



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico

Carla Roberta Piantino

Engenheira de Alimentos (UCG, 2004)

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Orientador

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas – São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P573e Piantino, Carla Roberta
Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico / Carla Roberta Piantino. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. Artepillin-C. 3. Extração supercrítica. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana.
I. Cabral, Fernando Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Extraction of phenolic compounds from alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) using supercritical carbon dioxide

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Baccharis dracunculifolia*, Artepillin-C, Supercritical extraction, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral

Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Carmen Lucia Queiroga

Alessandra Lopes de Oliveira

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
(Orientador)

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro
(Membro)

Dra. Carmen Lucia Queiroga
(Membro)

Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira
(Membro)

Dedico este trabalho:

À minha mãe Rosária, aos meus irmãos Rogério, Fernando, a minha tia Ana Maria e minha vózinha Antonia, por todo apoio e amor necessário, mesmo de longe, na minha trajetória.

Ao Leandro que foi meu precioso companheiro, trazendo alegria, paz e ternura para meus dias.

AGRADECIMENTOS

À Deus, nossa força maior, pela minha vida e pela luz nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Fernando Cabral, pela oportunidade, incentivo, compreensão e pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Ao curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da FEA/UNICAMP pela oportunidade e ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

Aos pesquisadores Dr. Pedro Mellilo de Magalhães e Dra. Carmen Lucia Queiroga do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/ UNICAMP) pela matéria-prima fornecida e pela colaboração neste trabalho.

À Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro e à Dra. Alexandra Sawaya, pela parceria na realização de análises.

Aos meus amigos Dani e Luis pela amizade, risadas e carinho nesse período de trabalho.

Aos colegas do EXTRAE que direta ou indiretamente me auxiliaram com apoio e companheirismo.

Aos Doutores da banca, pela valiosa contribuição.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autora: Carla Roberta Piantino

Título: Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico

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

Resumo

Extratos de folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram obtidos usando como solventes, o dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), o etanol e o metano. Coletou-se também em alguns ensaios de SC-CO₂, a fração + voláteis do óleo essencial pela captura em armadilha com adsorvente Porapak-Q. Os ensaios com SC-CO₂ foram realizados em triplicata nas pressões de 200, 300 e 400 bar e nas temperaturas de 40, 50 e 60°C. Mediram-se o rendimento global de extração (X_o), a atividade antioxidante por seqüestro do radical DPPH e a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) foi utilizada para determinação de quatro compostos fenólicos: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA, também conhecido como Artepillin C), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 4-hidroxicinâmico (ácido p-cumárico); 4'-metoxi-3,5,7-triidroxiflavona (canferide). A composição dos óleos essenciais foi obtida por análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os rendimentos globais de extração (X_o) obtidos pelos métodos convencionais com etanol e metanol foram respectivamente 6,11 e 10,94%, sendo maiores que os valores entre 2,40 e 4,71% obtidos por SC-CO₂. Observou-se que a concentração dos componentes fenólicos analisados nos extratos supercríticos obtidos a 60°C e 400 bar foi maior que nos extratos alcoólicos, exceto para o ácido p-cumárico e os rendimentos de extração de canferide, Artepillin C e PHCA foram 156%, 98% e 64%, respectivamente, maiores nos ensaios com SC-CO₂ que nos extratos alcoólicos. O rendimento

médio dos voláteis foi de 0,17% e esses voláteis apresentaram teores de monoterpenos entre 16,5 e 26,5%, teores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos de 60,8 a 74,3% e teores de álcoois sesquiterpênicos de 5,1 a 10,7%. Os melhores resultados de atividade antioxidante foram encontrados no extrato etanólico ($ED_{50} = 26,68 \mu\text{g/mL}$) e no extrato supercrítico obtido a 50°C e 300 bar com 5% de etanol na matriz ($ED_{50} = 23,88 \mu\text{g/mL}$). Todos os extratos, exceto o metanólico, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; Artepillin C; extração supercrítica; atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

MASTER DEGREE THESIS

Author: Carla Roberta Piantino

Title: Extraction of Phenolic Compounds from alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) using supercritical carbon dioxide

Major Professor: Dr. Fernando A. Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

Abstract

Extracts from *Baccharis dracunculifolia* leaves were obtained using the following solvents: supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), ethanol and methanol. The most fraction + volatiles of essential oil of some SC-CO₂ trials was obtained by trapping it on adsorbent Porapak-Q. Supercritical extraction was carried out in triplicate at temperatures of 40, 50 and 60°C and pressures of 200, 300 and 400 bar. The global extraction yields (X₀), the antioxidant activity using DPPH radical scavenging and the antimicrobial activity using the disk diffusion method were determined. Four phenolic compounds were analyzed in the extracts by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC): 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (DHCA or Artepillin C); 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid (PHCA); 4-hydroxycinnamic acid (p-coumaric acid) and 4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavone (kaempferide). The essential oils' composition was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The global extraction yields (X₀) obtained by the conventional methods with ethanol and methanol were 6.11 and 10.94%, respectively. These results were higher than the ones obtained by SC-CO₂ (between 2.40 and 4.71%). In the supercritical extracts obtained at 60°C and 400 bar, the concentration of analysed phenolic compounds were higher than in the alcoholic extracts (except to p-coumaric acid), and the extraction yields of kaempferide, artepillin C and PHCA, were 156%, 98% and 64% higher, respectively, than in the alcoholic extracts. The average yield of volatiles obtained from supercritical extration was 0.17%. These volatiles presented monoterpenes

contents between 16.5% and 26.5%, sesquiterpene hydrocarbons contents 60.8% and 74.3%, and sesquiterpene alcohols between 5.1% and 10.7%. The ethanolic extract ($ED_{50} = 26.68 \mu\text{g/mL}$) and the supercritical extract obtained at 50°C and 300 bar with 5% of ethanol in the matrix ($ED_{50} = 23.88 \mu\text{g/mL}$) were shown to have the higher antioxidant activities among all the studied extracts. All extracts, except the methanolic one, presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*; Artepillin C; supercritical extraction; antioxidant activity, antimicrobial activity.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVOS GERAIS	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS	6
3.1.2. Atividade antioxidante	8
3.2. BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA	10
3.2.1. Composição química da <i>B. dracunculifolia</i>	11
3.2.2. Aspectos Farmacológicos	14
3.3. EXTRAÇÃO SUPERCÍTICA	16
3.3.1. Fluido supercrítico	18
3.3.2. Dióxido de carbono como solvente	19
3.3.3. Co-solventes	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. MATÉRIA-PRIMA	21
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	21
4.2.1. Moagem e Peneiragem	21
4.2.2. Determinação da densidade aparente	22
4.3. EXTRAÇÃO ALCOÓLICA	23
4.4. EXTRAÇÃO SUPERCÍTICA	23
4.4.1. Procedimento experimental	25
4.4.2. Planejamento dos experimentos	27
4.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS	28
4.5.1. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo negativo [ESI(-)-MS]	28
4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	29
4.5.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	30
4.5.4. Atividade antioxidante	31
4.5.5. Atividade antimicrobiana	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	34
5.2. RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	34
5.2.1. Efeito do diâmetro de partícula no rendimento de extração	34
5.2.2. Efeito da temperatura e pressão no rendimento de extração	35
5.2.3. Rendimento da fração volátil capturada em Porapak-Q.	37
5.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	38
5.3.1. Análise Qualitativa do óleo essencial por ESI(-)-MS	38
5.3.2. Análise Quantitativa da fração + volátil do óleo essencial por CLAE-FR	42
5.3.3. Análise Quantitativa dos voláteis por GC-MS	48
5.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
5.6. ORIGEM DA BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA	54

6.	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8	ANEXO A – DADOS EXPERIMENTAIS	70
9	ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS	74
10	ANEXO C – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS	80
11	ANEXO D – ANÁLISES DO ÓLEO ESSENCIAL.....	88
12	ANEXO E – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 3.1 <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i>	11
FIGURA 3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS (EEP) E DO EXTRATO METABÓLICO VEGETATIVO (EMV) (ALENCAR ET AL., 2005).	12
FIGURA 4.1 UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRAE.....	24
FIGURA 4.2 DIAGRAMA DA UNIDADE EXPERIMENTAL.....	25
FIGURA 4.3 ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> . ..	30
FIGURA 5.1 CURVA DE EXTRAÇÃO DE FOLHAS A 50°C E 300 BAR E VAZÃO MÉDIA DO SOLVENTE DE 4,0 x 10 ⁻⁵ KG/S PARA DIFERENTES DIÂMETROS DE PARTÍCULA.	35
FIGURA 5.2 RENDIMENTO GLOBAL DO EXTRATO DE ALECRIM-DO-CAMPO OBTIDO A 200, 300 AND 400 BAR E VAZÃO MÉDIA DE 4,0 x 10 ⁻⁵ KG/S.....	36
FIGURA 5.3 ESPECTRO DE MASSA POR ESI(-)-MS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> . ..	40
FIGURA 5.4 ESPECTRO DE MASSA POR ESI(-)-MS DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> . ..	41
FIGURA 5.5 CONCENTRAÇÃO DO ARTEPILLIN C NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS (A) E NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM MG/G DE FOLHAS (B).....	44
FIGURA 5.6 EFEITO DA TEMPERATURA E PRESSÃO NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO P-CUMÁRICO EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO NO EXTRATO (A) E AO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM MG/G DE FOLHAS (B).	46
FIGURA 9.1 ESPECTRO DE MASSA DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	75
FIGURA 9.2 ESPECTRO DE MASSA DO EXTRATO METANÓLICO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	76
FIGURA 9.3 ESPECTRO DE MASSA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C, 300 BAR.....	77
FIGURA 9.4 ESPECTRO DE MASSA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50 °C, 300 BAR E COM 5% (M/M) DE CO-SOLVENTE ETANOL.	78
FIGURA 9.5 ESPECTRO DE MASSA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50 °C, 300 BAR E COM 5% (M/M) DE CO-SOLVENTE ACETATO DE ETILA.	79
FIGURA 10.1 CROMATOGRAMA DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	81
FIGURA 10.2 CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	81
FIGURA 10.3 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 40°C, 200 BAR.	82
FIGURA 10.4 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> .OBTIDO POR ESC A 40°C, 300 BAR.	82
FIGURA 10.5 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 40°C, 400 BAR.	83
FIGURA 10.6 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50°C, 200 BAR.	83

FIGURA 10.7 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50°C, 300 BAR.	84
FIGURA 10.8 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50°C, 400 BAR.	84
FIGURA 10.9 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 60°C, 200 BAR.	85
FIGURA 10.10 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 60°C, 300 BAR.	85
FIGURA 10.11 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 60°C, 400 BAR.	86
FIGURA 10.12 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50°C, 300 BAR E COM 5% DE CO-SOLVENTE ETANOL.	86
FIGURA 10.13 CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50°C, 300 BAR E COM 5% DE CO-SOLVENTE ACETATO DE ETILA.	87
FIGURA 11.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO + VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC.	89
FIGURA 11.2 CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO + VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50 °C, 300 BAR.	90
FIGURA 11.3 CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO + VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50 °C, 300 BAR E 5% (M/M) DE ACETATO DE ETILA.	90
FIGURA 11.4 CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO + VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO POR ESC A 50 °C, 300 BAR E 5% (M/M) DE ETANOL.	91
FIGURA 12.1 AA DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> .	93
FIGURA 12.2 AA DO EXTRATO METANÓLICO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> .	93
FIGURA 12.3 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 40°C E 200 BAR.	94
FIGURA 12.4 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 40°C E 300 BAR.	94
FIGURA 12.5 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 40°C E 400 BAR.	95
FIGURA 12.6 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C E 200BAR.	95
FIGURA 12.7 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C E 300 BAR.	96
FIGURA 12.8 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C E 400BAR.	96
FIGURA 12.9 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 60°C E 200BAR.	97
FIGURA 12.10 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 60°C E 300 BAR.	97
FIGURA 12.11 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 60°C E 400BAR.	98
FIGURA 12.12 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C E 300 BAR + 5% (M/M) DE ETANOL.	98
FIGURA 12.13 AA DO EXTRATO <i>B.DRACUNCULIFOLIA</i> OBTIDO A 50°C E 300 BAR + 5% (M/M) DE ACETATO DE ETILA.	99

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 3.1 ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS (CIMPOIU, 2006).	7
TABELA 3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS DA PRÓPOLIS E <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> EM MG/G, DETERMINADO POR CLAE-FR (PARK ET AL., 2004).	13
TABELA 3.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS EM DIFERENTES ESTADOS (RIZVI ET AL., 1986).	18
TABELA 4.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, EMPREGANDO-SE O DPPH.	32
TABELA 5.1 RENDIMENTO (% EM MASSA) DA FRAÇÃO VOLÁTIL CAPTURADA EM ARMADILHAS COM POLÍMERO PORAPAK Q.	38
TABELA 5.2 COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR ESI(-)-MS NOS EXTRATOS DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	39
TABELA 5.3 CONCENTRAÇÃO E RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	43
TABELA 5.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA (% RELATIVA EM ÁREA) DO ÓLEO ESSENCIAL DO ALECRIM-DO-CAMPO OBTIDO POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO.	49
TABELA 5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDA PELO MÉTODO DO DPPH.	52
TABELA 5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> POR MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO NOS EXTRATOS.	54
TABELA 5.7 CONCENTRAÇÃO DE ARTEPILLIN C E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS ETANÓLICOS DE ALECRIM-DO-CAMPO DE DIFERENTES ACESSOS.	56
TABELA 8.1 DENSIDADE APARENTE DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> SECA E TRITURADA.	71
TABELA 8.2 DADOS PARA CÁLCULO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS DAS FOLHAS DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	71
TABELA 8.3 RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 50°C E 300 BAR.	71
TABELA 8.4 RENDIMENTO DO EXTRATO SUPERCRÍTICO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i>	72
TABELA 8.5 EXPERIMENTO DE EXTRAÇÃO DE ALECRIM-DO-CAMPO REALIZADO A 50°C E 300 BAR, VAZÃO MÉDIA DO SOLVENTE DE $4,0 \times 10^{-5}$ KG/S E COM MASSA INICIAL DE MATÉRIA-PRIMA EM TORNO DE $7,0 \times 10^{-3}$ KG.	72
TABELA 8.6. EXPERIMENTO DE EXTRAÇÃO DA <i>B. DRACUNCULIFOLIA</i> REALIZADA A 50°C E 300 BAR, VAZÃO MÉDIA DO SOLVENTE DE $4,0 \times 10^{-5}$ KG/S E COM MASSA INICIAL DE MATÉRIA-PRIMA DE $7,02 \times 10^{-3}$ KG.	73

NOMENCLATURA/ ABREVIações

AA: Atividade Antioxidante

B. dracunculifolia: *Baccharis dracunculifolia*

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE-FR: Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

CO₂: dióxido de carbono

DHCA: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid)

d_{mg}: diâmetro médio geométrico das partículas

DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ESC: extração supercrítica

ESI(–)-MS: ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massas em modo negativo (electrospray ionization mass and tandem mass spectrometry in the negative ion mode)

P_c: pressão crítica

PHCA: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid)

SC-CO₂: extração com dióxido de carbono supercrítico (supercritical carbon dioxide extraction)

SF: fluidos supercríticos (supercritical fluid)

T_c: temperatura crítica

V_c: volume crítico

X₀: rendimento global de extração

1. INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais tem sido associado a uma dieta saudável porque além do seu potencial nutritivo, estes alimentos apresentam moléculas como as vitaminas C e E, α -tocoferol, β -caroteno e compostos fenólicos que desempenham funções biológicas (Gaulejac et al., 1999).

Os compostos fenólicos (naturais ou sintéticos) são metabólitos secundários que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros. A presença desses compostos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (Aziz *et al.*, 1998; Hollman & Katan, 1998), além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa em vários alimentos (Peleg *et al.*, 1998).

O alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), arbusto que cresce naturalmente no sul e sudeste do Brasil, é conhecido por sua interação com insetos, especialmente as abelhas *Apis mellifera* L. e por possuir diversidade de compostos fenólicos (Alencar et al., 2005). Suas folhas são pontuadas por tricomas secretores ricos em metabólitos secundários e também apresentam dutos secretores, estruturas que produzem e armazenam os óleos essenciais. A importância comercial deste óleo, direcionado para indústria de cosméticos, está

diretamente relacionada com a concentração dos compostos nerolidol e espatulenol (Ferronato, et al., 2007).

Os metabólitos secundários de *B. dracunculifolia* são usados pelas abelhas *A. mellifera* para a produção de própolis verde (Park et al., 2004; Alencar et al., 2005) que é extremamente valorizada pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias na forma de alimentos funcionais (Ackermann, 1991). A importância da própolis vem se destacando pelas suas várias atividades farmacológicas, como a atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, anti-*Trypanosoma cruzi*, anticariogênica, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante (Marcucci et al., 2001, Montpied et al., 2003, Ghisalberti, 1989, Burdock, 1998, Cunha et al., 2004, Duarte et al. 2003, Ishikawa et al., 2004). As diversas atividades biológicas da própolis têm sido atribuídas ao sinergismo entre seus diversos compostos químicos (Krol et al., 1993) e principalmente à presença de compostos fenólicos, destacando os flavonóides e os ácidos fenólicos (Funari & Ferro, 2006) que também são encontrados na *B. dracunculifolia*.

Um importante ácido fenólico presente na própolis brasileira e nesta espécie vegetal é o 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, conhecido como Artepillin C. Estudos mostraram que esse ácido inibiu a peroxidação lipídica e o desenvolvimento de câncer pulmonar em ratos (Kimoto et al., 2001b), preveniu câncer do cólon através da indução da interrupção do ciclo celular, foi um importante quimiopreventivo na carcinogênese do cólon (Shimizu et al., 2005) e teve efeitos anti-leucêmicos com efeitos inibidores limitados sobre linfócitos normais.

O uso de fluidos supercríticos para a extração de compostos ativos das matrizes vegetativas tem-se mostrado uma tecnologia potencial, apresentando vantagens em relação à extração com solventes comuns, tais como a possibilidade de se poder manipular a seletividade do solvente no processo, pela escolha apropriada deste e da combinação solvente/co-solvente e a eliminação de solventes orgânicos poluentes e dos altos custos com pós-processamento do extrato para sua retirada (Reverchon & Marco, 2006). O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado na extração com fluido supercrítico. Além de ser inerte, não-tóxico, apresentar baixa temperatura e pressão crítica, é de fácil separação do extrato e pode ser utilizado na extração de matéria-prima natural, principalmente na indústria de alimentos e farmacêutica.

Considerando o alto valor comercial da própolis brasileira e a presença de pelo menos 18 substâncias químicas idênticas entre a própolis e a *B. dracunculifolia* (Alencar et al., 2005 e Park et al., 2004), essa espécie vegetal poderá vir a ser uma importante e viável fonte para se extrair componentes biologicamente ativos de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivos gerais*

Obter extratos de folhas de alecrim-do-campo empregando o dióxido de carbono supercrítico. Medir o rendimento global de extração e o rendimento de alguns compostos fenólicos e comparar com extratos obtidos por métodos convencionais usando o etanol e o metanol como solventes.

2.2 *Objetivos específicos*

- Estudar a influência da temperatura e pressão no rendimento de extração e na concentração de quatro compostos fenólicos, dentre os quais três são ácidos: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico (p-cumárico) e um flavonóide: 4'-metoxi-3,5,7-triidroxiflavona (canferide).
- Caracterizar alguns extratos usando espectros por ionização de spray de elétrons acoplado a espectrometria de massa em modo negativo [ESI(-)-MS/MS].
- Identificar e quantificar os compostos mais voláteis (do óleo essencial) que são arrastados pelo CO₂ gasoso no coletor e que foram capturados em armadilha de Porapak-Q.

- Medir a atividade antioxidante dos extratos supercríticos e alcoólicos por seqüestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).
- Medir a atividade antimicrobiana *in vitro* contra alguns microorganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (Naczki & Shahidi, 2004). A estrutura química dos fenólicos é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associados diretamente à estrutura cíclica. Estão presentes em vegetais na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas (Croft, 1998).

A diversidade estrutural desses compostos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em três grupos: ácidos fenólicos (ácidos benzóicos, cinâmico e seus derivados), flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e taninos. O grupo e a estrutura dos compostos fenólicos mais comuns são apresentados na Tabela 3.1. (Cimpoi, 2006).

Tabela 3.1 Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos (Cimpoi, 2006).

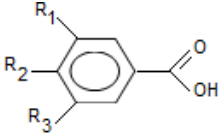
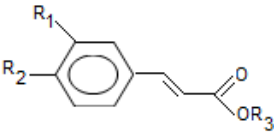
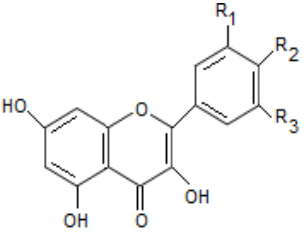
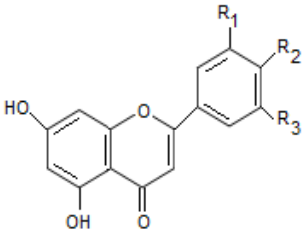
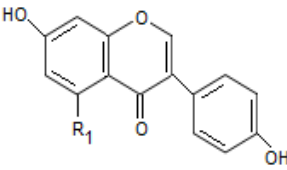
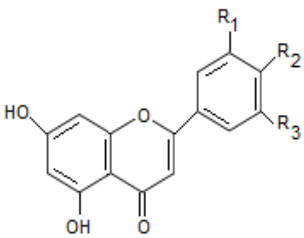
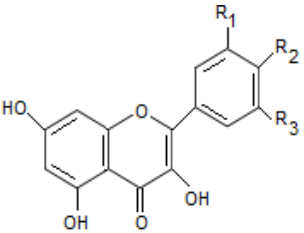
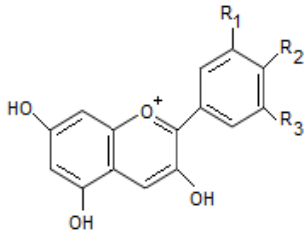
Grupos	Compostos	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido hidrobenzóico				
	Ácido protocatecuico	OH	OH	H
	Ácido gálico	OH	OH	OH
	Ácido hidroxicinâmico			
	Ácido cumárico	OH	H	H
	Ácido caféico	OH	OH	H
	Ácido ferúlico	OCH ₃	OH	H
Flavonóis				
	Canferol	H	OH	H
	Quercitina	OH	OH	H
	Miricetina	OH	OH	OH
	Galangina	H	H	H
	Canferide	H	OCH ₃	H
Flavonas				
	Apigenina	H	OH	H
	Luteolina	OH	OH	H
	Crisina	H	H	H
	Acacetina	H	OCH ₃	H
Isoflavonas				
	Daidzeína	H	-	-
	Genisteína	OH	-	-
R: radical				

Tabela 3.1 Continuação

Grupos	Compostos	R ₁	R ₂	R ₃
Flavanonas				
 Flavanóis	Naringenina	H	OH	H
	Hesperitina	OH	OCH ₃	H
	Pinocembrina	H	H	H
Antocianidinas				
 Antocianidinas	Catequina	OH	OH	H
	Galocatequina	OH	OH	OH
	Procianidina	H	OH	OH
 Antocianidinas	Pelargonidina	H	OH	H
	Cianidina	OH	OH	H
	Delfinidina	OH	OH	OH
	Petunidina	OCH ₃	OH	OH
	Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃

R: radical

3.1.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres

que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Namiki, 1990; Simic & Javanovic, 1994).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (RICE-EVANS et al., 1995).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (Shahidi *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias.

A ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas possuem um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal. Quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (Namiki, 1990 & Ramarathnam et al., 1995).

Segundo Pimentel et al. (2005), a atividade anti-carcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são 4,3',5'-trihidroxiestilbeno (resveratrol), 3,7,3'-trimetil éter (quercetina) e ácido 3,4-dihidroxicinâmico (ácido caféico).

