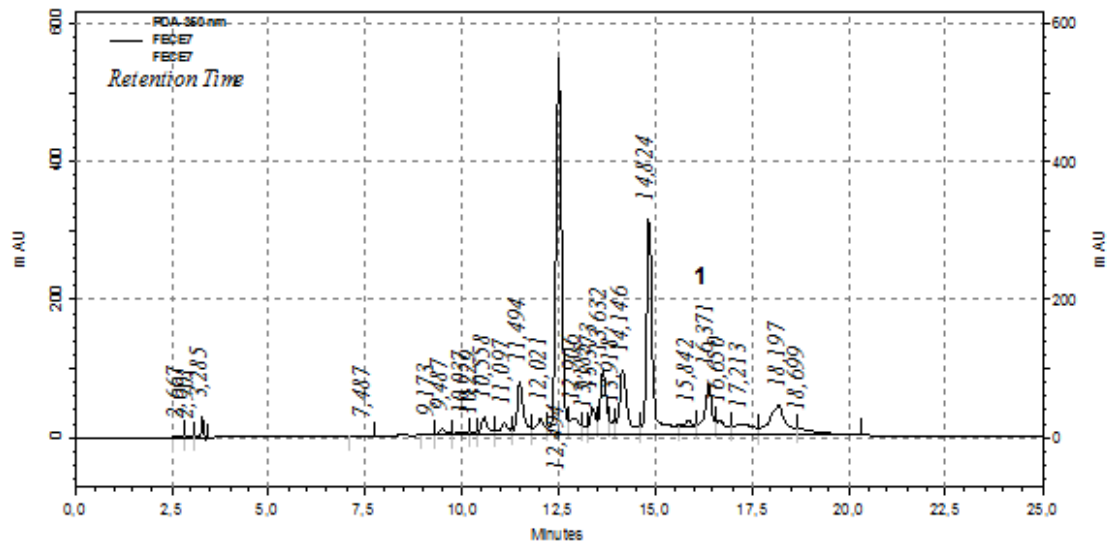


Figura F.10: Cromatograma do extrato convencional hidroalcoólico (70:30) em extrator em leito fixo a 40 °C e 300 bar (ECE7) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,371).

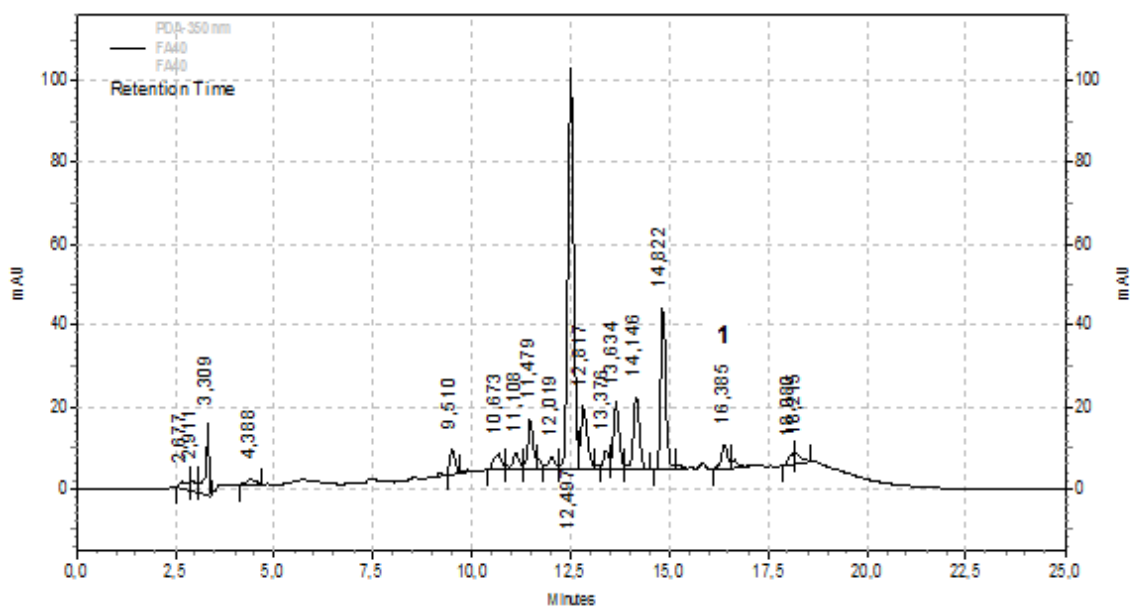


Figura F.11: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 40 °C (A40) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,385).