3.2 *Baccharis dracunculifolia*

O gênero *Baccharis*, pertencente à família *Asteraceae*, está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. No Brasil, muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças. São consumidas principalmente na forma de chás com indicações para feridas e inflamações (*B. crispa* e *B. notoserghila*). As espécies *B. trimera*, *B. articulata* e *B. genistelloides* são utilizadas contra uma variedade de doenças, tais como desordens digestivas e do fígado, anemias, diabetes, inflamações urinárias, amigdalites, úlceras, entre outras (Melo et al., 2001). Outra forma de uso é o óleo essencial obtido a partir das folhas da *B. dracunculifolia* e *B. genistelloides* do sudeste do Brasil, extraídos por arraste a vapor. Estes óleos essenciais apresentam alto valor para a indústria de fragrância (Franco, 1995).

A espécie *Baccharis dracunculifolia* (*B. dracunculifolia*), conhecida no Brasil como alecrim-do-campo, é um arbusto dióico, perene, lenhoso e com altura de 2 a 3 metros (Figura 3.1). Apresenta características próprias de plantas invasoras e colonizadoras por produzir um grande número de aquênios e uma alta capacidade de crescimento natural, ocorrendo freqüentemente em áreas perturbadas e de pastagens. A sua floração ocorre após o período de chuvas, apresentando um pico no mês de novembro (Boldt, 1989; Espírito-Santo & Fernandes, 1998).



Figura 3.1 *Baccharis dracunculifolia*

3.2.1 Composição química da *B. dracunculifolia*

Analisando a composição química da própolis e da *B. dracunculifolia* pelas técnicas de cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência com espectrometria de massas, Alencar *et al.* (2005) e Park *et al.* (2004) identificaram algumas substâncias químicas idênticas (flavonóides e ácidos fenólicos), como

mostrado na Figura 3.2. Portanto, comprovaram que esta espécie vegetal é a principal fonte utilizada pelas abelhas *Apis mellifera* para a elaboração da própolis produzida nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

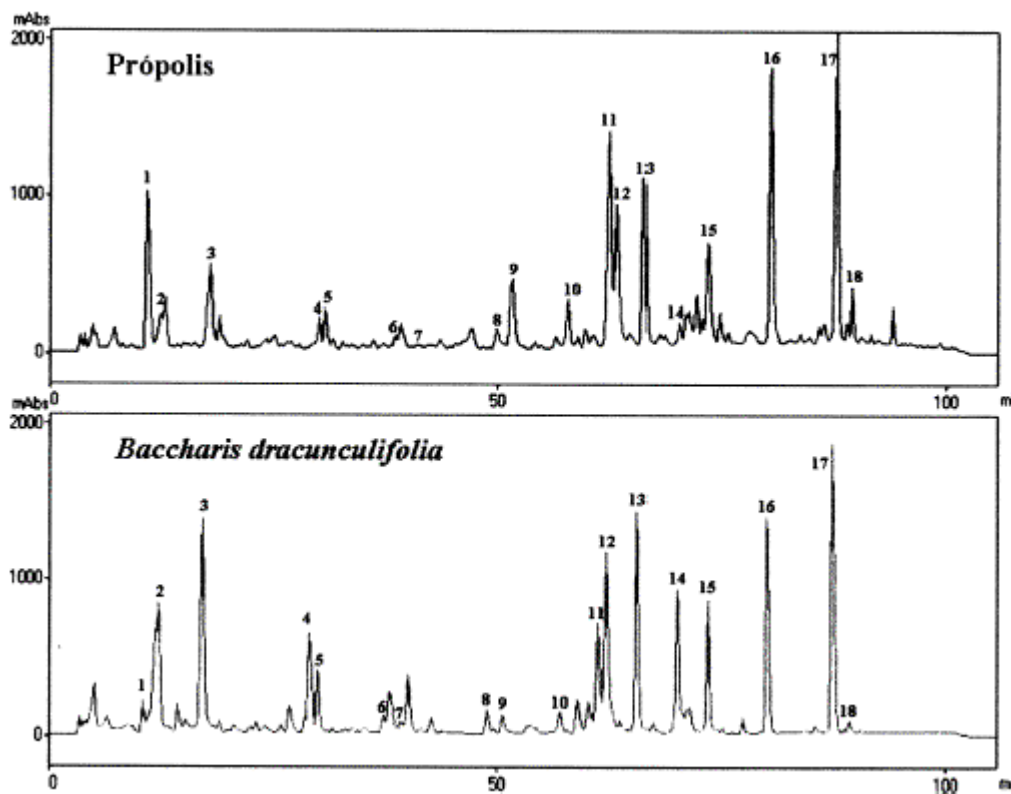


Figura 3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico da própolis (EEP) e do extrato metabólico vegetativo (EMV) (Alencar et al., 2005).

As substâncias químicas apresentadas na Figura 3.2 são: 1=ácido cumárico; 2=ácido ferúlico; 4=ácido cinâmico; 6=canferol; 11=canferide; 16=Artepillin C. Os números 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 17 e 18 não foram identificados.

Dentre os compostos majoritários encontrados no extrato metanólico das diferentes fases de desenvolvimento da folha da *B. dracunculifolia* e no extrato

etanólico da própolis, o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) foi o ácido fenólico que teve maior concentração, como mostra na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Compostos fenólicos da própolis e *B. dracunculifolia* em mg/g, determinado por CLAE-FR (Park et al., 2004).

Composto	Própolis	Broto da folha	Folha em desenvolvimento	Folha desenvolvida
Artepillin C	38,58	40,54	13,75	1,68
ácido <i>p</i> -cumárico	10,67	4,23	2,68	-
canferide	12,57	8,15	3,95	1,61

Fukuda et al. (2006) isolaram das folhas do alecrim-do-campo dois novos compostos, denominados por bacchariscetona (sesquiterpeno) e *p*-metoxitímol acetato (monoterpeno) e dezessete compostos já conhecidos, tais como os monoterpenos fenólicos (timol, carvacrol), os álcoois sesquiterpênicos (espatulenol, bisacumol, cadinol, sesquiterpeno tricíclico), dentre outros.

A composição do óleo da *B. dracunculifolia* depende da região geográfica e do processo de extração utilizado. Sua importância comercial está diretamente relacionada com a concentração de compostos oxigenados, destacando o nerolidol e o espatulenol (Ferronato, et al., 2007).

Ferracini et al. (1995) estudaram o óleo essencial das folhas e flores de sete espécies de *Baccharis*, obtido por hidrodestilação e identificaram na *B. dracunculifolia* 10 monoterpenos, destacando-se o β -pineno (3,76%) e limoneno (4,65%), e 21 sesquiterpenos, dos quais o espatulenol (2,58%), o δ -cadineno

(5,07%), o β -cariofileno (5,40%), o β -selineno (9,90%) e o (E)-nerolidol (20,80%) foram os componentes mais abundantes.

Loyaza et al. (1995) investigaram a composição do óleo da *B. dracunculifolia*, colhida na Bolívia e identificaram 53 componentes através da análise de cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (CG-MS), com rendimento de 0,16 a 0,32% (v/w), do qual os componentes majoritários são o germacreno, o δ -cadineno e o β -pineno, com teores de 4,96%, 12,97% e 17,23% respectivamente.

Em 1996 mais de 100 compostos foram identificados no óleo da *B. dracunculifolia* por Weyerstahl et al. Este óleo era composto por 19% de hidrocarbonetos monoterpênicos, 2% de monoterpenos oxigenados, 38% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 35% de sesquiterpenos oxigenados. Este autor cita que o rendimento do óleo obtido por destilação é entre 0,5 a 1%.

3.2.2 Aspectos Farmacológicos

As espécies de *Baccharis* têm sido estudadas do ponto de vista fitoquímico revelando uma grande variedade de constituintes químicos com atividade biológica interessante, destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se as espécies *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B.*

crispa, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (Verdi *et al.*, 2005).

O Artepillin C (Fig. 4.3), presente principalmente nos brotos das folhas da *B. dracunculifolia* e na própolis, é um importante ácido fenólico. Segundo Kimoto *et al.* (2001a) & Uto *et al.* (2002), este composto possui atividades antitumoral, pela promoção de apoptose e cura de leucemia, favorecendo o aumento da resposta imunológica, além de apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante. Outros pesquisadores realizaram trabalhos no sentido de averiguar as atividades biológicas do Artepillin C presente na própolis (Kimoto *et al.*, 2001b; Shimizu *et al.*, 2005).

Fukuda *et al.* (2006), estudando a atividade citotóxica no crescimento de células leucêmicas L1210 de 19 compostos isolados da folha da *B. dracunculifolia*, verificaram que sua forte atividade citotóxica foi atribuída principalmente aos monoterpenos fenólicos, tais como timol, carvacrol, *p*-metoxitimol e *p*-cimeno-2,3-diol.

Em relação à atividade antioxidante, estudos apresentaram extratos metanólicos da *Baccharis grisebachii* com ED₅₀¹ entre 23 a 54 µg/ mL (Tapia *et al.*, 2004) enquanto que no extrato metanólico da própolis brasileira essa atividade variou entre 9,9 a 13,1 µg/ mL (Banskota *et al.*, 2000).

¹ED₅₀ é a dose efetiva que elimina 50% dos radicais livres.

Ferronato et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido por hidrodestilação da *B. dracunculifolia* pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Müller-Hinton. Os autores verificaram que o óleo apresentava atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

3.3 Extração supercrítica

De todos os processos convencionais de separação de compostos, como a extração com solvente orgânico e a destilação a vapor, a extração supercrítica é uma das tecnologias mais vantajosas quando se visa fornecer produtos de alta pureza, sem resíduos de solventes e de excelentes propriedades sensoriais, conservando as qualidades terapêuticas e nutricionais do extrato (Sutter *et al.*1994).

De acordo com Brunner (1994), a extração com fluido supercrítico de matrizes sólidas consiste em duas etapas: extração e separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico escoar através de um leito fixo de partículas sólidas, o qual 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.

A principal desvantagem do processo de extração supercrítica (ESC) é o alto custo dos equipamentos. Assim, produtos de baixo valor agregado e de baixo rendimento não podem ser economicamente extraídos por esse processo (Maul, 1999).

Cassel *et al.* (2000) estudaram os óleos essenciais de ramos e folhas da *B. dracunculifolia* obtidos por extração supercrítica e por hidrodestilação, a fim de otimizar os componentes oxigenados obtidos na ESC, especificamente o (E)-nerolidol e o espatulenol em relação ao obtido pela extração convencional. Observaram que nas condições experimentais de temperatura: 323,15 K; pressão: 10 MPa; tempo de equilíbrio: 10 min.; tempo de extração: 20 min. e vazão de CO₂: 1,0 mL/min obtiveram melhor rendimento (0,38%) enquanto que na hidrodestilação este foi de 0,36%. Os valores dos compostos (E)-nerolidol (47,5%) e espatulenol (16,4%) obtidos na extração supercrítica foram superiores aos obtidos da hidrodestilação, com valores de 13,5% e 9,8% respectivamente.

Na ESC com dióxido de carbono (CO₂), Lee *et al.* (2007) isolaram e purificaram o Artepillin C da própolis brasileira, investigando a influência da concentração do acetato de etila como co-solvente (2, 4 e 6% m/m) e da temperatura do processo (40, 50 e 60 °C) a 208 bar. A maior concentração de

extração de Artepillin C (12,7mg/g) foi obtida a 60 °C e com 6% m/m de acetato de etila.

3.3.1 Fluido supercrítico

Para cada substância existe uma temperatura crítica (T_c), uma pressão crítica (P_c) e um volume crítico (V_c). O estado supercrítico é caracterizado quando a temperatura e pressão forem superiores aos seus valores críticos. As variações das propriedades termodinâmicas na região supercrítica podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (Sandler, 1989).

Os fluidos supercríticos (SF) exibem propriedades físico-químicas intermédias de gases e líquidos, o que aumenta sua função como solvente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Propriedades físico-químicas em diferentes estados (Rizvi *et al.*, 1986).

Estado do Fluido	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás	$(0,6 - 2,0) \times 10^{-3}$	0,1 – 0,4	$(1,0 - 3,0) \times 10^{-4}$
Líquido	0,6 – 1,6	$(0,2 - 2,0) \times 10^{-5}$	$(0,2 - 3,0) \times 10^{-2}$
Fluido Supercrítico	0,2 – 0,9	$(0,2 - 0,7) \times 10^{-3}$	$(1,0 - 9,0) \times 10^{-4}$

Perto do ponto crítico, os SF possuem densidades semelhantes aos líquidos e propriedades de transporte, como a difusividade e a viscosidade, próximas aos gases. Possuem densidades que lhes conferem elevado poder de

solvatação e os processos de transferência de massa são facilitados, pois a sua viscosidade é baixa e a difusibilidade é elevada, ou seja, possui um apreciável poder de penetração na matriz do soluto. A capacidade de dissolução dos SF é sensível a suaves variações nas condições operacionais sendo possível manipular a sua capacidade de solvente durante um processo de extração, variando a pressão e temperatura, dentro da região supercrítica (Fillipi, 1982; Taylor, 1996; Carvalho Jr., 2004).

3.3.2. *Dióxido de carbono como solvente*

O melhor solvente nas extrações com fluido pressurizado é aquele que consegue solubilizar o soluto presente em um substrato sem promover alterações químicas na matriz sólida ou no soluto.

Dentre os fluidos usados na ESC, o CO₂ é mais utilizado por ser inerte, não tóxico, não inflamável, não corrosivo e de moderado custo. Possui temperatura e pressão crítica de 31,2 °C e 73,4 bar respectivamente, condições de fácil operação em processo industrial e que permite um processamento a baixas temperaturas, evitando assim a degradação dos compostos termolábeis. Em condições normais de pressão e temperatura é facilmente separado dos compostos extraídos pela despressurização do sistema (Brunner, 2005; Staub, 1997).

3.3.3. Co-solventes

O CO₂ por ser um fluido de baixa polaridade dificulta a extração de compostos mais polares. Entretanto, as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos podem ser modificadas facilmente pela adição de pequenas quantidades de substâncias polares (co-solventes) tais como água e etanol e também podem ser alteradas pelas condições operacionais como temperatura e pressão (Pellerin, 1991, Staub, 1997).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Matéria-prima*

O alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) foi cultivado em maio de 2004 no Campo Experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/ UNICAMP) e colhido em dezembro de 2006. A amostra é proveniente da mistura de plantas oriundas de dois acessos, um do próprio CPQBA (acesso A10) e outro de Chave da Taquara (acesso A1). A matéria-prima utilizada foi a soma dos brotos, folhas em desenvolvimento e folhas desenvolvidas. 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.

4.2. *Caracterização da matéria-prima*

4.2.1 *Moagem e Peneiragem*

A matéria-prima seca foi triturada em moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (Marconi, modelo MA 340, Piracicaba, Brasil) e introduzida num jogo de peneiras da série padrão Tyler com mesh 8, 12, 16, 24, 32 e 48. A distribuição do tamanho de partículas foi realizada através de um agitador

magnético de peneiras por 15 minutos (Bertel, série 01.05, Caieiras, São Paulo, Brasil). As massas retidas em cada peneira foram pesadas em balança semi-analítica (Marte, modelo AS 5500, São Paulo, Brasil) e utilizadas no empacotamento da célula extratora na porcentagem de 30, 27, 22, e 21% dos meshes 16, 24, 32 e 48 respectivamente. Após pesagem, a amostra foi acondicionada em sacos de polietileno, envolta em papel alumínio e armazenada em freezer doméstico (Cônsul, modelo 220, São Paulo, Brasil) a -10°C.

O diâmetro médio geométrico das partículas (d_{mg}) foi determinado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standards (1997) através da equação 4.1.

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad \text{Eq. (4.1)}$$

Onde: $\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$;

d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);

w_i : massa do material retido na i-ésima peneira.

4.2.2 Determinação da densidade aparente

A densidade aparente foi calculada usando-se o volume da célula de extração e a massa do alecrim-do-campo seco e moído, compactado na mesma.

4.3. Extração alcoólica

O extrato alcoólico foi obtido usando a metodologia modificada de Sawaya et al. (2004) para própolis. A cada 3 gramas da matéria-prima seca foram adicionados 15 mL de etanol (P.A. Merck) e esta mistura foi colocada em agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente. Após, a amostra foi filtrada para a separação da porção insolúvel. O filtrado foi armazenado em freezer por 24 horas e filtrado novamente para a redução do teor de gordura. O solvente foi evaporado em estufa a vácuo (Marconi, modelo MA 030/12, Piracicaba, Brasil) a 50°C até a obtenção do extrato seco.

O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção do extrato metanólico seco do alecrim-do-campo utilizando o metanol como solvente (P.A. Merck)

4.4. Extração supercrítica

Os experimentos foram realizados em uma unidade experimental, instalada no laboratório EXTRAE (DEA/ FEA/ UNICAMP) conforme ilustrado na Figura 4.1 e esquematizado na Figura 4.2.

O equipamento de extração em alta pressão consistiu em: cilindro de CO₂; banho de refrigeração (Cole Parmer Instrument Company, modelo 12101-30,

Vernon Hills, IL, USA); bomba de alta pressão (Eldex Laboratories Inc., modelo AA100S, Napa, CA, USA); tanque pulmão (Suprilab, cilindro de aço inox 316, 500 mL, Campinas, Brasil); manômetros tipo Bourdon (Record); extrator (Suprilab, aço inox 316, Campinas, Brazil); bomba peristáltica (Cole Parmer Instrument Company, modelo L/S 77910, Pump System); coletor de extrato; armadilhas de colunas recheadas com polímero Porapak-Q (80-100 mesh, Waters Corporation, USA); medidor de vazão; totalizador de volume; banho termostaticado (Suprilab, modelo AISI 304 Campinas, Brasil) e válvulas de regulação tipo agulha e micrométrica (Autoclave Engineers).



Figura 4.1 Unidade de extração supercrítica do EXTRA-E.

4.4.1. Procedimento experimental

O procedimento experimental utilizado nas extrações e descrito a seguir pode ser visualizado na Figura 4.2.

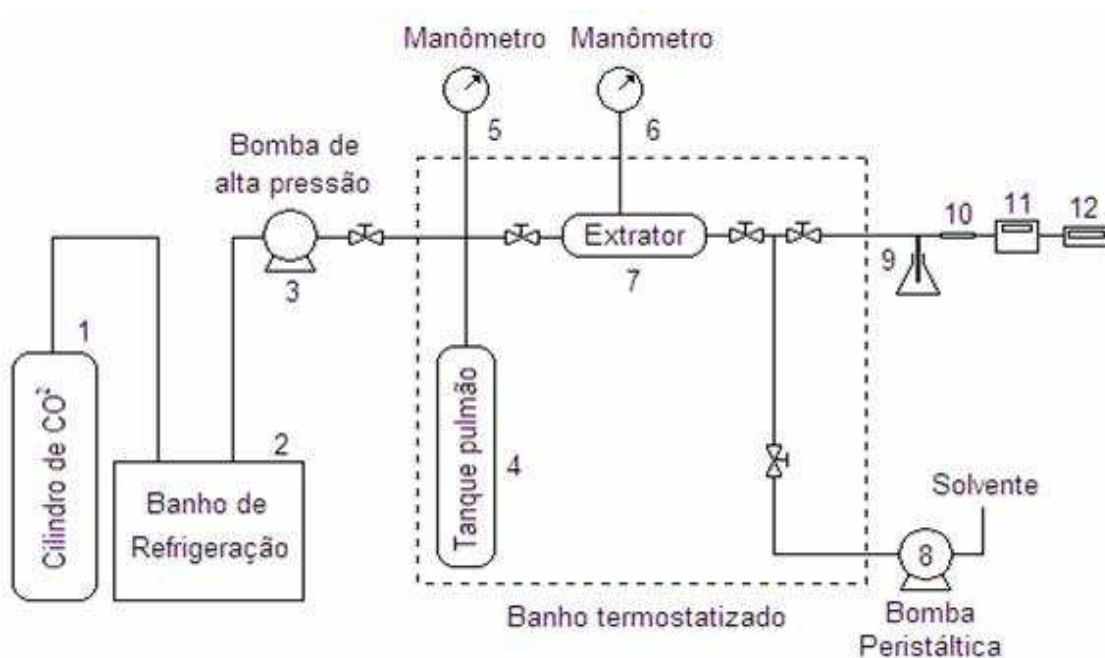


Figura 4.2 Diagrama da unidade experimental.

O banho de refrigeração foi ligado antes da extração para atingir a temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, portanto não ocasionar cavitação da bomba. Aproximadamente $7 \times 10^{-3}\text{ kg}$ de folhas de alecrim-do-campo secas foram introduzidos na célula extratora de $5,0 \times 10^{-5}\text{ m}^3$ (7) e o restante do seu volume foi preenchido com esferas de vidro de mesh 6 (leito inerte).

O sistema ficou imerso em um banho termostatizado à temperatura de

extração e a pressão foi ajustada pela bomba de alta pressão (3), mantendo a válvula fechada na saída do extrator até que a pressão requerida fosse atingida. A pressurização ocorreu no tanque pulmão (4) e depois lentamente no extrator (7). Com as condições estabelecidas, o sistema foi deixado em repouso por 20 minutos para estabilizar as condições operacionais e promover o contato entre soluto e o solvente supercrítico.

Em seguida as válvulas situadas entre o extrator (7) e o coletor (9) foram abertas dando início à extração. O solvente supercrítico foi escoado continuamente na entrada do extrator, passando inicialmente pelo leito inerte e posteriormente pela matriz vegetal. O CO₂ no estado gasoso que deixou o coletor (9) foi conduzido a uma armadilha (10) com a finalidade de capturar os componentes mais leves que poderiam ser arrastados por ele. Esta armadilha foi preparada através do empacotamento do adsorvente Porapak-Q entre lã de vidro, em um tubo de vidro de 6 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento. Por fim, o dióxido de carbono foi conduzido a um medidor de vazão (11) e totalizador (12) para quantificar sua massa na extração.

A tubulação da linha foi lavada com etanol e com o auxílio de uma bomba peristáltica (8) para recuperação do extrato depositado na mesma ao longo da extração. Este material foi adicionado ao frasco da extração e em seguida seco em estufa a vácuo para evaporação do solvente. O rendimento global (X_0) foi calculado a partir da massa extraída (extração + limpeza) e a massa inicial

adicionada no extrator (base seca). As amostras foram fechadas, lacradas e mantidas sob refrigeração para posterior análise.

O extrato obtido no coletor (9) foi denominado extrato pesado e o extrato mais volátil capturado na armadilha (10) foi denominado extrato leve (óleo essencial).

4.4.2. Planejamento dos experimentos

As condições operacionais de pressão selecionadas para a realização dos experimentos foram 200, 300 e 400 bar, nas isotermas de 40, 50 e 60° C, e com uma vazão média do solvente de $4,0 \times 10^{-5}$ kg/s para um tempo médio total de processo de aproximadamente 4 horas. O dióxido de carbono utilizado possuía pureza de 99,5% (White Martins). Os experimentos foram realizados em triplicata com execução aleatorizada.

Foram feitas duas extrações adicionando-se co-solventes à matriz de folhas, uma com 5% em massa de etanol e outra com 5% em massa de acetato de etila na temperatura de 50°C e pressão de 300 bar.

As armadilhas com Porapak-Q na ESC a 50°C e 300 bar foram empregadas em 3 experimentos: nas duas extrações com os co-solventes e em uma sem co-solvente.

4.5. Análise dos extratos

4.5.1. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo negativo [ESI(-)-MS]

A identificação de compostos químicos em alguns extratos foi realizada por espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray no modo negativo, usando a metodologia descrita por Sawaya et al. (2004). As amostras foram analisadas no Laboratório Thomson de espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP pela Dra. Alexandra Sawaya, sob coordenação do Prof. Dr. Marcos N. Erbelin.

Os extratos foram dissolvidos e diluídos para uma concentração de aproximadamente $50\mu\text{L mL}^{-1}$ em uma solução contendo 70% (v/v) de metanol grau cromatográfico e 30% (v/v) de água deionizada. Em seguida foi acrescentado 0,5% (v/v) de hidróxido de amônio para ser analisado no modo negativo. As soluções foram inseridas diretamente numa vazão de $10\mu\text{L/min}$ e analisadas no espectrômetro de massas Q-TRAP (Applied Biosystems, Concord, Canada). As condições usadas foram: capilar de $\pm 4000\text{ V}$, cone de $\pm 40\text{ V}$, temperatura de 200°C e espectros na faixa de 140 a 700 m/z em modo negativo. A identificação dos compostos foi por comparação de seus espectros de massa com padrões adquiridos comercialmente e/ou isolados em trabalhos anteriores (Sawaya et al., 2004).

4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

Alguns compostos fenólicos presentes no extrato do alecrim-do-campo obtido por ESC e por extrações alcoólicas foram analisados através da cromatografia líquida de alta eficiência (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany), com bomba (Merck-Hitachi, modelo D-7100), rede de fotodiodos e injetor automático. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna em fase reversa Lichrochart (RP-18, 125 x 4 mm, 5mm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando-se como fase móvel água-ácido fórmico (95:5 v/v, solvente A, Merck) e metanol (solvente B-grau cromatográfico, Merck). A eluição foi desenvolvida em uma vazão de 1mL/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção foi efetuada em comprimento de onda de 280nm.

A identificação dos componentes foi efetuada pela comparação do tempo de retenção e espectro UV visível (200 – 400 nm) com padrões isolados e adquiridos comercialmente. A quantificação dos componentes foi feita usando padrões externos. O programa utilizado para a análise de dados foi o Merck-Hitachi, modelo D-7100 Chromatography Data Station - DAD Manager). As análises foram feitas no laboratório de análises Natural Labor pela Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

Os compostos monitorados nos extratos de folhas da *B. dracunculifolia* são apresentadas na Figura 4.3.

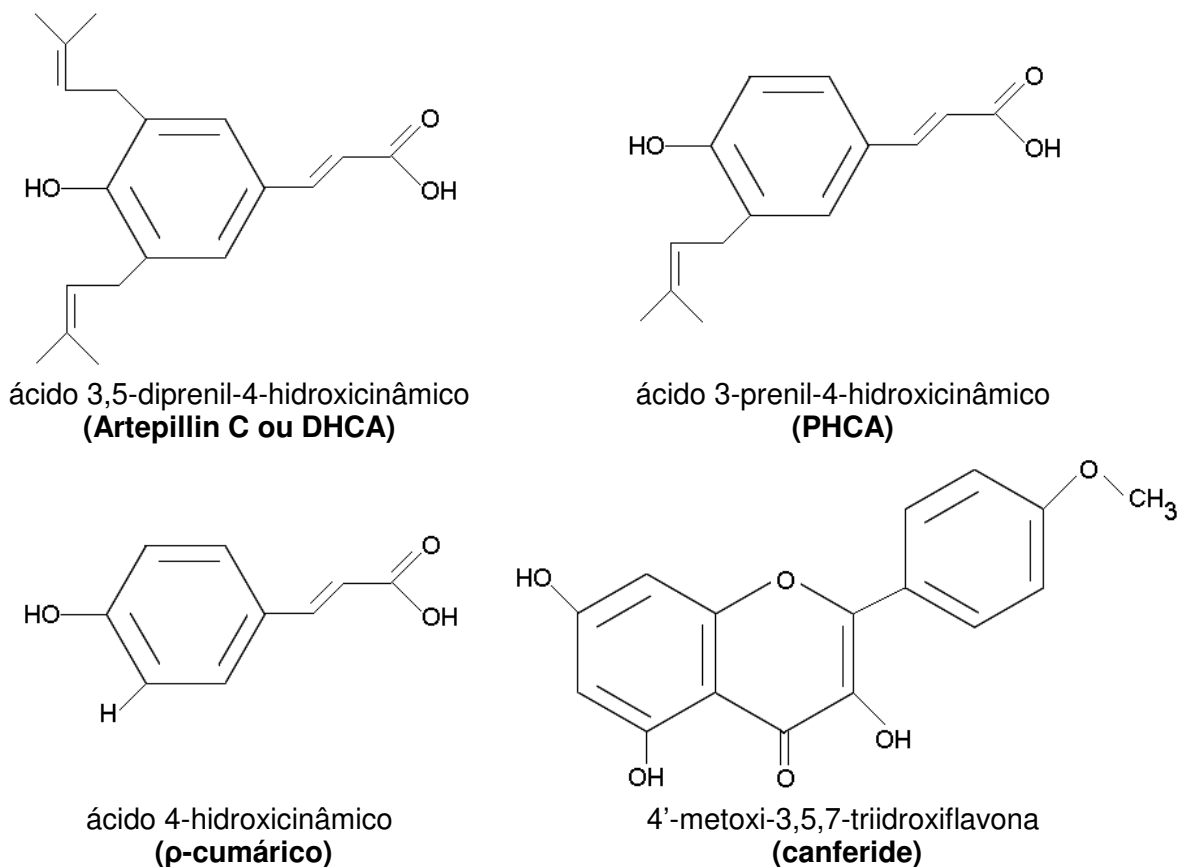


Figura 4.3 Estruturas químicas de compostos fenólicos presentes na *B. dracunculifolia*.

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

Os compostos voláteis capturados na coluna com Porapak-Q na ESC foram eluídos com 1 mL de acetato de etila e analisados para identificação no CPQBA/ UNICAMP pela Dra. Carmen Lucia Queiroga. As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (GC 6890N, Agilent 5975), com coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) e gás de arraste hélio 1mL/min. A programação de aquecimento da coluna utilizada foi: 55° - 120°C a 20°C/min, 120° - 150°C a 1,5°C/min, 150° - 250°C a 20°C/min,

250°C (10 min) (Queiroga et al., 1990). As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 250 °C, respectivamente. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com dados da literatura (Adams, 1995); com o banco de dados do sistema CG/EM - biblioteca Wiley e NIST; e com o índice de retenção relativo a uma série de n-alcenos (C₉-C₂₀).

4.5.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) do alecrim-do-campo foi determinada pelo método desenvolvido pela Natural Labor adaptado da literatura (Banskota et al., 2000; Bankova & Marcucci, 2000 e Hatano et al., 1989) baseado no seqüestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

A amostra do extrato do alecrim-do-campo a 1% (v/v) foi diluída a 0,01% (v/v) em etanol P.A. e depois preparados diferentes diluições deste extrato. Oito tubos foram enumerados e adicionados a eles, primeiramente um volume de etanol (diluição desejada) e em seguida um volume de solução do alecrim-do-campo, conforme mostrado na Tabela 4.1. O tubo nº 0 foi o controle, ou seja, 100% de DPPH sem amostra. O volume da solução etanólica de DPPH 60 µM foi adicionado no 1^o tubo e o cronômetro ligado, desligando-o depois de um minuto. O DPPH foi adicionado nos outros tubos a cada 1 minuto. A leitura foi feita no espectrofotômetro Cary 50 (Varian) após 30 minutos da adição do DPPH no 1^o tubo e lidas no comprimento de onda de 517 nm.

Tabela 4.1 Condições experimentais de análise da atividade antioxidante, empregando-se o DPPH.

Tubo	Conc. Alecrim ($\mu\text{g/mL}$)	Vol. Etanol (μL)	Vol. solução Alecrim (μL)	Vol. DPPH (μL)	Absorb (%)
0	0	1000	0	1000	x
1	2	960	40	1000	x
2	4	920	80	1000	x
3	6	880	120	1000	x
4	10	800	200	1000	x
5	12	760	240	1000	x
6	14	720	280	1000	x
7	18	640	360	1000	x
8	20	600	400	1000	x

4.5.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi empregada contra os microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922. As culturas de microrganismos foram mantidas a -20°C em caldo de Tioglicolato (Merck) + 15% de glicerol e reativadas em meio apropriado para cada cepa.

Essa atividade foi avaliada pelo método de difusão em disco para confirmar sua ação contra os microrganismos citados. Foi estipulada qualitativamente pelo método de difusão em disco preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica (D.O) a 625nm em espectrofotômetro em 5,0 mL de solução salina a 0,85% (NaCl Synth). Em seguida um *swab* estéril foi imerso no inóculo e estriado na placa de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton ágar (Merck). Após 20 minutos, foram colocados discos impregnados com 30 μ L de cada amostra a 2% . As placas foram incubadas a 37°C, exceto para a *C.albicans* (24°C) por 24 horas e em seguida o halo de inibição (em mm) foi medido com um paquímetro. Para a *C.albicans* o crescimento microbiano foi monitorado à temperatura ambiente em local escuro e seco, empregando-se como meio de cultivo o ágar Sabouraud (Merck). Os experimentos foram realizados em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria-prima

As amostras de folhas de alecrim-do-campo secas e trituradas que foram usadas nas extrações apresentaram diâmetro médio de partículas (d_{mg}) de $7,2 \times 10^{-4}$ m e densidade aparente de $348,5 \pm 2,6$ kg/m³.

5.2. Rendimentos de extração

5.2.1. Efeito do diâmetro de partícula no rendimento de extração

A Figura 5.1 mostra curvas de extração obtidas com ESC a 300 bar e 50°C a partir de amostras de folhas trituradas com diferentes granulometrias.

O rendimento máximo de extração (4,27%) foi obtido do material triturado com o menor diâmetro médio de partícula de $5,95 \times 10^{-4}$ m e o mínimo (3,18 %) usando o maior diâmetro médio de $1,18 \times 10^{-3}$ m. Verificou-se que o rendimento global aumentou com o decréscimo do diâmetro médio de partícula devido à maior quantidade de material liberado pela ruptura de maior fração superficial das partículas e pela redução da resistência à transferência de massa interna por difusão.

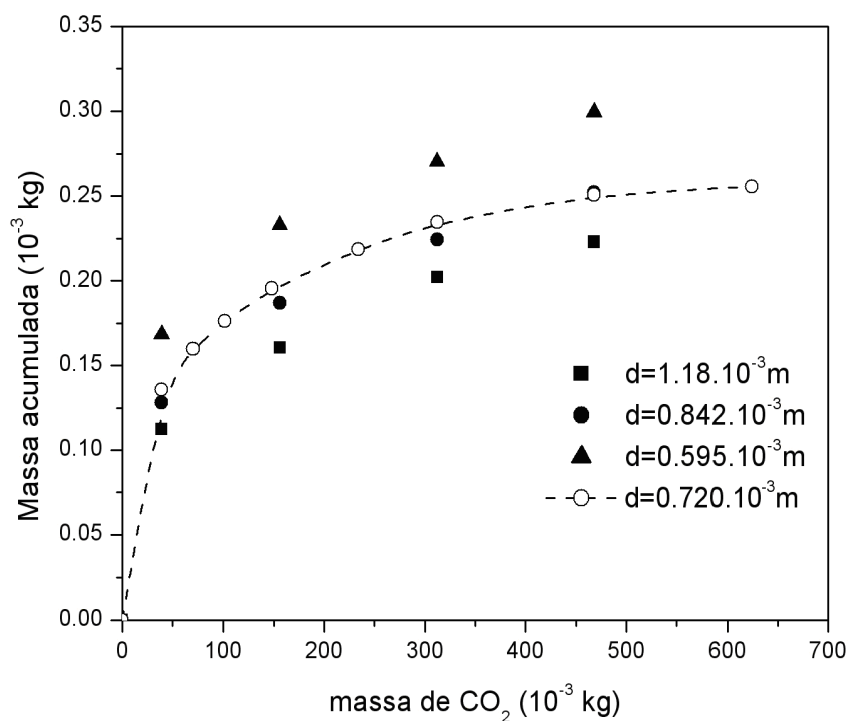


Figura 5.1 Curva de extração de folhas a 50°C e 300 bar e vazão média do solvente de $4,0 \times 10^{-5} \text{ kg/s}$ para diferentes diâmetros de partícula.

5.2.2. Efeito da temperatura e pressão no rendimento de extração

Na Figura 5.2 mostra-se valores de rendimentos globais para ESC usando folhas de alecrim-do-campo com diâmetro médio de partícula de $7,2 \times 10^{-4} \text{ m}$ para três níveis de pressão e três níveis de temperatura. Observou-se que o aumento da pressão a temperatura constante promoveu um aumento no rendimento global de extração e o aumento de temperatura a pressão constante também aumentou o rendimento de extração. Não se observou ponto de cruzamento da pressão (*crossover pressure*) onde se observa mudança do comportamento do rendimento com a temperatura. O melhor rendimento global de

extração ($4,71 \pm 0,3\%$) foi obtido na maior condição de temperatura e de pressão, 60°C e 400 bar e o menor rendimento ($2,40 \pm 0,1\%$) foi obtido na menor condição de temperatura e pressão, a 40°C e 200 bar.

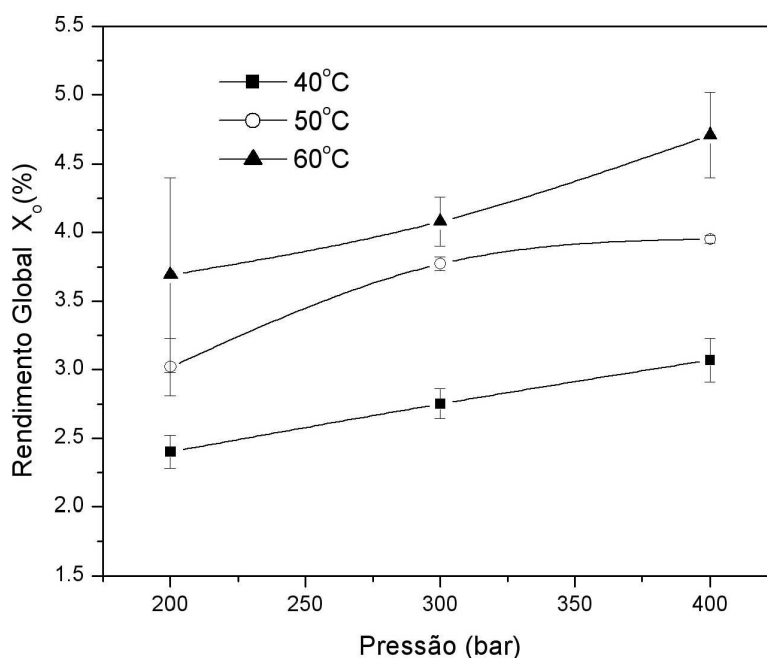


Figura 5.2 Rendimento global do extrato de alecrim-do-campo obtido a 200, 300 and 400 bar e vazão média de $4,0 \times 10^{-5}$ kg/s.

O rendimento global das extrações supercríticas a 50°C e 300 bar utilizando co-solventes, 5% (m/m) de acetato de etila e 5% (m/m) de álcool etílico na matriz de folhas, foi de 3,69% e 3,09%, respectivamente. Estes valores não foram superiores, mas próximos ao valor obtido por ESC (3,77%) sem co-solvente nesta mesma condição operacional.

Nos extratos alcoólicos, os rendimentos globais de extração (X_0) foram bem superiores aos obtidos por ESC, resultando em rendimentos de 10,9% para o extrato metanólico e de 6,1% para o extrato etanólico.

5.2.3. Rendimento da fração volátil capturada em Porapak-Q.

Em cinco extrações realizadas com SC-CO₂ a 50°C e 300 bar, coletou-se também pela captura em armadilha de Porapak- Q, a fração mais volátil que é normalmente arrastada pelo CO₂ quando este passa pelo coletor de extrato. Em três extrações foram usadas folhas trituradas com diâmetros diferentes e nas outras duas extrações usou-se folhas com diâmetro médio de partícula de $7,2 \times 10^{-4}$ m adicionada também em uma delas 5% em massa de acetato de etila e na outra 5% em massa de etanol. O acetato de etila e o etanol foram adicionados ao leite de folhas e não ao CO₂. A Tabela 5.1 reúne os valores obtidos da fração volátil capturada em Porapak-Q.

Nesta tabela também foram mostrados, os rendimentos da fração leve dos extratos obtidos por extração supercrítica e por hidrodestilação, realizados por Cassel et al. (2000). O rendimento do extrato capturado no adsorvente foi aproximadamente metade do rendimento obtido por hidrodestilação e por ESC com dióxido de carbono, mostrado pela literatura. É bem possível que a fração pesada obtida neste trabalho contenha parte do óleo essencial.

Tabela 5.1 Rendimento (% em massa) da fração volátil capturada em armadilhas com polímero Porapak Q.

Matriz de folhas	A (%)	B (%)	Referências
ESC (50°C e 300 bar) $d = 1,18 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0,17	3,18	*
ESC (50°C e 300 bar) $d = 0,84 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0,16	3,60	*
ESC (50°C e 300 bar) $d = 0,59 \cdot 10^{-3} \text{ m}$	0,18	4,27	*
ESC (50°C e 300 bar) $d_{\text{mg}} = 0,72 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ (a)	0,18	3,69	*
ESC (50°C e 300 bar) $d_{\text{mg}} = 0,72 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ (b)	0,18	3,09	*
Hidrodestilação	0,36	--	Cassel et al. (2000)
ESC (50°C e 100 bar)	0,38	--	Cassel et al. (2000)

* Desenvolvidos no presente trabalho

(a) SC-CO₂+ 5% acetato de etila

(b) SC-CO₂+ 5% de etanol

A= Fração + volátil do óleo essencial

B= Óleo essencial

5.3. Composição Química dos Extratos

5.3.1 Análise Qualitativa do óleo essencial por ESI(-)-MS

A análise qualitativa em 5 extratos de alecrim-do-campo obtidos por ESC e extração alcoólica foi realizada por ESI(-)-MS com identificação de 23 compostos químicos, como mostra a Tabela 5.2. Esta análise teve como objetivo uma caracterização da amostra, ou seja, a apresentação da composição geral dos compostos presentes nos extratos. Os espectros de massa desses extratos encontram-se nas Figuras 5.3 e 5.4 e Anexo B.

Tabela 5.2 Compostos identificados por ESI(-)-MS nos extratos da *B. dracunculifolia*.

[M-H] ⁻	Nome	Extratos
163	ácido p-cumárico	A, E
177	3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído	B
179	ácido caféico	A
229	ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	C, D, E
231	ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	A
233	viscidona	B
247	ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	A
253	crisina	A, B, D, E
255	pinocembrina	B, C, D, E
285	canferol	A, B, C, D, E
297	ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	C, D, E
299	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C)	A, B, C, D, E
301	diidrocanferida	A, B,
315	ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	A, B, C, D
317	ácido agatálico	D
319	ácido cupréssico	A, E
329	betuletol	A, C, D, E
333	ácido agático	D
347	15 metil éster do ácido agático	C
361	ácido 15-acetoxi-cupréssico	A, D, E
363	ácido 3-prenil-4-diidroxicinâmico	A, B, C, D, E
447	ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxy)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico	C, D, E
515	ácido dicafeoilquínico	A, B

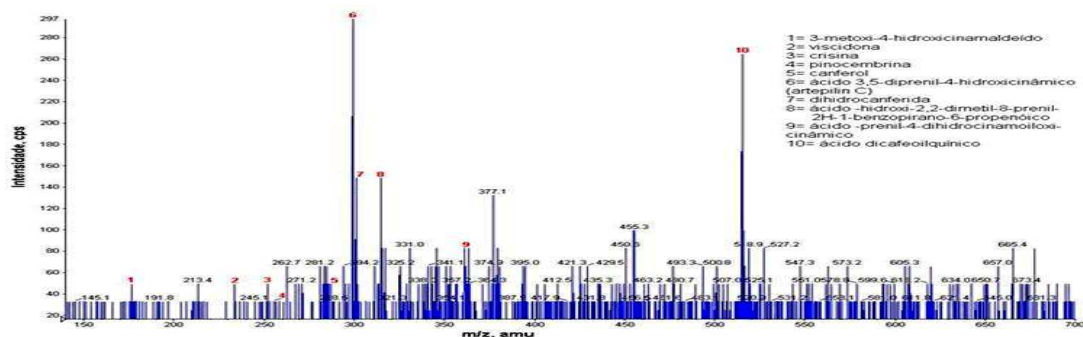
A: extrato etanólico

B: extrato metanólico

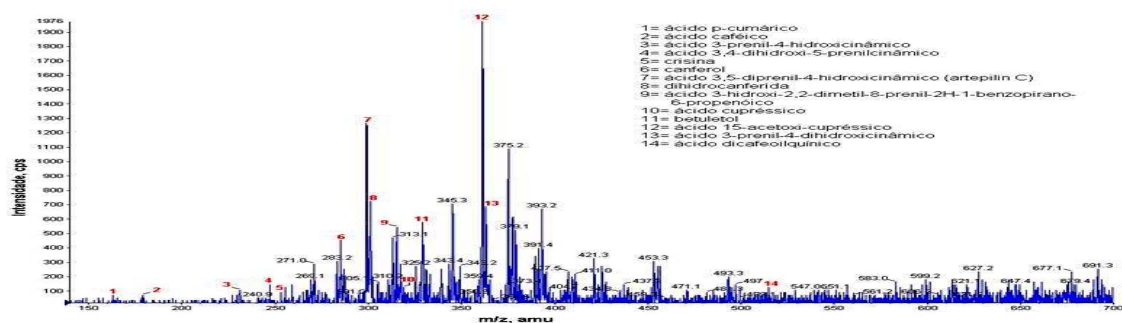
C: extrato obtido por ESC (50°C, 300 bar)

D: extrato obtido por ESC (50°C /300 bar + 5% (m/m) de co-solvente etanol)

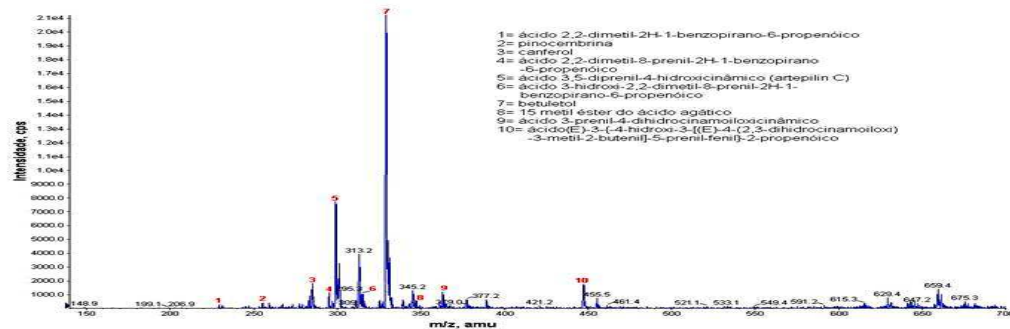
E: extrato obtido por ESC (50°C /300 bar + 5% (m/m) de co-solvente acetato de etila)



(a) extrato metanólico

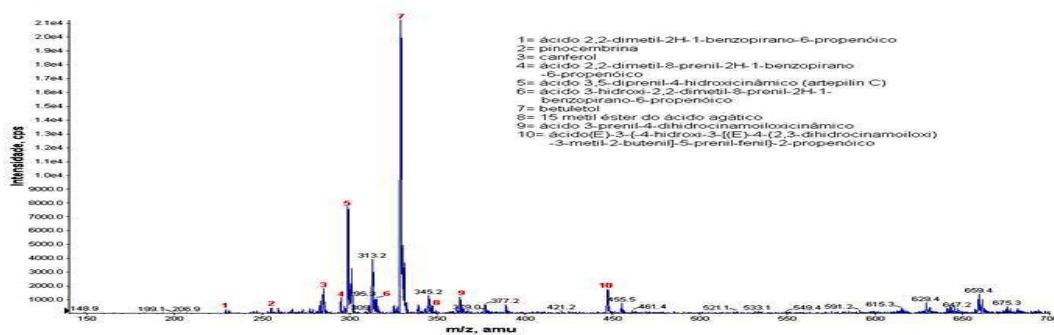


(b) extrato etanólico

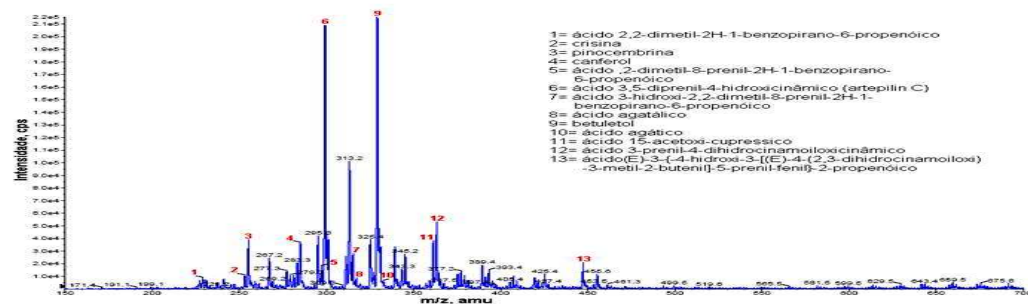


(c) extrato obtido por ESC (50°C e 300 bar)

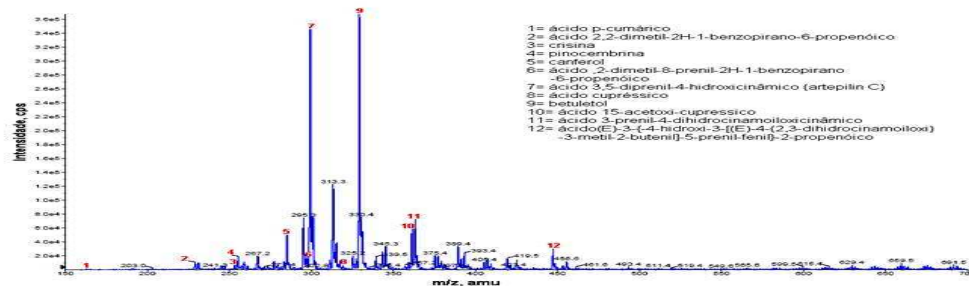
Figura 5.3 Espectro de massa por ESI(-)-MS de extratos de folhas de *B. dracunculifolia*.