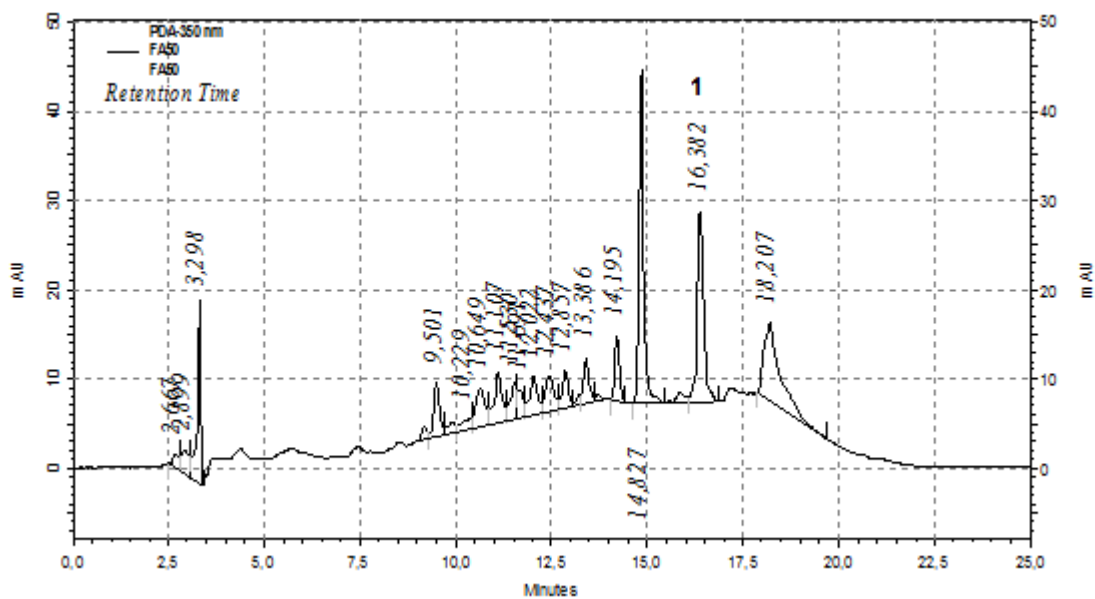


Figura F.12: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 50 °C (A50) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,382).

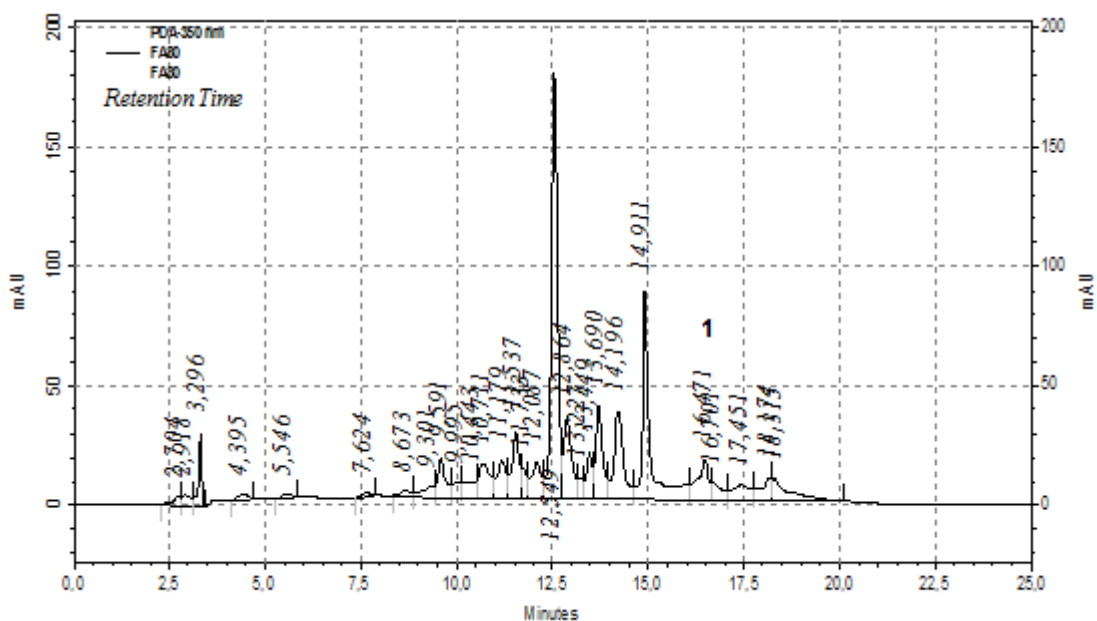


Figura F.13: Cromatograma do extrato aquoso convencional a 80 °C (A80) de *A. chica*. Coluna C18 Gemini a 35 °C, $\lambda=350$ nm, fluxo 1 mL/min. Pico 1: Luteolina (TR=16,471).