(a) extrato obtido por ESC (50°C e 300 bar)



(b) extrato obtido por ESC (50°C e 300 bar com 5% de etanol)



(c) extrato obtido por ESC (50°C e 300 bar com 5% de acetato de etila)

Figura 5.4 Espectro de massa por ESI(-)-MS de extratos de folhas de *B. dracunculifolia*.

Os cromatogramas obtidos por spray de elétrons ESI(–)-MS a partir de extratos obtidos por etanol, metanol e por ESC (fração pesada) representados na Figura 5.3 mostram qualitativamente uma diferença de composição entre os extratos. Os extratos metanólicos e etanólicos foram menos seletivos, pois extraíram uma maior quantidade de compostos diferentes quando comparados ao extrato supercrítico. A Figura 5.4 mostra o efeito da adição de 5% de etanol ou de acetato de etila à matriz de folhas, observando um aumento no número de compostos extraídos.

5.3.2. Análise Quantitativa da fração + volátil do óleo essencial por CLAE-FR

A concentração dos quatro compostos fenólicos presentes nos extratos foram obtidas por análise de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-FR. Os compostos monitorados foram: Artepillin C, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido *p*-cumárico e canferide (Tabela 5.3). Os cromatogramas dos extratos encontram-se no Anexo C.

A concentração foi dada em mg de soluto por grama de extrato e o rendimento de extração foi calculado considerando o rendimento global (X_o) e a concentração no extrato, obtendo-se o valor do rendimento de extração em mg de soluto extraído por grama de folhas de alecrim-do-campo.

Tabela 5.3 Concentração e rendimento de extração dos compostos fenólicos presentes nos extratos da *B. dracunculifolia*.

Método de extração	X _o (%)	Artepillin C		PHCA		ácido p-cumárico		canferide		TOTAL	
		C (mg/g)	R (mg/g)	C (mg/g)	R (mg/g)	C (mg/g)	R (mg/g)	C (mg/g)	R (mg/g)	C (mg/g)	R (mg/g)
ESC, 40 °C/ 200 bar	2,40	18,15	0,435	2,11	0,051	1,55	0,037	44,87	1,077	66,69	1,601
ESC, 40 °C/ 300 bar	2,75	17,10	0,470	2,45	0,067	1,8 6	0,051	43,07	1,184	64,48	1,773
ESC, 40 °C/ 400 bar	3,07	17,62	0,541	3,50	0,107	1,6 0	0,049	48,53	1,490	71,77	2,203
ESC, 50 °C/ 200 bar	3,02	17,62	0,532	1,74	0,053	1,2 8	0,039	46,93	1,417	67,57	2,041
ESC, 50 °C/ 300 bar	3,77	18,60	0,701	0,48	0,018	2,15	0,081	15,59	0,588	36,82	1,388
ESC, 50 °C/ 400 bar	3,95	18,57	0,734	3,47	0,137	1,9 1	0,075	53,42	2,110	77,37	3,056
ESC, 60 °C/ 200 bar	3,69	15,57	0,575	1,32	0,049	1,2 7	0,047	39,51	1,458	57,67	2,128
ESC, 60 °C/ 300 bar	4,08	20,26	0,827	3,65	0,149	2,6 2	0,107	67,84	2,768	94,36	3,850
ESC, 60 °C/ 400 bar	4,71	20,13	0,948	4,04	0,190	2,84	0,134	59,99	2,825	86,99	4,097
ESC, 50 °C/ 300 bar *	3,68	19,46	0,601	2,69	0,083	1,54	0,048	56,25	1,738	79,94	2,470
ESC, 50 °C/ 300 bar **	3,09	20,15	0,743	3,14	0,116	1,81	0,067	54,66	2,017	79,76	2,943
Extração etanólica	6,11	7,84	0,479	1,90	0,116	5,54	0,338	18,08	1,105	33,36	2,038
Extração metanólica	10,94	5,22	0,571	0,99	0,108	2,90	0,317	9,94	1,087	19,06	2,085

C = concentração (mg / g de extrato seco); **R** = rendimento (mg / g de folhas) **X_o** = rendimento global de extração

* Valor referente à ESC e 5 % (m/m) de etanol ** Valor referente à ESC e 5 % (m/m) de acetato de etila

Em relação ao Artepillin C, os extratos obtidos por ESC apresentaram concentração entre 15,57 a 20,26 mg/g. Esses valores foram bem superiores aos valores de 7,84 e de 5,22 mg/g obtidos nos extratos etanólicos e metanólicos, respectivamente. Quanto ao rendimento de extração, os extratos obtidos por ESC foram similares aos extratos alcoólicos exceto nas condições de 50°C/ 300-400bar e 60°C/ 300-400bar cujos valores foram superiores para a extração com SC-CO₂. Na melhor condição (60°C e 400 bar) obteve-se rendimento de extração de 0,948 mg/g deste composto enquanto que no extrato etanólico extraiu-se metade desta quantidade (0,479 mg/g) e no metanólico (0,571 mg/g), o que representa 60%.

Na Figura 5.5 pode ser vista a influência da temperatura e pressão na ESC do Artepillin C. Nas pressões mais elevadas, a concentração deste composto nos extratos aumenta com o aumento de temperatura e nas pressões mais baixas (200 bar) observa-se um comportamento inverso, onde a concentração diminui com o aumento de temperatura a pressão constante.

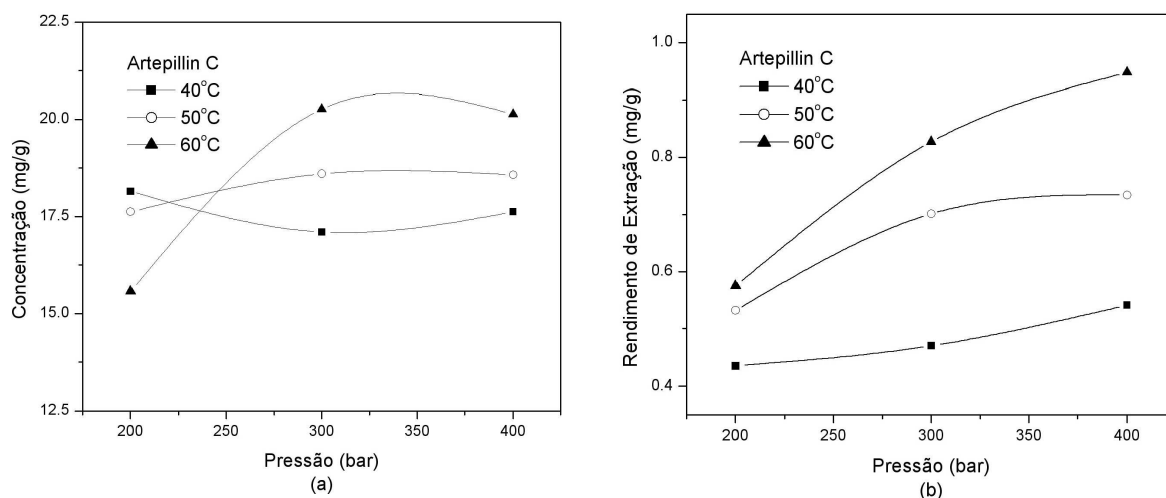


Figura 5.5 Concentração do Artepillin C nos extratos supercríticos (a) e no rendimento de extração em mg/g de folhas (b).

Este tipo de comportamento é observado em dados de solubilidade de solutos em dióxido de carbono supercrítico e é explicado pelo efeito da temperatura e pressão na variação da densidade do solvente e pelo efeito da temperatura na pressão de vapor dos solutos. O ponto de cruzamento das isotermas ocorreu entre 200 e 250 bar. Nesta região o efeito da temperatura no aumento da pressão de vapor compensa o efeito da temperatura na diminuição da densidade do solvente. Em vista da existência deste ponto, a menor e maior concentração ocorreram na mesma isoterma de 60°C. Quanto ao rendimento de extração mostrado na Fig. 5.5. (b), não se observa inversão de comportamento devido à contribuição do rendimento global de extração.

Comportamento semelhante foi observado na concentração do extrato supercrítico e no rendimento de extração para o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e canferide. Na melhor condição supercrítica, a concentração de 4,04 mg/g do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico foi bem superior às obtidas nos extratos alcoólicos, e o rendimento de extração (0,19 mg/g) foi superior em 64% e 76% aos rendimentos com etanol e metanol, respectivamente. Na condição de extração do canferide (60°C e 400 bar), a sua concentração foi bem superior às obtidas nos extratos alcoólicos e o rendimento de extração de 2,83 mg/g foi superior em 156% e 160% aos rendimentos alcoólicos.

A influência da temperatura e pressão na extração supercrítica com dióxido de carbono do ácido p-cumárico pode ser vista na Figura 5.6. O comportamento da variação da concentração e do rendimento de extração deste

componente foi semelhante ao comportamento obtido para os demais componentes analisados. No entanto, como mostra a Tabela 5.3, os extratos alcoólicos foram superiores aos extratos supercríticos em termos de concentração e rendimento. Este teve um rendimento 150% maior que na ESC a 60°C e 400 bar.

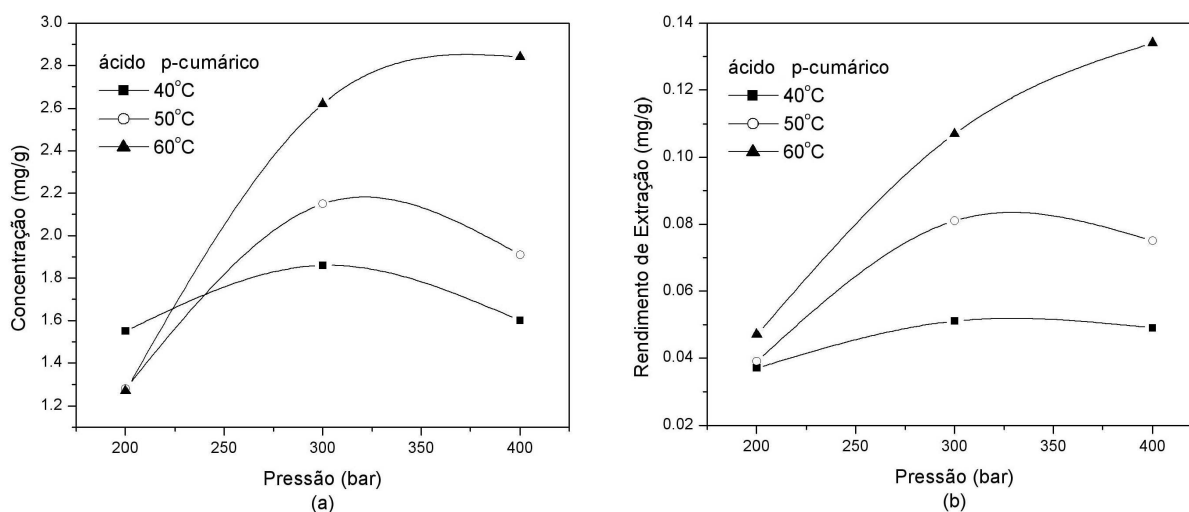


Figura 5.6 Efeito da temperatura e pressão na extração do ácido p-cumárico em relação à concentração no extrato (a) e ao rendimento de extração em mg/g de folhas (b).

A extração supercrítica com 5% de acetato de etila foi realizada com base no trabalho de Lee et al. (2007) para verificar se a concentração de Artepillin C aumentaria em relação à ESC sem adição de co-solvente. Um pequeno aumento na concentração de Artepillin C de 18,60 mg/g para 20,15 mg/g foi observado. Em condições diferentes, esses autores obtiveram 12,60 mg/g de artepillin C a 50°C, 208 bar e 6% em massa de acetato de etila.

Considerando os quatro componentes, extraiu-se no máximo 4 mg da soma destes por grama de folhas secas, com concentração de 87 mg/g (8,7 %) enquanto que nos extratos alcoólicos a concentração total destes foi de aproximadamente 2 a 3 %.

Em relação ao extrato etanólico, o dióxido de carbono supercrítico extraiu preferencialmente em ordem decrescente o canferide, o Artepillin C, o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e por último o ácido *p*-cumárico, sendo que neste último componente a extração alcoólica foi mais eficiente.

Analisando a estrutura química do ácido 4-hidroxicinâmico e dos seus derivados prenilados (Artepillin C e o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico), apresentada na Figura 4.3, observou-se que presença de um grupo prenil na molécula aumentou a quantidade desses compostos na ESC. A extração supercrítica foi mais eficiente em ordem decrescente para o Artepillin C (2 grupos prenil), o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (1 grupo prenil) e para o ácido *p*-cumárico (0 grupos prenil). Isto indica que a presença do grupo prenil diminui a polaridade da molécula e favorece a extração supercrítica.

Dados de solubilidade de solutos puros em dióxido de carbono supercrítico são úteis para uma análise prévia da eficiência de extração relativa entre os diferentes componentes da mistura. Murga et al. (2003) mediram a solubilidade de três ácidos hidroxicinâmicos, o ácido 4-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico), o ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido caféico) e o ácido 4-hidroxi-3-

metoxicinâmico (ácido ferúlico) na pressão acima de 500 bar e temperatura de 40 a 60 °C. Sob as mesmas condições de temperatura e pressão, o ácido ferúlico apresentou maior solubilidade na ESC com dióxido de carbono do que o ácido *p*-cumárico cuja solubilidade é maior do que a do ácido caféico. Esse comportamento pode ser esperado uma vez que a adição de um grupo hidroxila geralmente resulta em uma diminuição da solubilidade da nova molécula (o ácido caféico é formado a partir do ácido *p*-cumárico pela adição de um grupo hidroxila) e a metoxilação (ácido ferúlico é formado pela metoxilação do ácido caféico) geralmente causa um amplo aumento na solubilidade. A solubilidade do ácido caféico é cerca de 40 vezes menor que a do ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico é 20 vezes mais solúvel que o ácido *p*-cumárico.

A amostra de folhas de alecrim-do-campo empregada neste trabalho foi resultado da soma de brotos e de folhas em desenvolvimento e desenvolvidas, tendo como concentração máxima de 7,84 mg/g de Artepillin C no extrato alcoólico e de 20,12 mg/g na melhor condição supercrítica. O descarte das folhas já desenvolvidas na amostra poderia promover um aumento considerável na concentração deste componente nos extratos, como exemplificado no trabalho de Park et al (2004).

5.3.3. Análise Quantitativa dos voláteis por GC-MS

A Tabela 5.4. apresenta a comparação da composição química do óleo essencial retido no adsorvente Porapak-Q obtido por ESC com a da literatura. Os

cromatogramas dos óleos obtidos por ESC a 50°C, 300 bar (ESC), ESC a 50°C, 300 bar + 5% (m/m) de co-solvente etanol (ET), ESC a 50°C, 300 bar + 5% (m/m) de co-solvente acetato de etila (AC) analisados podem ser vistos no Anexo D.

Tabela 5.4 Composição química (% relativa em área) do óleo essencial do alecrim-do-campo obtido por diferentes metodologias de extração.

t_R (min)	Área %				IR	Componentes	PM
	ESC	ET	AC	SC*			
5,34	1,41	1,65	1,98	-	931	α -pineno (a,c)	136
6,35	0,45	-	0,49	-	971	sabineno (a,c)	136
6,45	6,54	6,67	9,35	-	975	β -pineno (a,c)	136
6,80	1,34	0,59	1,11	-	989	β -mirceno (a,b,c)	136
8,01	14,28	7,59	13,6	-	1027	limoneno (a,b,c)	136
8,73	-	-	-	-	1049	Contaminante	
8,92	-	-	-	-	1054	Contaminante	
9,10	-	-	-	-	1060	Contaminante	
20,64	-	4,64	0,85	-	1348	α -cubebeno (a,b)	204
21,71	-	-	-	-	1374	α -copaeno	204
22,10	0,68	-	0,76	-	1383	β -bourboneno (a,b,c)	204
22,34	0,73	-	0,76	-	1389	β - cubebeno (a,b,c)	204
22,43	1,01	1,15	1,12	-	1391	β -elemeno (a,b,c)	204
23,09	-	-	-	-	1408	α -gurjuneno	204
23,54	14,26	15,61	16,4	5,1	1418	<i>trans</i> -cariofileno (a,b,c)	204
24,28	-	-	0,80	1,2	1437	aromadendreno (a,b,c)	204
24,87	2,04	2,41	2,33	1,5	1451	α -humuleno (a,b)	204
26,05	21,88	26,05	21,4	8,8	1481	germacreno D (a,b)	204
26,09	-	-	1,49	-	1482	allo-aromadendreno (a,b,c)	204
26,67	18,31	22,7	20,9	9,9	1496	biciclogermacreno (a,b)	204
26,94	0,51	-	-	-	1503	germacreno A (a,b)	204
27,29	-	-	-	-	1506	γ -cadineno	204
27,68	1,42	1,81	1,64	4,5	1522	δ -cadineno (a,b,c)	204
29,29	5,71	4,91	3,17	35,1	1564	nerolidol (a,b,c)	222
29,67	1,06	-	-	-	1574	germacreno D-4-ol (a,b)	222
29,72	1,62	2,90	1,95	12,6	1575	espatulenol (a,b,c)	220

Tabela 5.4 Continuação

t_R (min)	Área %				IR	Componentes	PM
	ESC	ET	AC	SC *			
29,94	-	-	-	3,0	1581	óxido de cariofileno	220
35,00	1,59	-	-	-	1719	farnesol (E,E) (a,b,c)	220
35,76	0,74	1,27	-	-	1740	farnesol (E,Z) (a,b,c)	220

 t_R : tempo de retenção

IR: índice de retenção

ESC: ESC a 50°C, 300 bar

ET: ESC a 50°C, 300 bar + 5% (m/m) de co-solvente etanol

AC: ESC a 50°C, 300 bar + 5% (m/m) de co-solvente acetato de etila

SC*: ESC a 50°C, 100 bar (Cassel et al., 2000)

a: banco de dados da biblioteca Wiley do CG/EM

b: índice de retenção a partir da série de n-alcenos em coluna capilar HP-5MS

c: comparação com a fragmentação de espectros de massas da literatura

Conforme análise por CG/ EM os resultados indicaram que o teor de monoterpenos variou de 16,5 a 26,5%, o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos variou de 60,8 a 74,3% e o teor de álcoois sesquiterpênicos variou de 5,1 a 10,7 % nos óleos essenciais em estudo (ESC, ET, AC).

O óleo da *B. dracunculifolia* obtido por Cassel et al. (2000) diferenciou das outras amostras de óleo por não ter apresentado monoterpenos em sua composição, conforme apresentado na Tabela 5.4. Com base no princípio de funcionamento do Porapak, o uso deste adsorvente consiste numa maneira de evitar a perda de hidrocarbonetos monoterpênicos durante a extração supercrítica.

Os compostos majoritários dos voláteis capturados na ESC (% relativa em área) foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos: germacreno D (21,4 a

26,1%), biciclogermacreno (18,3 a 20,9%), *trans*-cariofileno (14,3 a 16,4%) e os monoterpenos: limoneno (7,6 a 14,3%) e β -pineno (6,5 a 9,4%).

O rendimento médio dos voláteis foi de 0,17 %, sendo um valor menor do que 0,38% obtido por Cassel et al. (2000) na extração supercrítica (Tabela 5.1). Esse baixo rendimento pode estar associado à retenção de parte dos voláteis na fração pesada do extrato (óleo essencial). Este argumento pode ser utilizado novamente para explicar a baixa quantidade de (E) nerolidol e espatulenol (compostos oxigenados mais importantes comercialmente no óleo, segundo Ferronato et al. (2007)) presentes nos extratos supercríticos deste trabalho em relação aos dados anteriormente citados (Tabela 5.4).

5.4. Atividade Antioxidante

No Anexo E são apresentados os gráficos da absorbância (%) X concentração dos extratos de alecrim-do-campo ($\mu\text{g/mL}$). A atividade antioxidante baseada no seqüestro de radicais livres (DPPH) de diferentes tipos de extratos de alecrim-do-campo é apresentada na Tabela 5.5. O cálculo da ED_{50} ² foi feito pela planilha através do método dos mínimos quadrados.

² ED_{50} é a dose efetiva que elimina 50% dos radicais livres.

Tabela 5.5 Atividade antioxidante obtida pelo método do DPPH.

Método de extração	ED₅₀ (µg/ mL)
ESC, 40 °C/ 200 bar	39,04
ESC, 40 °C/ 300 bar	46,54
ESC, 40 °C/ 400 bar	46,87
ESC, 50 °C/ 200 bar	43,76
ESC, 50 °C/ 300 bar	46,77
ESC, 50 °C/ 400 bar	35,80
ESC, 60 °C/ 200 bar	42,17
ESC, 60 °C/ 300 bar	39,62
ESC, 60 °C/ 400 bar	36,81
ESC, 50 °C/ 300 bar *	23,88
ESC, 50 °C/ 300 bar **	38,72
Extração etanólica	26,68
Extração metanólica	49,22

* Valor referente à ESC e 5 % (m/m) de etanol.

** Valor referente à ESC e 5 % (m/m) de acetato de etila.

É possível verificar pelos valores de ED₅₀ que os extratos apresentaram atividade antioxidante entre 23,88 a 49,22 µg/ mL, sendo que o extrato obtido por ESC + 5 % (m/m) de etanol e o extrato etanólico tiveram a melhor capacidade de seqüestrar radicais livres, com valores de 23,88 µg/ mL e 26,68 µg/ mL respectivamente.

Os resultados demonstram uma maior afinidade dos compostos antioxidantes com solvente orgânico polar, como por exemplo, o etanol. Entretanto, o extrato supercrítico tem como vantagem a obtenção de um produto livre de resíduos orgânicos. Também, foi possível verificar que o solvente metanol

além de ser tóxico foi o que apresentou a pior atividade antioxidante (49,22 µg/mL).

Os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam os únicos. A atividade antioxidante destes fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (Basile et al., 2005).

A análise de atividade pelo radical DPPH serve como um primeiro indicativo da capacidade antioxidante da amostra. É necessária a aplicação de outros métodos a fim de se quantificar, de fato, esta atividade.

5.5. Atividade Antimicrobiana

Dentre os microrganismos testados, apenas os valores de halos de inibição ao *S. aureus* pode ser visualizado na Tabela 5.6. Nesta análise da atividade antimicrobiana realizada por difusão de disco, esses valores estão ao redor de 9 mm.

Os melhores resultados de atividade antimicrobiana obtidos neste trabalho foram nos extratos com SC-CO₂ a 40°C com halo de inibição médio de

10,8 mm contra *S. aureus*. Os extratos supercríticos e alcoólicos não apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *E. coli*.

Tabela 5.6 Atividade antimicrobiana *in vitro* por método de difusão em disco nos extratos.

Tipo de Extrato	T (°C)	Pressão (bar)	Microrganismo	Halo de inibição (mm)
SC-CO ₂	40	200	<i>S. aureus</i>	10,0 ± 1,4
SC-CO ₂		300	<i>S. aureus</i>	11,5 ± 0,7
SC-CO ₂		400	<i>S. aureus</i>	11,0 ± 0,0
SC-CO ₂	50	200	<i>S. aureus</i>	8,5 ± 0,7
SC-CO ₂		300	<i>S. aureus</i>	9,0 ± 0,0
SC-CO ₂		400	<i>S. aureus</i>	NI
SC-CO ₂	60	200	<i>S. aureus</i>	8,0 ± 0,0
SC-CO ₂		300	<i>S. aureus</i>	8,0 ± 1,4
SC-CO ₂		400	<i>S. aureus</i>	7,0 ± 0,0
Extrato Metanólico	--	--	<i>S. aureus</i>	NI
Extrato Etanólico	--	--	<i>S. aureus</i>	8 ± 0,0

NI: não inibiu

Com volume de 10 µL de óleo essencial (puro) obtido da *B. dracunculifolia* (coletada na região sudoeste do Paraná), Ferronato et al. (2007) obtiveram um diâmetro do halo de inibição de 18,92 mm para a *E. coli* e 14,63 mm para a *S. aureus*. Este resultado não pode ser comparado diretamente a este trabalho, mas esses valores podem ser utilizados como uma referência já que são a mesma espécie vegetal.

5.6. Origem da *Baccharis dracunculifolia*

Os extratos supercríticos obtidos neste trabalho apresentaram concentração de Artepillin C ao redor de 18 a 20 mg/g, que é bem superior (duas

vezes e meia) à concentração de aproximadamente 8 mg/g no extrato etanólico. A partir desse resultado houve o interesse de testar outras amostras que poderiam conter conteúdo maior de Artepillin C. Analisando os dados apresentados neste documento é de se esperar que acessos que produzam extratos alcoólicos mais concentrados possam produzir extratos supercríticos ainda mais concentrados em artepillin C do que os obtidos neste trabalho.

Amostras de *B. dracunculifolia* que estavam disponíveis no CPQBA, como relacionados na Tabela 5.7, foram colhidas em 2006 e obtidos os extratos etanólicos. Esses extratos foram analisados quanto ao teor de Artepillin C e a atividade antioxidante.

Os resultados indicaram que a amostra empregada neste trabalho possuía um teor relativamente baixo de Artepillin C e que extratos mais concentrados poderiam ser obtidos. A Tabela 5.7 mostra acessos que produziram extratos alcoólicos de até 17 mg/g, que é bem mais concentrado que o de 7,8 mg/g de Artepillin C usado neste trabalho.

Com esses resultados observou-se que não é somente a parte da planta coletada que é importante na concentração de compostos, mas também a origem dos acessos. As amostras que apresentaram maior conteúdo de Artepillin C foram aquelas oriundas dos estados de São Paulo e de Minas Gerais e as que apresentaram menores foram as do estado do Paraná e de locais frios como Campos do Jordão. Isto está de acordo com as observações feitas em amostras

de própolis procedentes dos estados de SP e MG, cujas abelhas usam o alecrim-do-campo como principal fonte para produção de própolis e que o Artepillin C só aparece em quantidade apreciável nas própolis desses estados.

Tabela 5.7 Concentração de Artepillin C e atividade antioxidante em extratos etanólicos de alecrim-do-campo de diferentes acessos.

Acesso *	X _o (%)	Artepillin C		ED ₅₀ (µg/ mL)	Procedência
		C (mg/g)	R (mg /g)		
A2	10,19	17,01	1,73	37,73	Carujú - SP
A3	10,84	13,48	1,46	42,62	Paraguaçu/ Alfenas -MG
A8	8,34	14,48	1,21	41,08	Ouro Fino - MG
A9	7,45	13,34	0,99	54,82	Ribeirão Preto - SP
A14	8,01	11,38	0,91	37,71	Cabrália Paulista - SP
A16	8,44	10,73	0,91	31,73	Areado MG (próximo a Alfenas) - MG
A7	8,65	10,29	0,89	51,18	Corrego do Ouro - MG (perto de Alfenas)
A11	7,67	7,88	0,60	54,15	Sto Antonio de Posse - SP
A1 + A10**	6,11	7,84	0,48	26,68	Chave da Taquara + CPQBA - SP
A5	4,67	3,57	0,17	77,24	Colombo (2) - PR
A12	1,89	0,17	0,00	321,46	Campos do Jordão - SP
A12F	2,24	0,00	0,00	41,34	Campos do Jordão - SP
A4	6,85	0,00	0,00	145,95	Colombo (1) – PR (perto de Curitiba)

* Acessos plantados em maio 2004 no CPQBA e colhidos em 2007

** Amostra usada nos experimentos

X_o = rendimento global de extração

C = concentração (mg / g de extrato seco)

R = rendimento (mg / g de folhas)

O extrato alcoólico que apresentou a melhor atividade antioxidante foi o utilizado no trabalho (A1 + A10) com ED₅₀ de 26,68 µg/ mL. Já, a pior atividade foi no extrato de acesso A12 com valor 321,46 µg/ mL e concentração de Artepillin C de 0,17 mg/g. De acordo com a Tabela 5.7, os resultados indicaram que não existe uma relação direta entre a concentração do Artepillin C e a atividade antioxidante.

6. CONCLUSÕES

Os rendimentos globais de extração (X_0) de 6,11 e 10,94% das extrações alcoólicas foram superiores aos rendimentos entre 2,4 a 4,7% da extração com dióxido de carbono supercrítico. Entretanto a concentração de três compostos (artepillin C, PHCA e canferide) dentre os quatro analisados foram maiores nos extratos supercríticos. A concentração do ácido p-cumárico foi maior nos extratos alcoólicos.

Nas condições de temperatura e pressão menores, a extração supercrítica produziu extratos com rendimentos aproximadamente iguais à extração alcoólica para o Artepillin C, inferior para o PHCA e superior para o canferide. Entretanto, nas condições mais elevadas de temperatura e pressão (60°C e 400 bar) produziu extratos com rendimentos superiores em 156, 98 e 64% aos extratos etanólicos para o Artepillin C, PHCA e canferide.

O rendimento dos voláteis capturados em polímero Porapak-Q foi de 0,17%. No entanto, é bem provável que o extrato representado pela fração pesada (óleo essencial) deste trabalho continha também parte desses voláteis.

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, sendo que os extratos que utilizaram o etanol como solvente (no caso, o extrato supercrítico a 50°C, 300 bar + 5% (m/m) de etanol e o extrato etanólico) apresentaram a melhor

atividade antioxidante com valores de 23,88 µg/ mL e 26,68 µg/ mL, respectivamente.

Com relação à atividade antimicrobiana, os extratos supercríticos e o extrato etanólico apresentaram atividade contra *S. aureus*. As maiores atividades foram encontradas nos extratos obtidos por ESC a 40°C frente a *S. aureus*, enquanto que os extratos supercríticos e alcoólicos não apresentaram atividade contra *C. albicans* e *E. coli*.

No geral, a extração supercrítica nas condições mais elevadas de temperatura e pressão mostrou ser mais eficiente na extração dos componentes de interesse deste trabalho do que a extração alcoólica.

Sugestões para Trabalhos Futuros

Diante dos resultados apresentados e conclusões sugere-se:

- Obter extratos usando folhas que possuem maior quantidade de Artepillin C e também obter extratos de partes da planta (brotos, folhas em desenvolvimento e folhas desenvolvidas) que possuem composição diferenciada.
- Empregar variações de porcentagem de co-solventes na extração com dióxido de carbono supercrítico.
- Empregar pressões mais elevadas com o intuito de obter um possível aumento de concentração e de rendimento de extração.
- Fazer análises de fenólicos totais e também verificar se existe alguma correlação com a atividade antioxidante.
- Fracionar os extratos com uso de extrações seguidas: extração supercrítica de extratos etanólicos e extração etanólica de extratos supercríticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crudes. *Food Chemistry*, **1991**, 42 (2), 135-138.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography – mass spectrometry. *Allied Publ. Corp.*, Carol Stream, IL, **1995**, 469 pp.
- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, **2005**, 35 (4), 909-915.
- ASAE Standards. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. ASAE, S319.3, 547, **1997**.
- AZIZ, N. H.; FARAG, S. E.; MOUSA, L. A.; ABO-ZAID, M. A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, **1998**, 93 (374), 43-54.
- BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C. Standardization of propolis: present status and perspectives, International Bee Research Association, **2000**, 81(4), 182-188.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from

- Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72, 239–246.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol*, **2005**, 102, 32-36.
- BOLDT, P.E. *Baccharis (Asteraceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States. Agricultural Research Service Grassland*, **1989**, 39pp.
- BRUNNER, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundaments of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process*. New York: Springer, **1994**, 387p.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, **2005**, 67, 21-33.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, **1998**, 36(4) 347-363.
- CARVALHO JR. Obtenção do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. **2004**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- CASSEL, E.; FRIZZO, C.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2000**, 39, 4803-4805.
- CIMPOIU, C. Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2006**, 29, 1125-1142.
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. Disponível em <<http://www.nccls.org>> acesso em 2005.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, **1998**, 854, 435-442.
- CUNHA, I. B.; SALOMAO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA V. S.; CUSTODIO, A.; CASTRO, S. L. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **2004**, 52 (5), 602-604.
- DUARTE S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, 26 (4), 527 –531.
- ESPIRITO-SANTO, M. M.; FERNANDES, G. W. Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: *Psyllidae*) galls on the dioecious shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Environmental Entomology*, **1998**, 27, 870-876.
- FERRACINI, V.; SILVA, A. G.; PARAIBA, L. C.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis*: a prospective approach on their ecological role. *Proc. Int. Comp. Conf.*, **1996**, 2, 467-474.

- FERRACINI V. L.; PARAIBA L. C.; LEITAO FILHO H. F.; SILVA A. G.; NASCIMENTO L. R; MARSAIOLI, A. Essential oil of seven Brazilian *Baccharis* sp. *J Essent Oil Res* , **1995**, 7, 355-367.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteracea). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2007**, 17 (2), 224-230.
- FILLIPI, R. P. CO₂ as a Solvent: Application to Fats, Oils and Other Materials. *Chemistry and Industry*, **1982**, 12, 390-394.
- FRANCO, I. J. *Ervas e plantas: a medicina dos simples*, 5ª Ed., Imprimax: Chapecó, **1995**, 177pp.
- FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, 54 (10), 1465-1468.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis, *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, **2006**, 26(1), 171-178.
- GAULEJAC, N. S. P.; GLORIES; Y.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 425-431.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, Cardiff, **1979**, 60 (2), 59-84.
- HATANO, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion

radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 2016-2021.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. *Archives of Toxicology Supplement*, **1998**, 20, 237-248.

ISHIKAWA, M.; KANNO, S.; ASOU, K.; OGINO, M.; TADANO, T. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. *Journal of Pharmacological Sciences*, **2004**, 94, 129-129.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res.*, **2001a**, 21, 221-228.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; MICALLEF, J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA M.; KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. *Virchows Arch*, **2001b**, 438, 259-270.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; ZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittelforschung*, **1993**, 43 (5), 607-609.

LEE, Y-N.; CHEN, C-R.; YANG, C-C.; CHANG, C-M. J. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions. *Separation and Purification Technology*, **2007**, 54, 130-138.

- LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC L. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, **1995**, 38 (2), 381-389.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, 74 (2), 105-112.
- MAUL, A. A. Situação atual e futuro da extração supercrítica, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **1999**, 11.
- MELO, S. F.; SOARES, S. F. ; COSTA, R. F. ; SILVA, C. R. ; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C. ; ARAÚJO, A. C. ; BERNARDO FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the satnnous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, **2001**, 496, 33-38.
- MONTPIED, P.; BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Molecular Brain Research*, **2003**, 115 (2), 111-120.
- MURGA, R.; SANZ, M. T.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **2003**, 27, 239-245.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromat.*, **2004**, 1054, 95-111.

- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Journal of Nutrition*, **1990**, 29 (4), 273-300.
- PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR C. L; ALENCAR, S.; M; FUJIWARA, F. Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 1100-1103.
- PELEG, H., BODINE, K. K., NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses*, **1998**, 23 (3), 371-378.
- PELLERIN, P. Extraction of natural raw materials for the flavor industry. *Perfumer & Flavorist*, **1991**, 56, 37-41.
- PIMENTEL, C. V. M.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE A. P. B. *Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Varela, **2005**.
- QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, **1990**, 1, 105-109.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. *Trends Food Sci Nutr*, **1995**, 6 (3), 75-82.
- REVERCHON, E.; MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit.*, **2006**, 38, 146-166.

- RICE-EVANS, C; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, **1995**, 22, 375-383.
- RIZVI, S. S. H.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food Technology*, **1986**, 55-65.
- SANDLER, S. I. *Chemical and Engineering Thermodynamics*, 2^a Ed., Wiley Series, **1989**, pp.622.
- SAWAYA, A. C.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA I. B.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, **2004**, 129, 739-744.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1992**, v.32 (1), 67-103.
- SHIMIZU, K.; SWADESH, K. D.; HASHIMOTO, T.; SOWA, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Artepillin C in Brazilian propolis induces G₀/G₁ arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells, *Mol. Carcinog.*, **2005**, 44, 293-299.
- SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In: Food phytochemicals for cancer prevention*, Washington: American Chemical Society, **1994**, 20-33.
- STAUB, C. Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in 1996. *Forensic Science International*, **1997**, 84, 295-304.

- SUTTER, L. E. D.; SILVA, M. F. F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, **1994**, 14, 3-10.
- TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; EGLY, G.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 95, 155-161.
- TAYLOR L. T. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons Inc., Canada, **1996**, p. 181.
- UTO Y. A.; HIRATA, T.; FUYITA, T.; SYUNSUKE, H.; NAGASAWA, H.; HORI, First Total synthesis of artemisinin established by *o,o'*-Diprenylation of *p*-Halophenols in water. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67 (7), 2355 -2357.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (*Asteraceae*): chemical, economic and biological aspects. *Quím. Nova*, **2005**, 28, 85-94.
- WEYERSTAHL, P.; CHRISTIANSEN, C.; MARSCHALL, H. Constituents of Brazilian Vassourá oil. *Flavour and fragrance journal*, **1996**, 11, 15-23.

8 ANEXO A – DADOS EXPERIMENTAIS

Tabela 8.1 Densidade aparente da *B. dracunculifolia* seca e triturada.

Ensaio	Massa (kg)	Densidade aparente (kg/m ³)
1	0,0175	350,3
2	0,0173	345,4
3	0,0175	349,8
Média	0,0174	348,5 ± 2,6

Tabela 8.2 Dados para cálculo do diâmetro médio das partículas das folhas da *B. dracunculifolia*.

Mesh	d _i (mm)	d _{i+1}	(d _i ·d _{i+1}) ^{0,5}	w _i	log d	w _i · log d	%
12	1,4	2,36	1,817691	41,77	0,25952	10,0564	5,70
16	1	1,4	1,183216	225,69	0,073064	16,48909	30,81
24	0,710	1,000	0,842615	161,15	-0,07437	-11,6033	22,00
32	0,500	0,710	0,595819	125,6	-0,22489	-28,1557	17,14
48	0,300	0,500	0,387298	101,42	-0,41195	-41,7804	13,84
100	0,150	0,300	0,212132	76,96	-0,67339	-51,8244	10,51

Tabela 8.3 Rendimentos da extração supercrítica a 50°C e 300 bar.

Extratos	Rendimento (%)
ESC + 5% de acetato de etila	3,69
ESC + 5% de álcool etílico	3,09
Extrato etanólico da amostra seca	6,11
Extrato metanólico da amostra seca	10,94

Tabela 8.4 Rendimento do extrato supercrítico da *B. dracunculifolia*

Pressão	Rendimento (% em base seca)		
	40 °C	50°C	60°C
200 bar	2,37	3,27	3,71
	2,53	2,91	4,39
	2,29	2,89	2,98
	2,40 ± 0,12	3,02 ± 0,21	3,69 ± 0,71
300 bar	2,68	3,80	4,24
	2,83	3,80	4,11
	2,67	3,71	3,88
	2,73 ± 0,11	3,77 ± 0,05	4,08 ± 0,18
400 bar	2,97	3,93	5,00
	3,26	3,98	4,74
	2,98	3,94	4,38
	3,07 ± 0,16	3,95 ± 0,03	4,71 ± 0,31

Tabela 8.5 Experimento de extração de alecrim-do-campo realizado a 50°C e 300 bar, vazão média do solvente de $4,0 \times 10^{-5}$ kg/s e com massa inicial de matéria-prima em torno de $7,0 \times 10^{-3}$ kg.

Volume de CO ₂ / 10 ³ (kg)	Massa acumulada/ 10 ³ (kg)		
	d= 0,59 x10 ⁻³ m	d= 0,84 x10 ⁻³ m	d= 1,18 x10 ⁻³ m
39	0,168	0,128	0,112
156	0,233	0,187	0,161
312	0,270	0,224	0,202
468	0,299	0,252	0,223
Rendimento (%)	4,27	3,60	3,18

Tabela 8.6. Experimento de extração da *B. dracunculifolia* realizada a 50°C e 300 bar, vazão média do solvente de $4,0 \times 10^{-5}$ kg/s e com massa inicial de matéria-prima de $7,02 \times 10^{-3}$ kg.

Volume de CO ₂ / 10 ³ (kg)	Massa acumulada/ 10 ³ (kg)
	d= 0,72 x10 ⁻³ m
39	0,136
70,2	0,160
101,4	0,176
148,2	0,196
234	0,219
312	0,235
468	0,251
624	0,256
Rendimento (%)	3,71

9 ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS

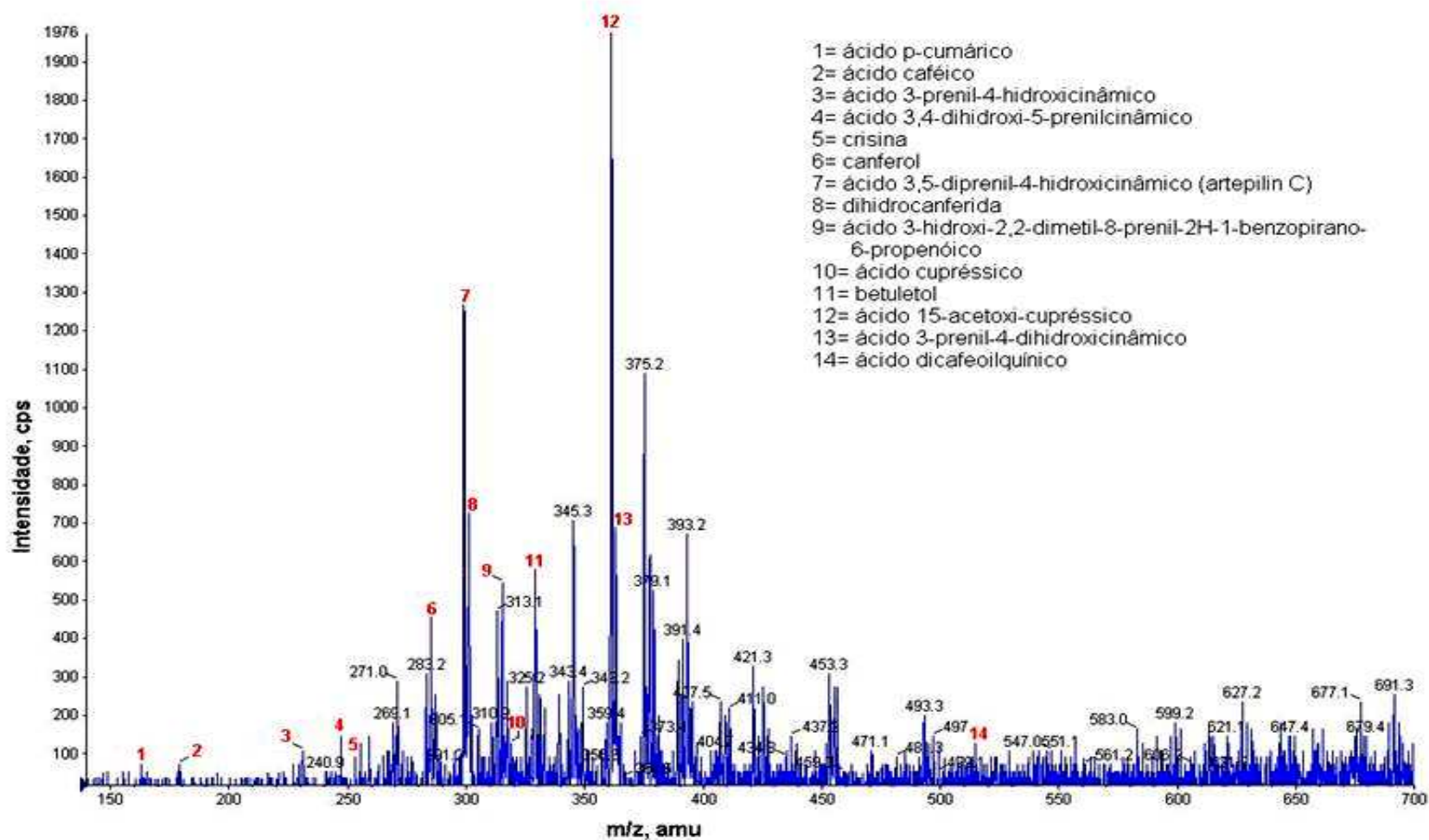


Figura 9.1 Espectro de massa do extrato etanólico da *B. dracunculifolia*.

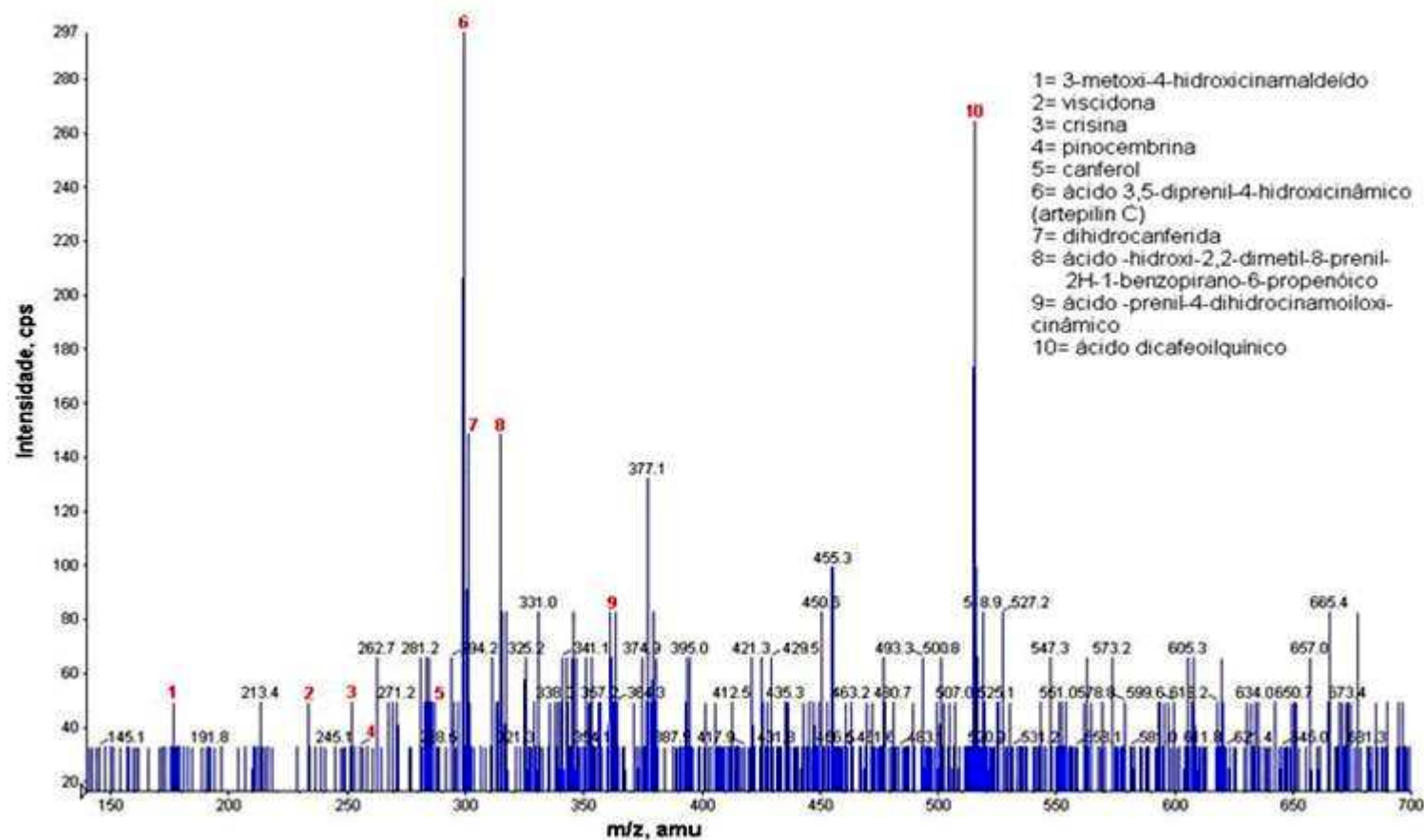


Figura 9.2 Espectro de massa do extrato metanólico da *B. dracunculifolia*.

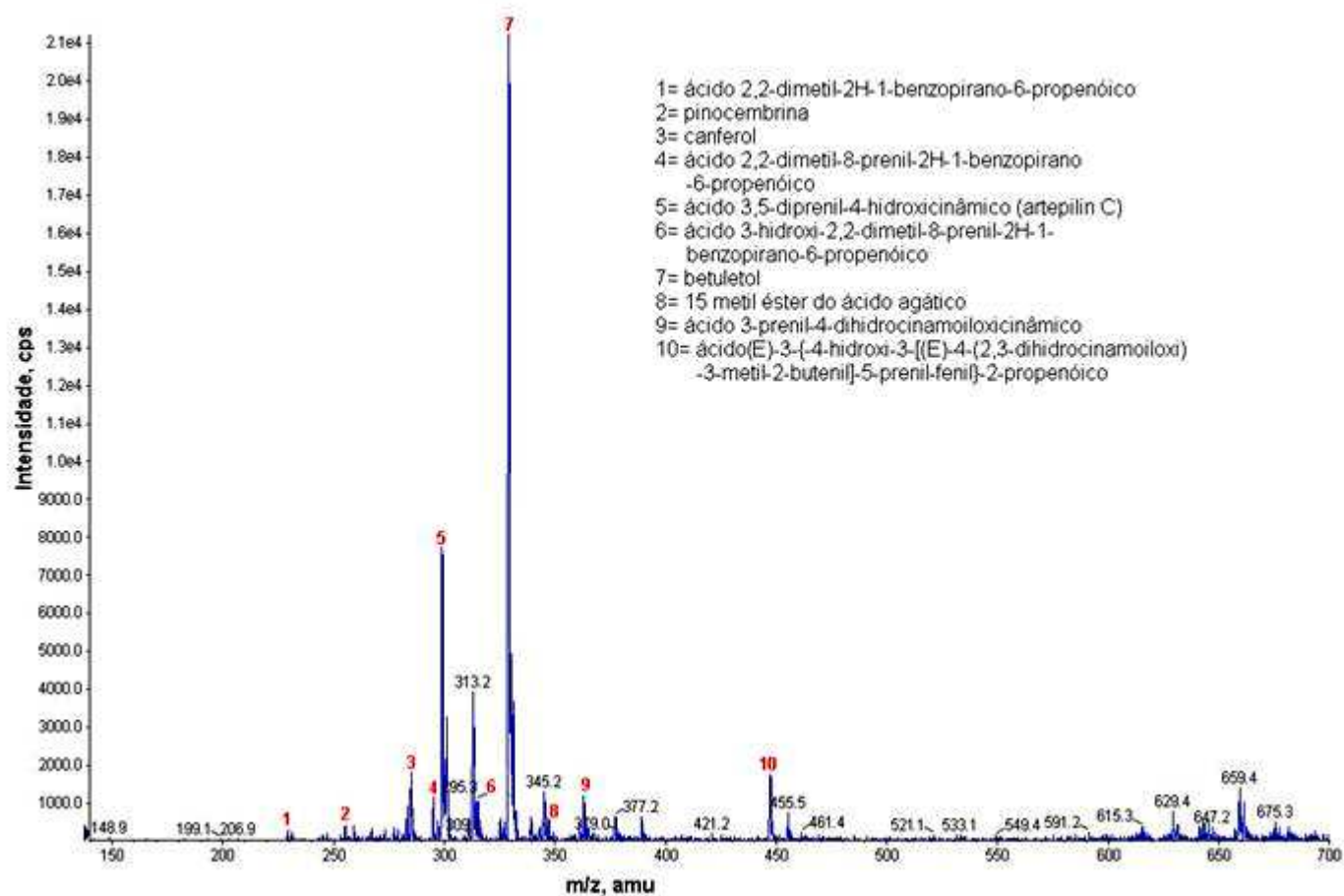


Figura 9.3 Espectro de massa do extrato da *B. dracunculifolia* obtido a 50°C, 300bar.

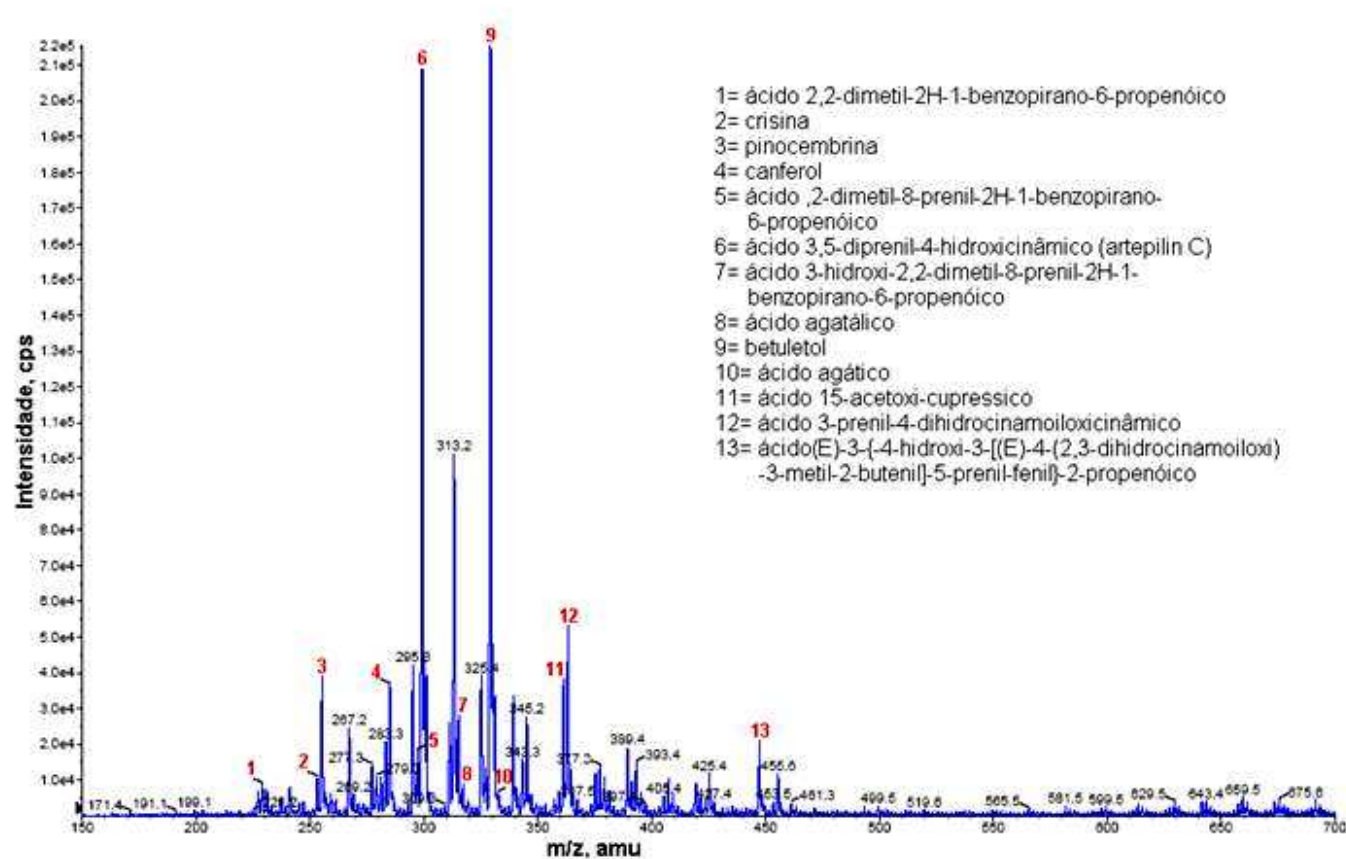


Figura 9.4 Espectro de massa do extrato da *B. dracunculifolia* obtido a 50 °C, 300 bar e com 5% (m/m) de co-solvente etanol.

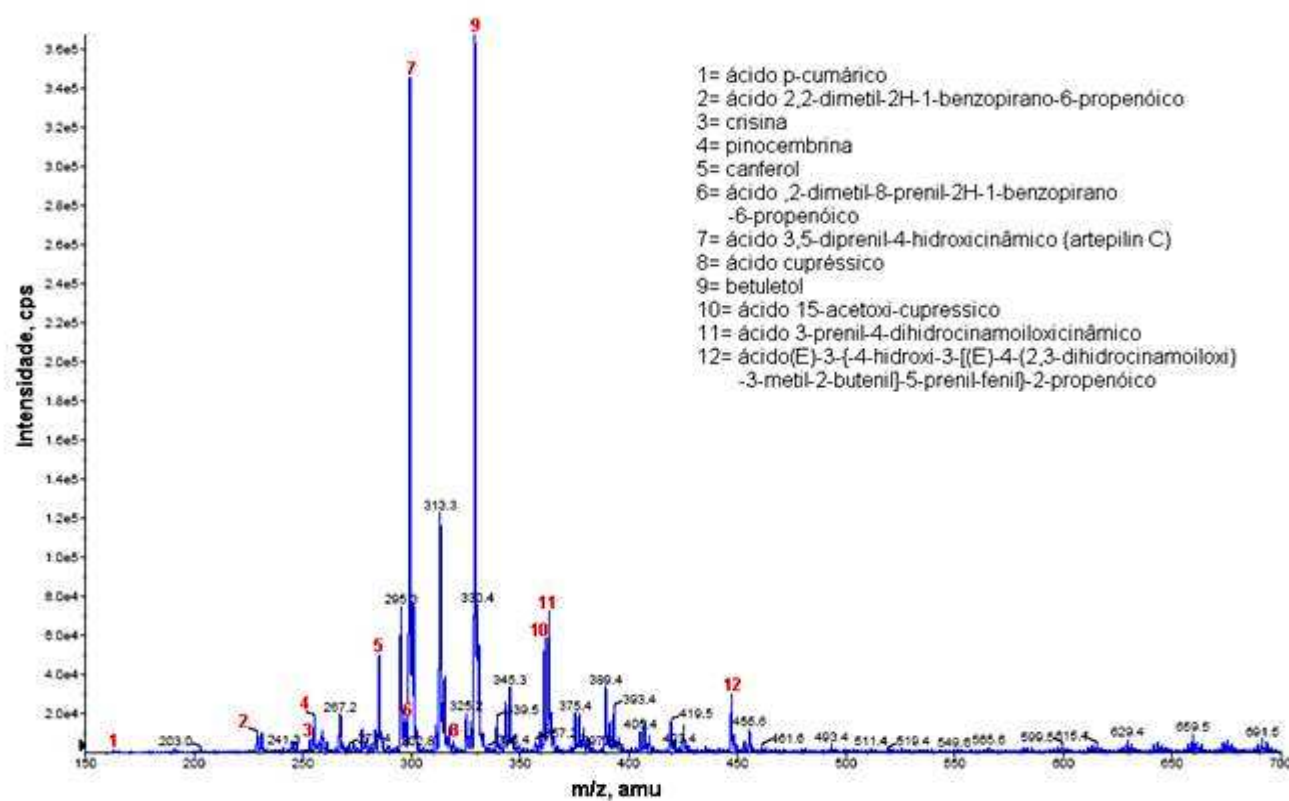


Figura 9.5 Espectro de massa do extrato da *B. dracunculifolia* obtido a 50 °C, 300 bar e com 5% (m/m) de co-solvente acetato de etila.

10 ANEXO C – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS

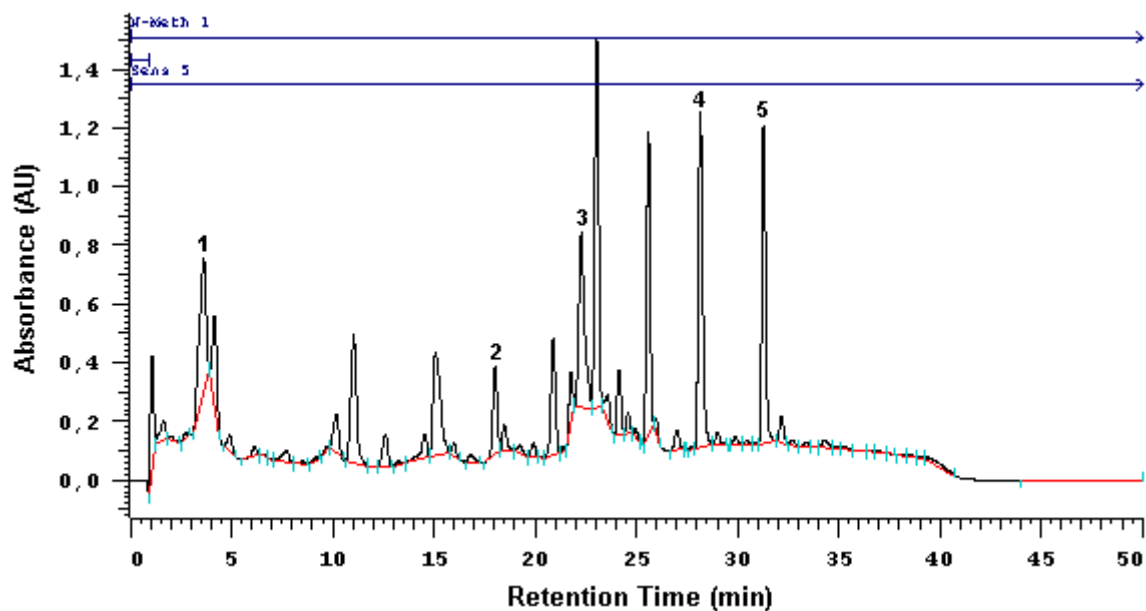


Figura 10.1 Cromatograma do extrato etanólico da *B. dracunculifolia*.
(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

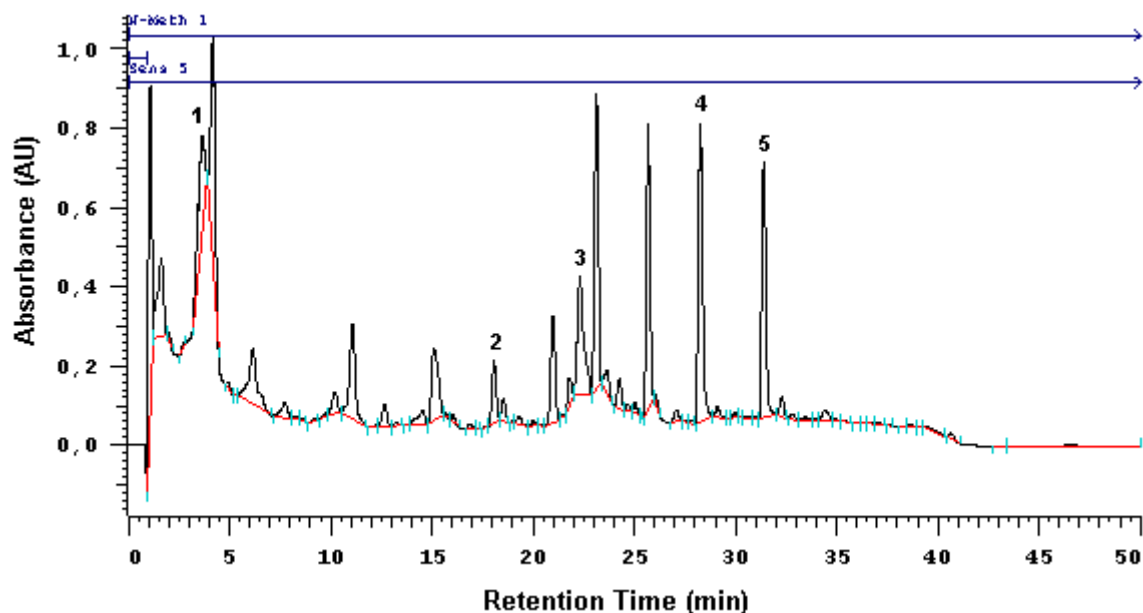


Figura 10.2 Cromatograma do extrato metanólico da *B. dracunculifolia*.
(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

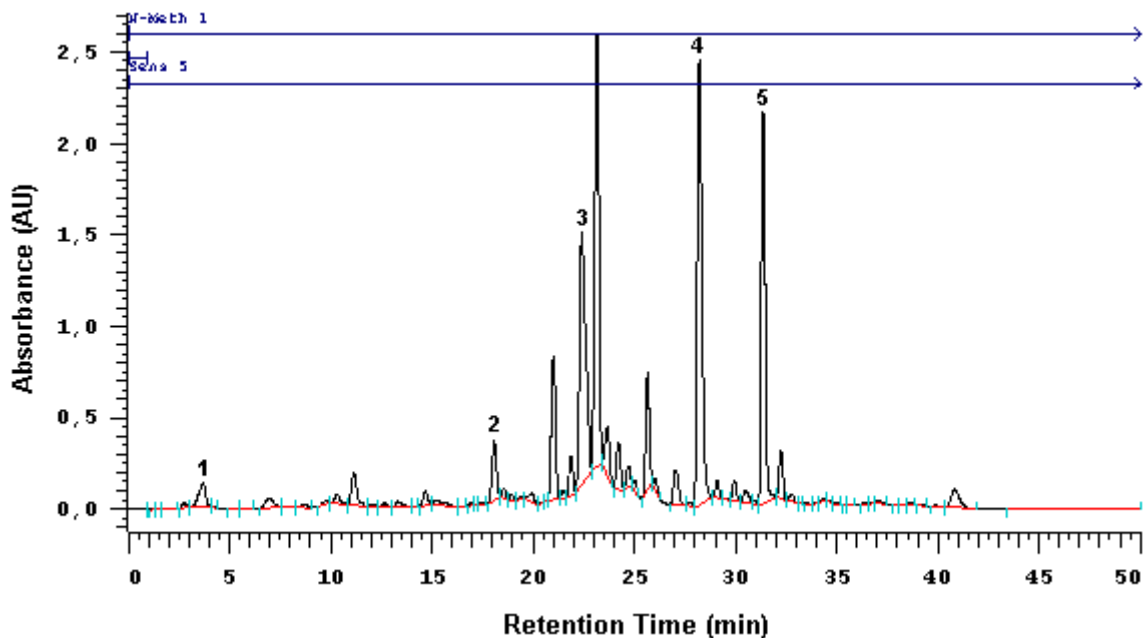


Figura 10.3 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 40°C, 200 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

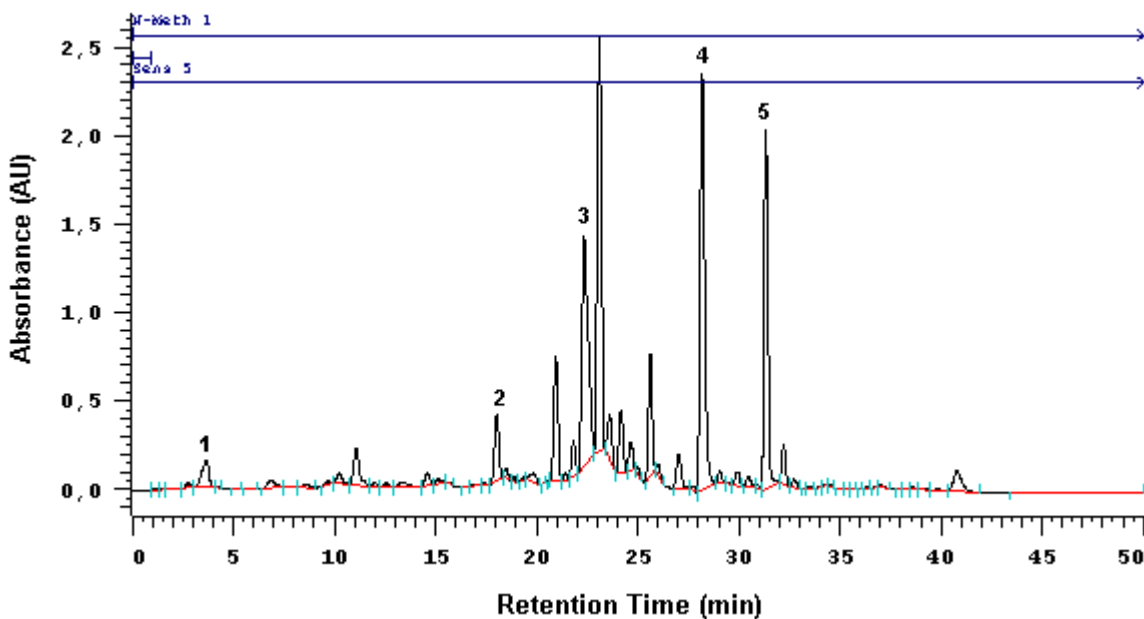


Figura 10.4 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 40°C, 300 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

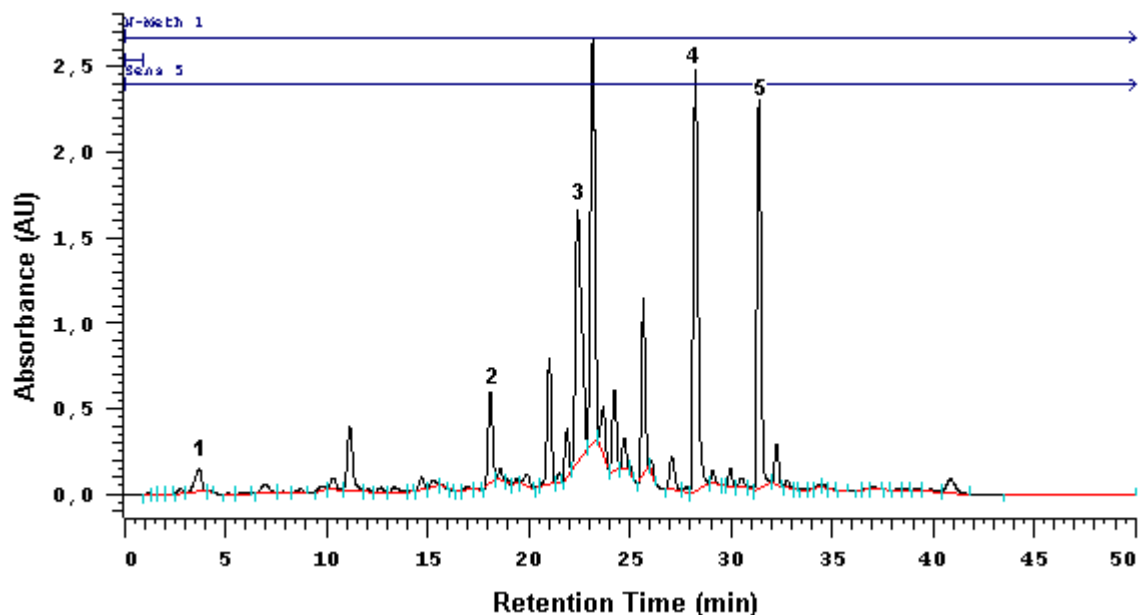


Figura 10.5 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 40°C, 400 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

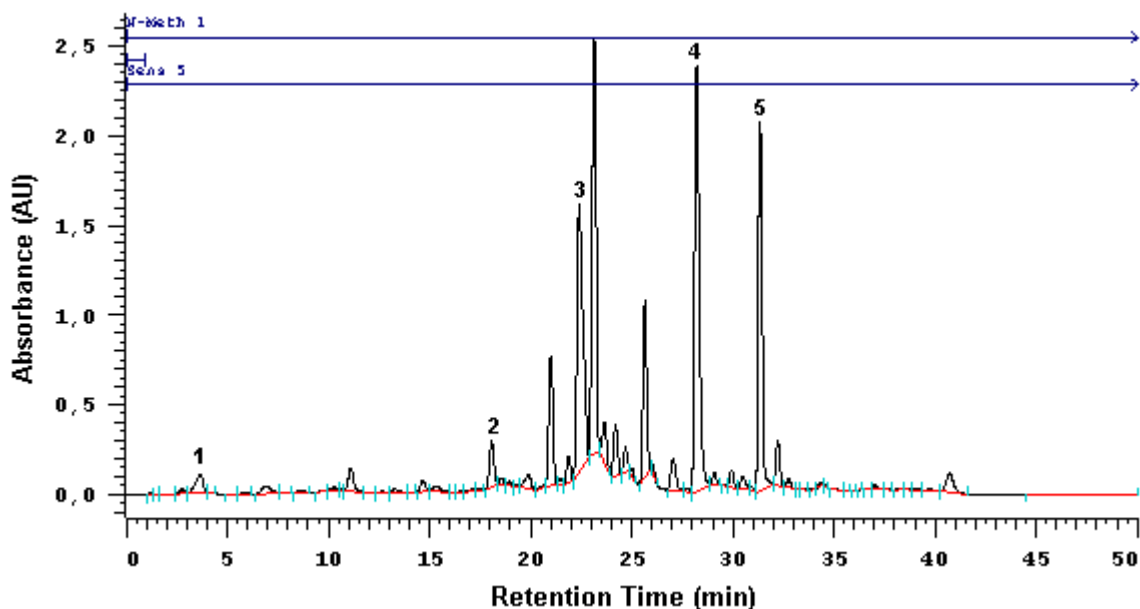


Figura 10.6 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50°C, 200 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

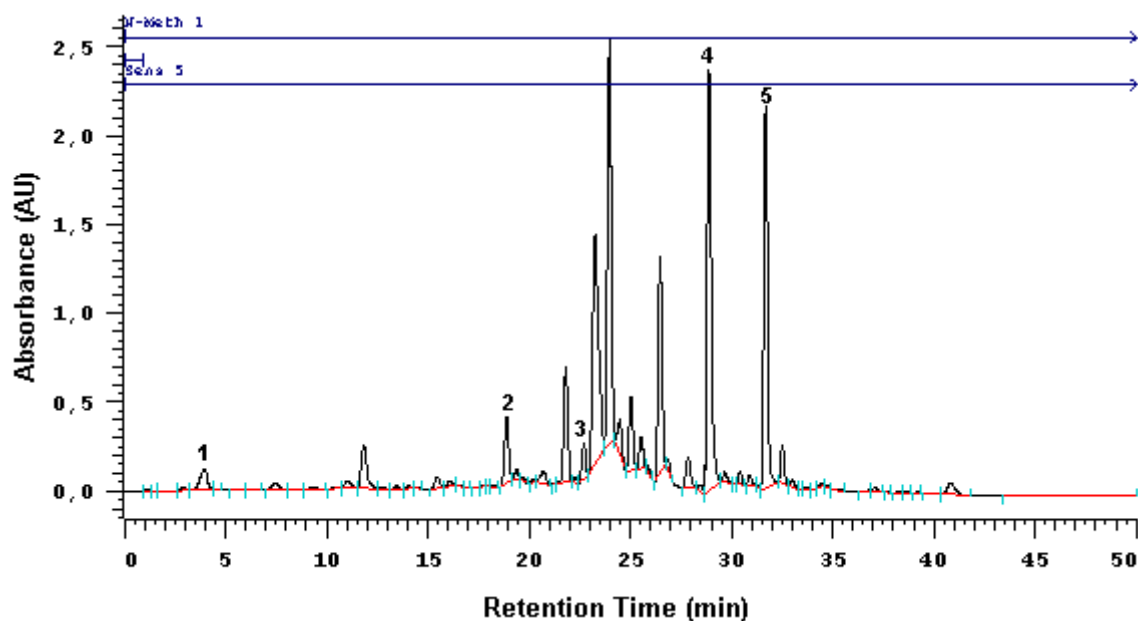


Figura 10.7 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50°C, 300 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

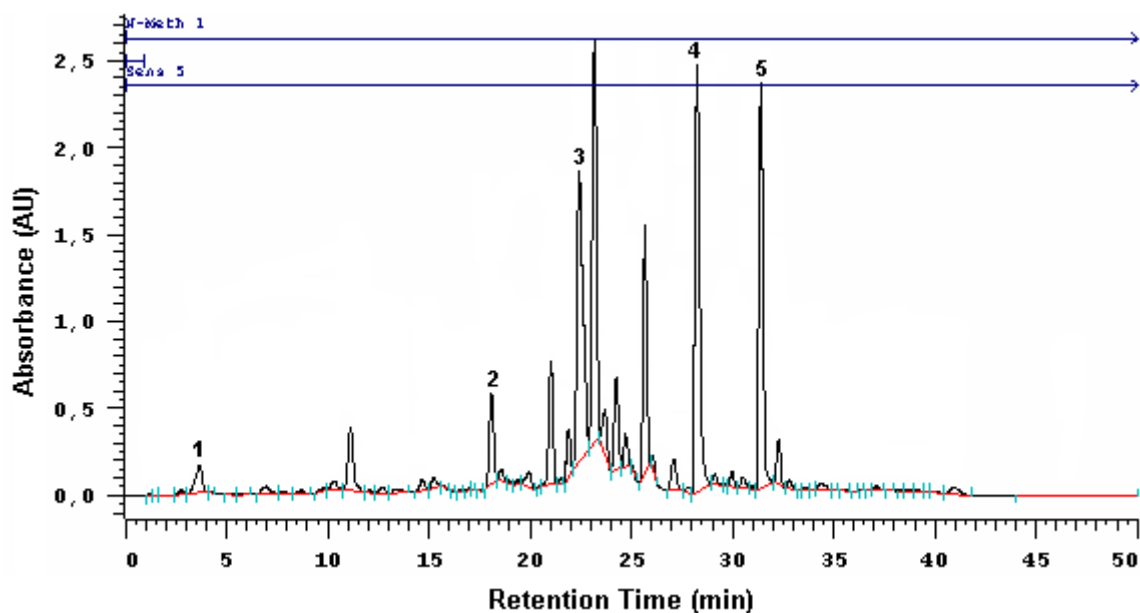


Figura 10.8 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50°C, 400 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

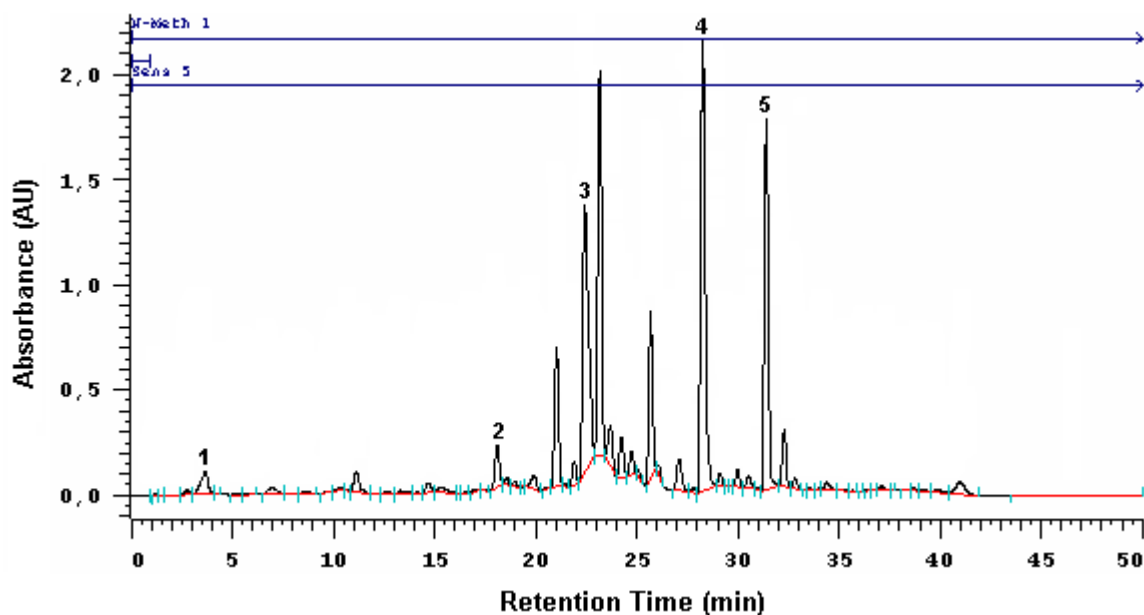


Figura 10.9 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 60°C, 200 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

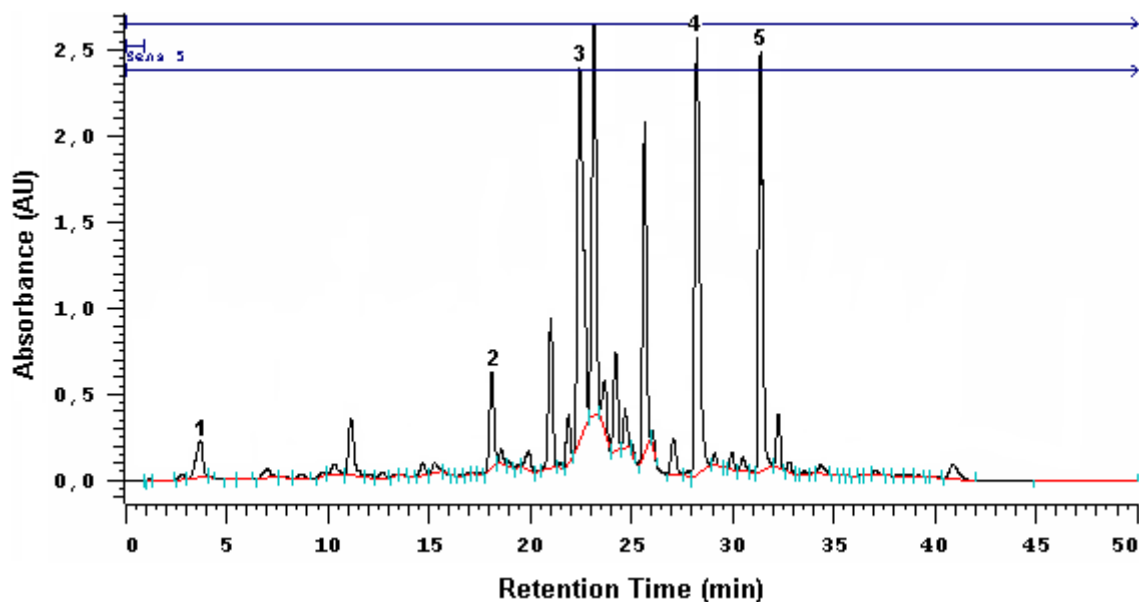


Figura 10.10 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 60°C, 300 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

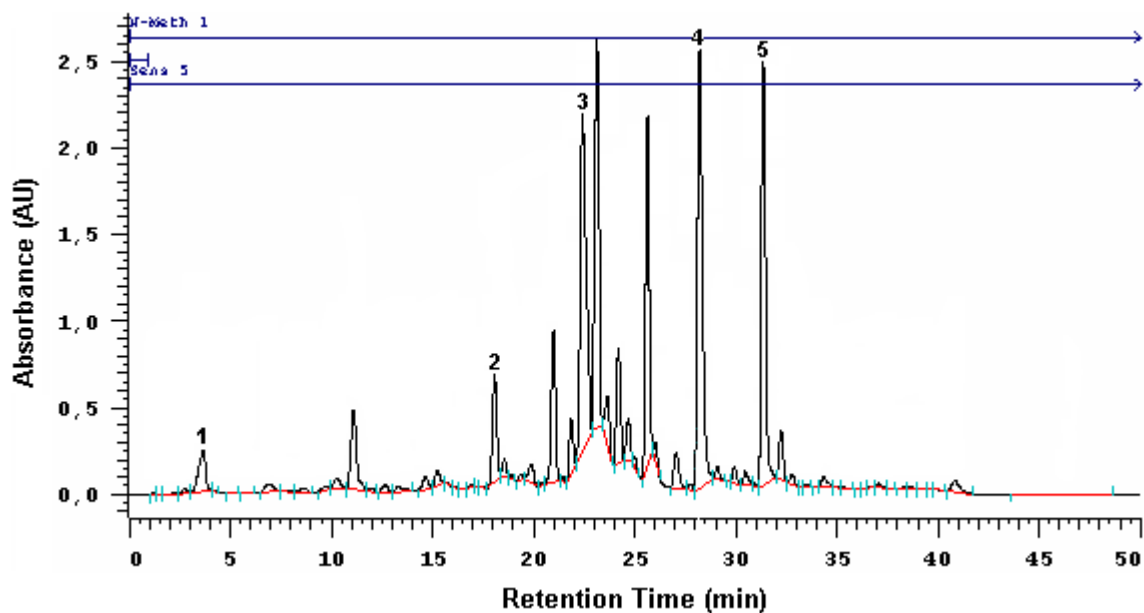


Figura 10.11 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 60°C, 400 bar.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

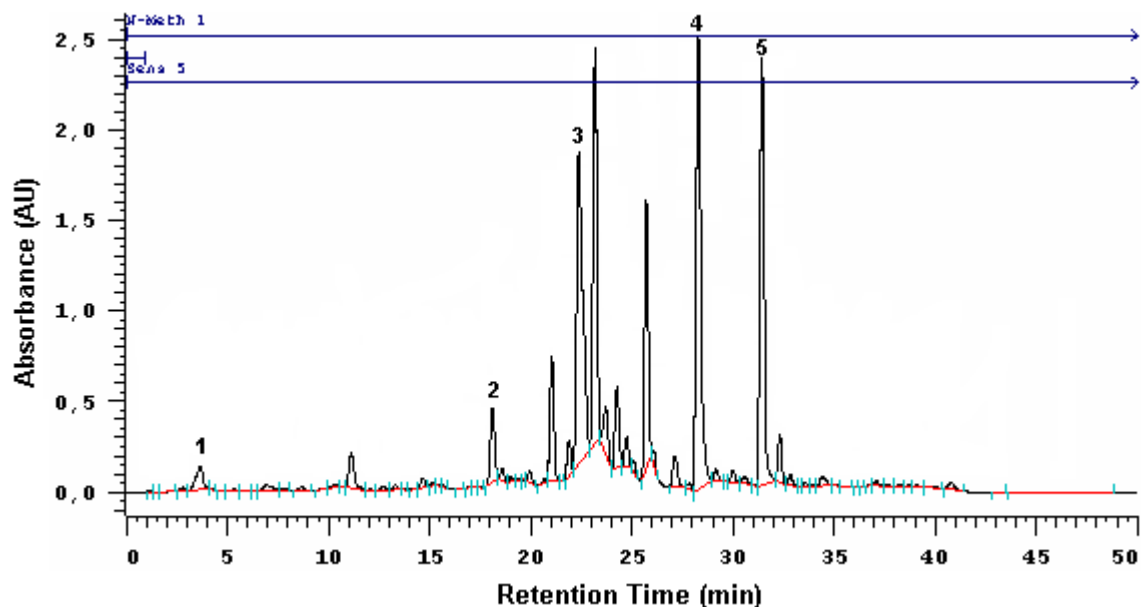


Figura 10.12 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50°C, 300 bar e com 5% de co-solvente etanol.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

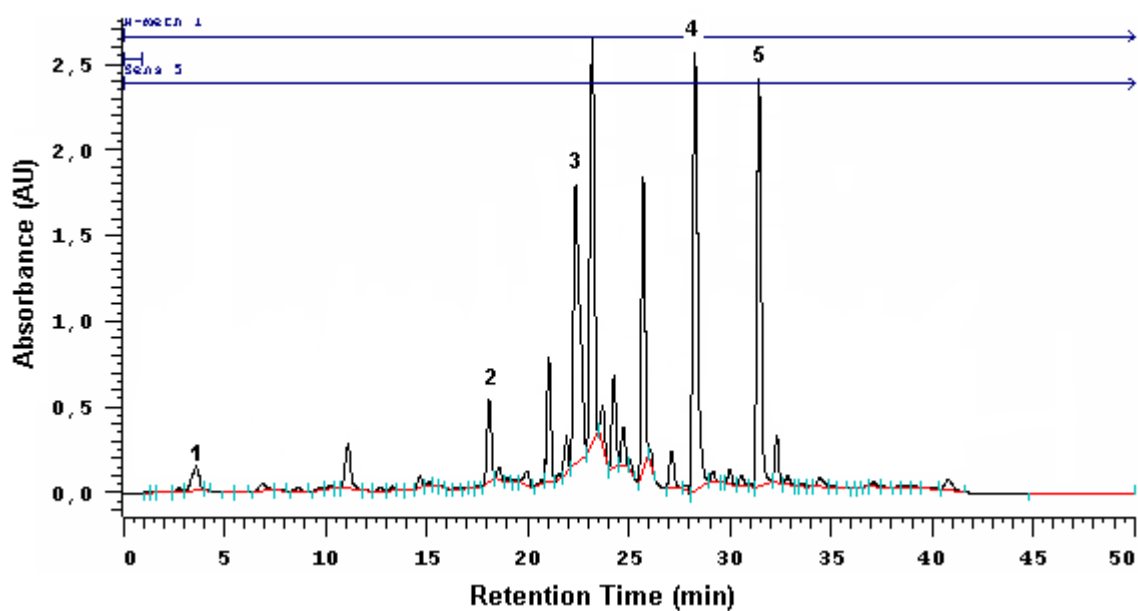


Figura 10.13 Cromatograma do extrato da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50°C, 300 bar e com 5% de co-solvente acetato de etila.

(1= ácido p-cumárico, 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 3= canferide, 4= Artepillin C e 5= 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)

11 ANEXO D – ANÁLISES DO ÓLEO ESSENCIAL

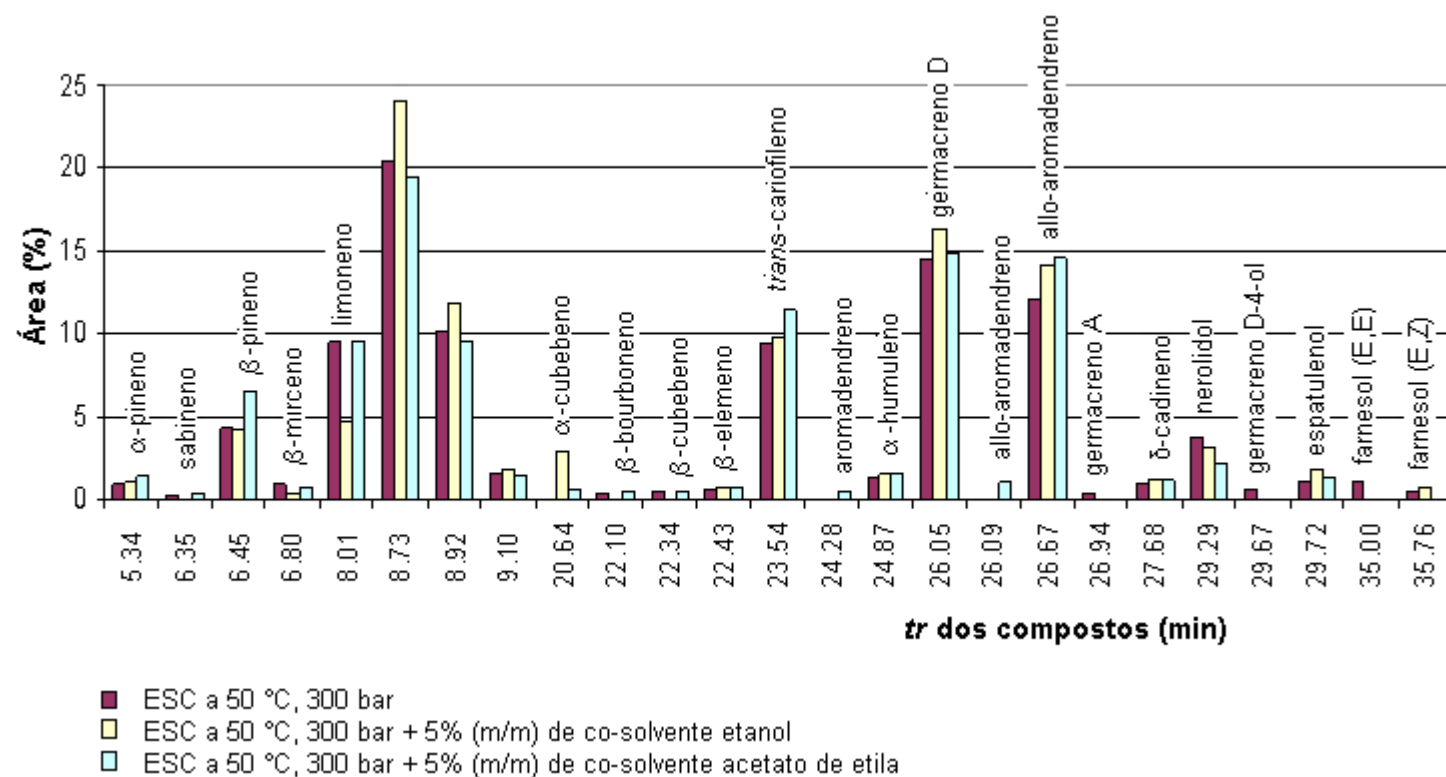


Figura 11.1 Composição química da fração + voláteis do óleo essencial de *B. dracunculifolia* obtido por ESC.

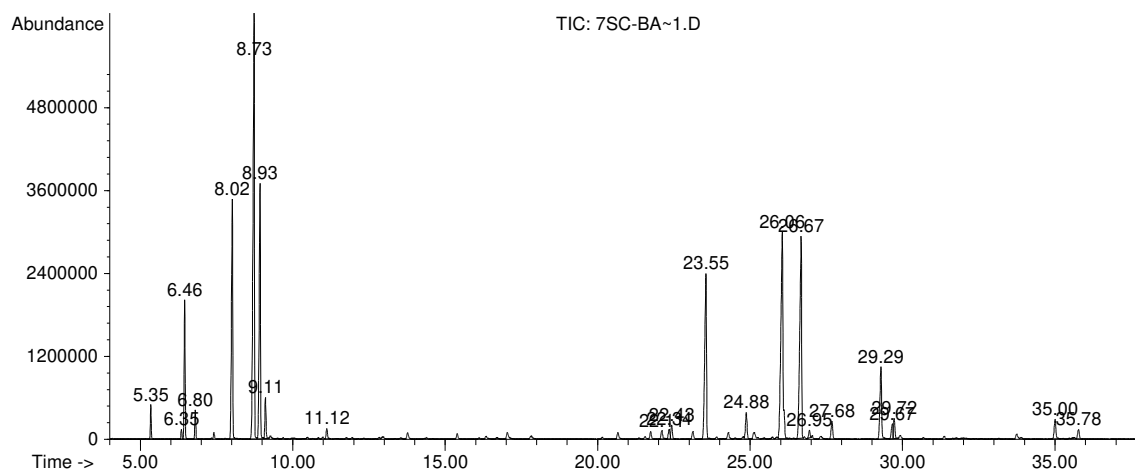


Figura 11.2 Cromatograma da fração + voláteis do óleo essencial da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50 °C, 300 bar.

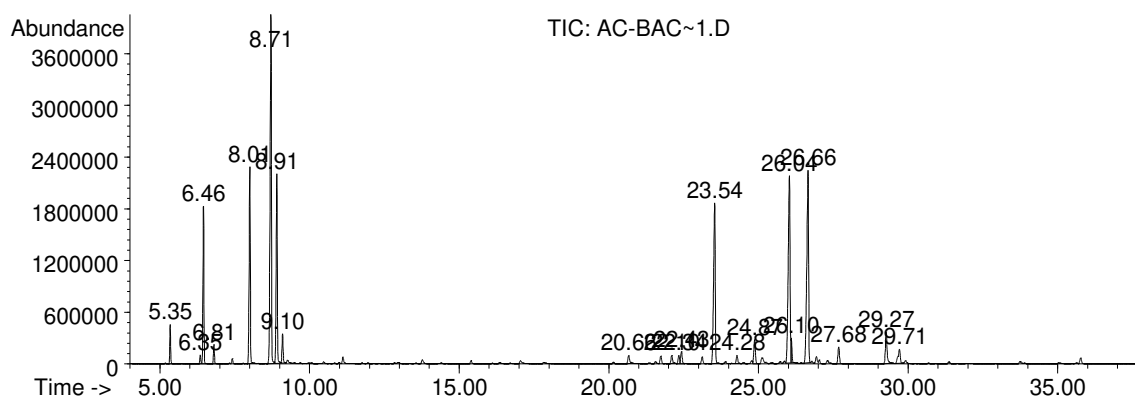


Figura 11.3 Cromatograma da fração + voláteis do óleo essencial da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50 °C, 300 bar e 5% (m/m) de acetato de etila.

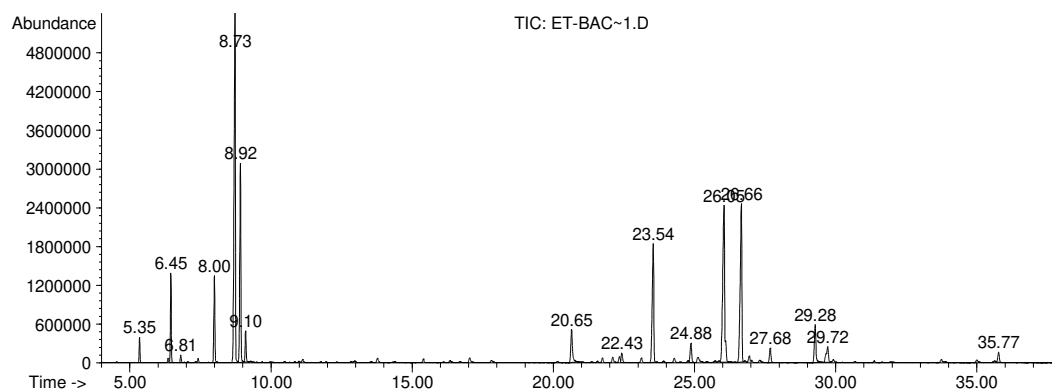


Figura 11.4 Cromatograma da fração + voláteis do óleo essencial da *B. dracunculifolia* obtido por ESC a 50 °C, 300 bar e 5% (m/m) de etan ol.

12 ANEXO E – CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Conc. ($\mu\text{g/ mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3129	100,00
2	0,3016	96,39
4	0,2775	88,69
6	0,2657	84,92
10	0,2622	83,80
12	0,2338	74,72
14	0,2238	71,52
18	0,2084	66,60
20	0,1966	62,83

Dados da reta:

$a = -1,8131$; $b = 98,377$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 26,68 \mu\text{g/ mL}$

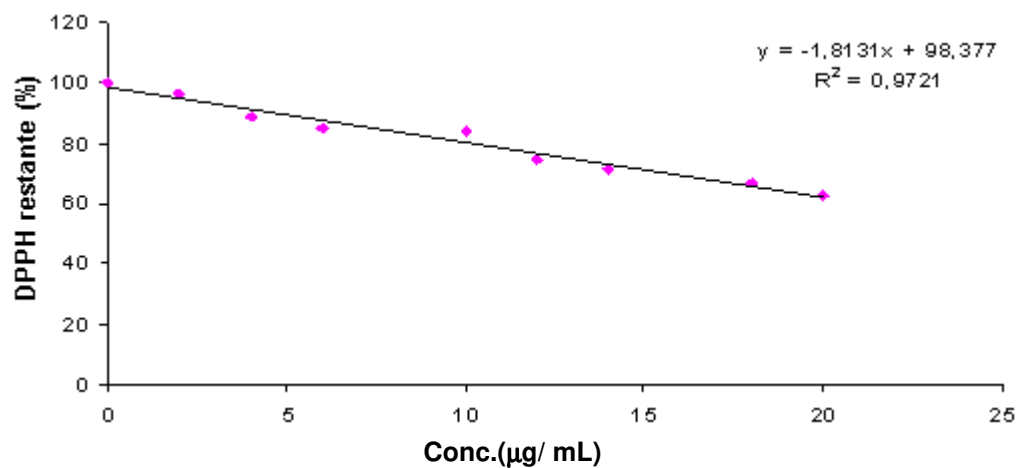


Figura 12.1 AA do extrato etanólico da *B. dracunculifolia*.

Conc. ($\mu\text{g/ mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,2736	100,00
2	0,269	98,32
4	0,2664	97,37
6	0,2455	89,73
10	0,2409	88,05
12	0,2315	84,61
14	0,2267	82,86
18	0,2252	82,31
20	0,2235	81,69

Dados da reta:

$a = -0,9942$; $b = 98,937$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 49,22 \mu\text{g/ mL}$

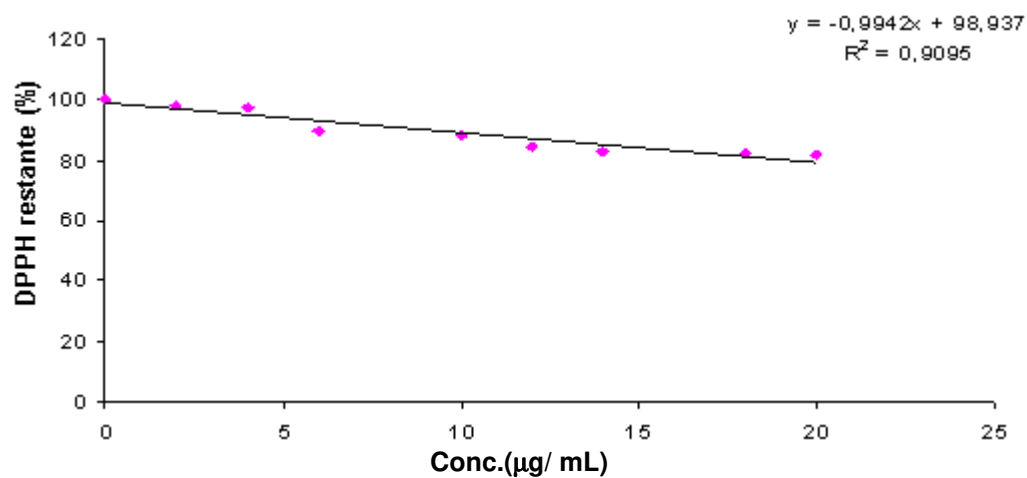


Figura 12.2 AA do extrato metanólico *B. dracunculifolia*.

Conc. (µg/ mL)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3241	100,00
2	0,305	94,11
4	0,2956	91,21
6	0,2897	89,39
10	0,2732	84,29
12	0,2687	82,91
14	0,2609	80,50
18	0,2415	74,51
20	0,2424	74,79

Dados da reta:

$a = -1,2124$; $b = 97,331$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = ED_{50} = 39,04 \mu\text{g/mL}$

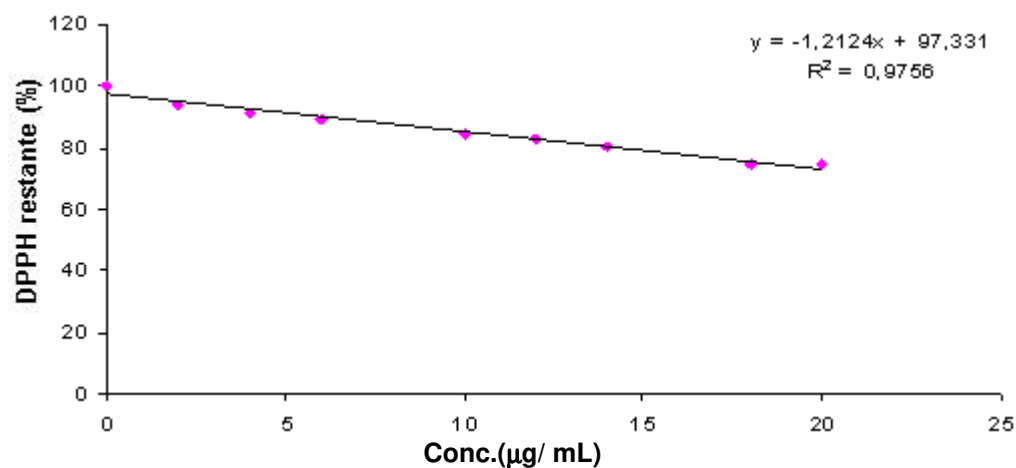


Figura 12.3 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 40°C e 200 bar.

Conc. (µg/ mL)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3059	100,00
2	0,3001	98,10
4	0,2874	93,95
6	0,2836	92,71
10	0,2667	87,19
12	0,2579	84,31
14	0,2557	83,59
18	0,2519	82,35
20	0,2394	78,26

Dados da reta:

$a = -1,0528$; $b = 99,000$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = ED_{50} = 46,54 \mu\text{g/mL}$

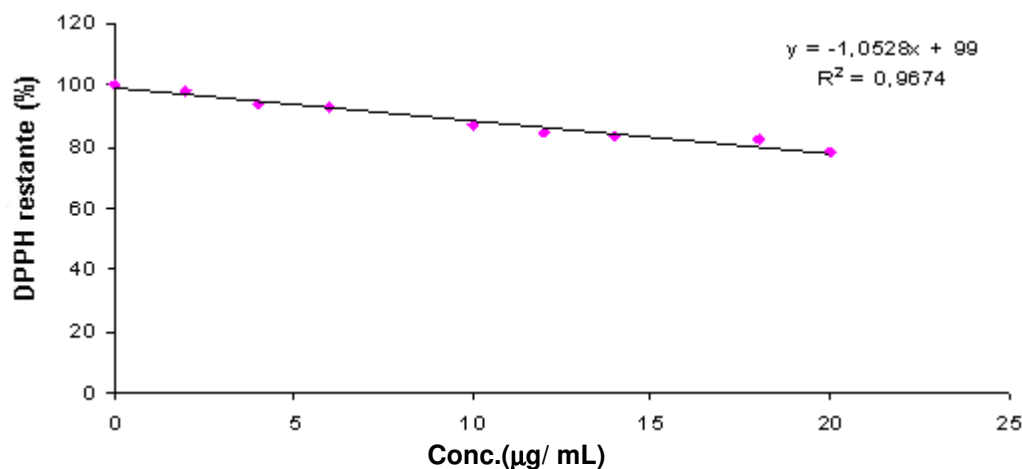


Figura 12.4 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 40°C e 300 bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3103	100,00
2	0,2896	93,33
4	0,2901	93,49
6	0,2803	90,33
10	0,2679	86,34
12	0,2608	84,05
14	0,2578	83,08
18	0,248	79,92
20	0,2413	77,76

Dados da reta:

$a = -1,0073$; $b = 97,214$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 46,87 \mu\text{g}/\text{mL}$

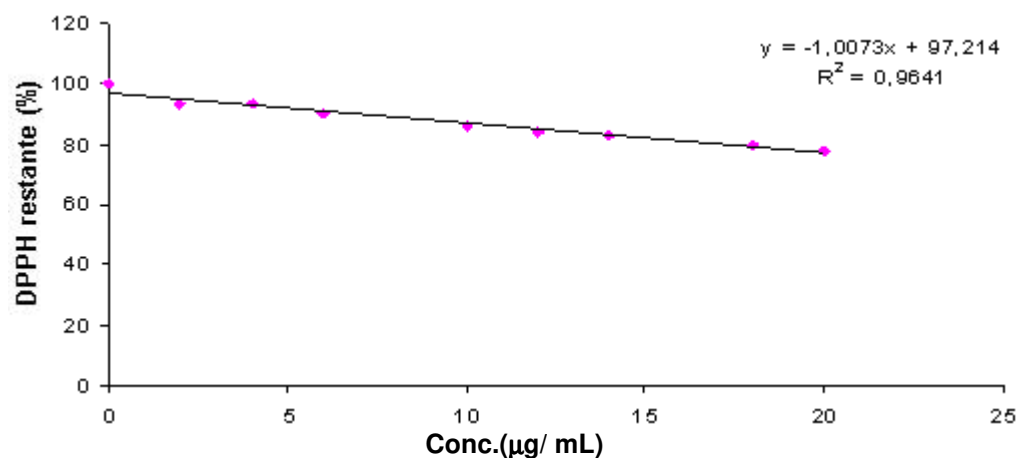


Figura 12.5 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 40°C e 400 bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,316	100,00
2	0,3096	97,97
4	0,2947	93,26
6	0,2856	90,38
10	0,2776	87,85
12	0,267	84,49
14	0,2594	82,09
18	0,2495	78,96
20	0,2464	77,97

Dados da reta:

$a = -1,1142$; $b = 98,755$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 43,76 \mu\text{g}/\text{mL}$

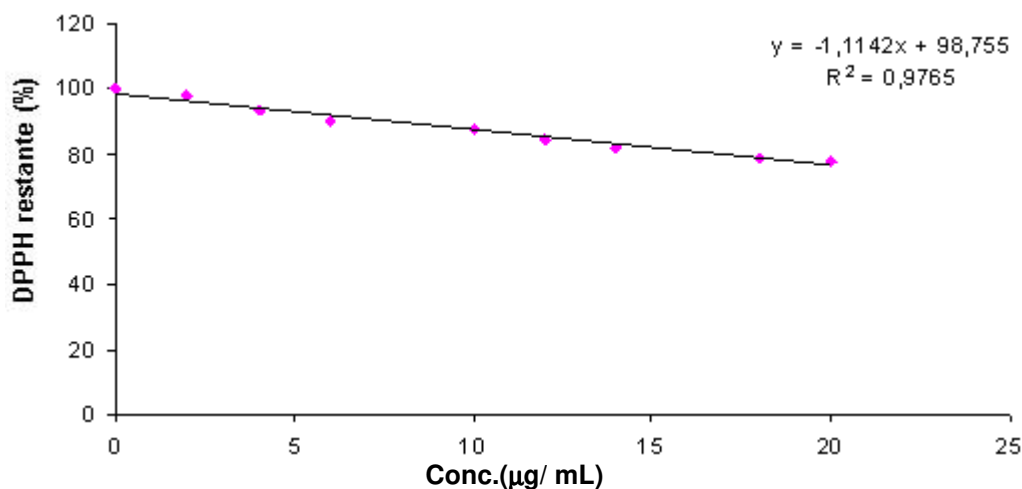


Figura 12.6 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 50°C e 200 bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3148	100,00
2	0,3137	99,65
4	0,2885	91,65
6	0,2825	89,74
10	0,2776	88,18
12	0,2666	84,69
14	0,2721	86,44
18	0,2483	78,88
20	0,249	79,10

Dados da reta:

$a = -1,0399$; $b = 98,639$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 46,77 \mu\text{g}/\text{mL}$

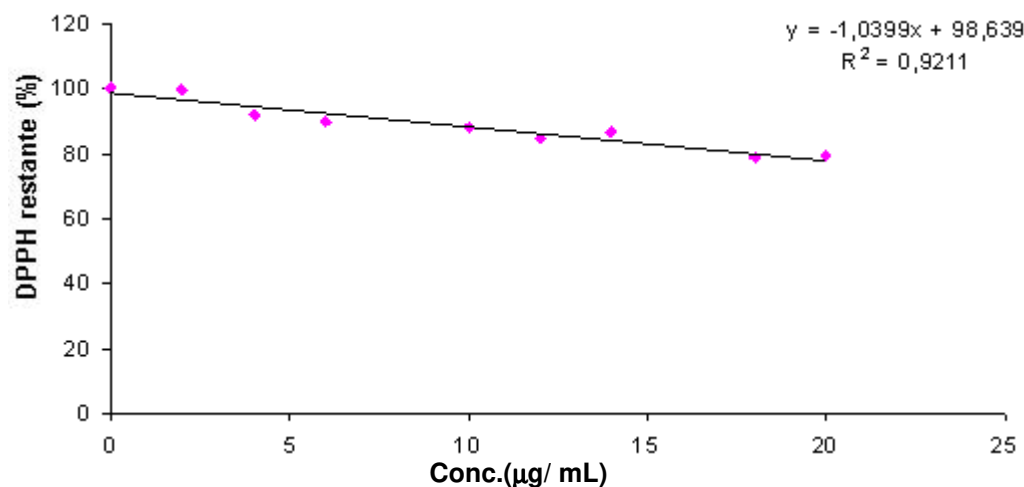


Figura 12.7 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 50°C e 300 bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3143	100,00
2	0,2997	95,35
4	0,2846	90,55
6	0,2676	85,14
10	0,2553	81,23
12	0,2536	80,69
14	0,2467	78,49
18	0,2321	73,85
20	0,2278	72,48

Dados da reta:

$a = -1,3033$; $b = 96,652$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 35,80 \mu\text{g}/\text{mL}$

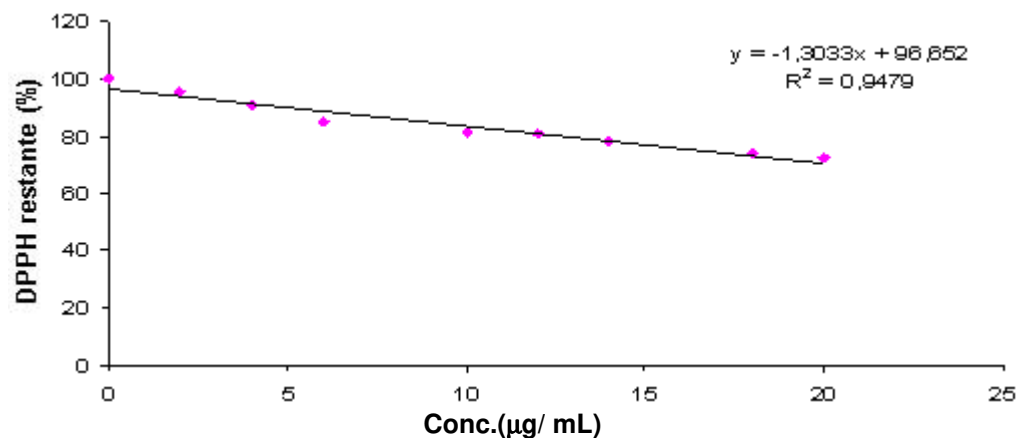


Figura 12.8 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 50°C e 400 bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3157	100,00
2	0,3053	96,71
4	0,2944	93,25
6	0,2871	90,94
10	0,2618	82,93
12	0,2697	85,43
14	0,2602	82,42
18	0,2459	77,89
20	0,2423	76,75

Dados da reta:

$a = -1,1458$; $b = 98,317$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 42,17 \mu\text{g}/\text{mL}$

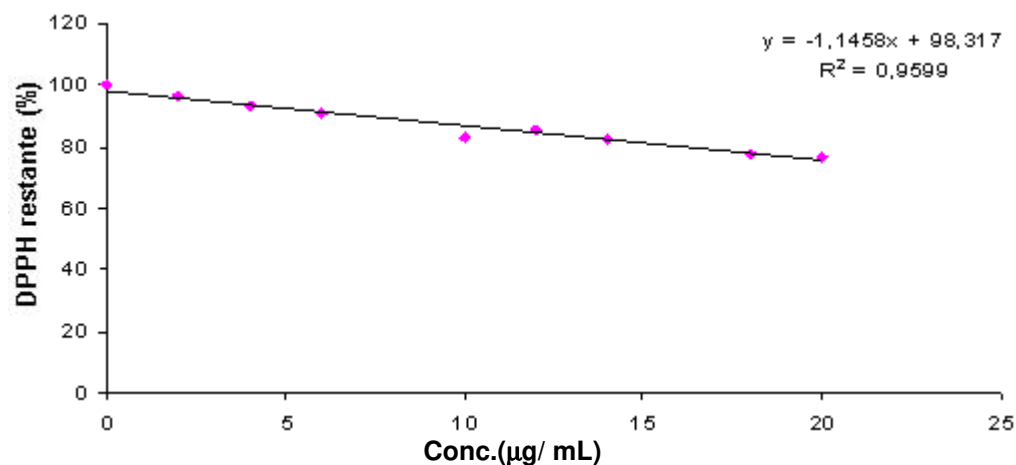


Figura 12.9 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 60°C e 200bar.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,307	100,00
2	0,2918	95,05
4	0,2768	90,16
6	0,2745	89,41
10	0,2623	85,44
12	0,2535	82,57
14	0,2444	79,61
18	0,2354	76,68
20	0,228	74,27

Dados da reta:

$a = -1,1946$; $b = 97,325$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 39,62 \mu\text{g}/\text{mL}$

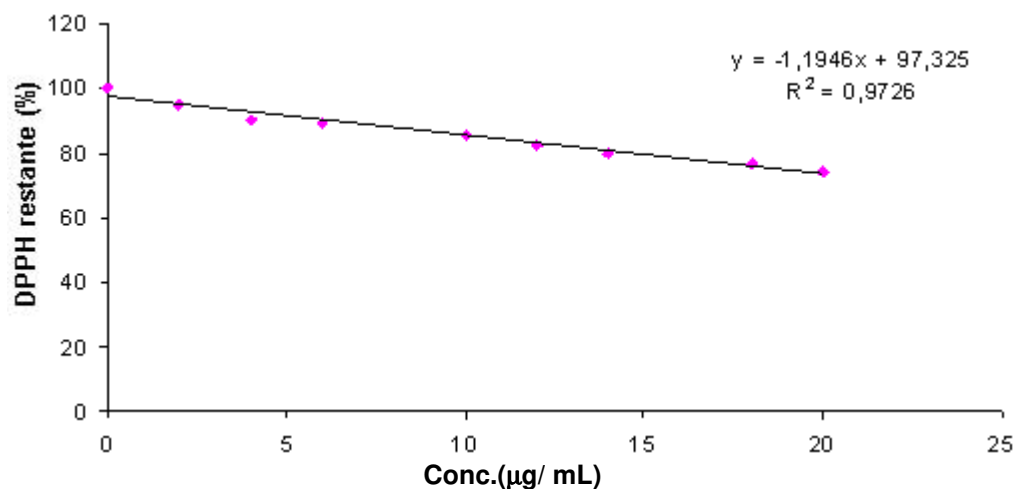


Figura 12.10 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 60°C e 300 bar.

Conc. ($\mu\text{g/ mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3205	100,00
2	0,3119	97,32
4	0,3074	95,91
6	0,2916	90,98
10	0,2688	83,87
12	0,2662	83,06
14	0,2529	78,91
18	0,2437	76,04
20	0,2386	74,45

Dados da reta:

$a = -1,3473$; $b = 99,600$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 36,81 \mu\text{g/ mL}$

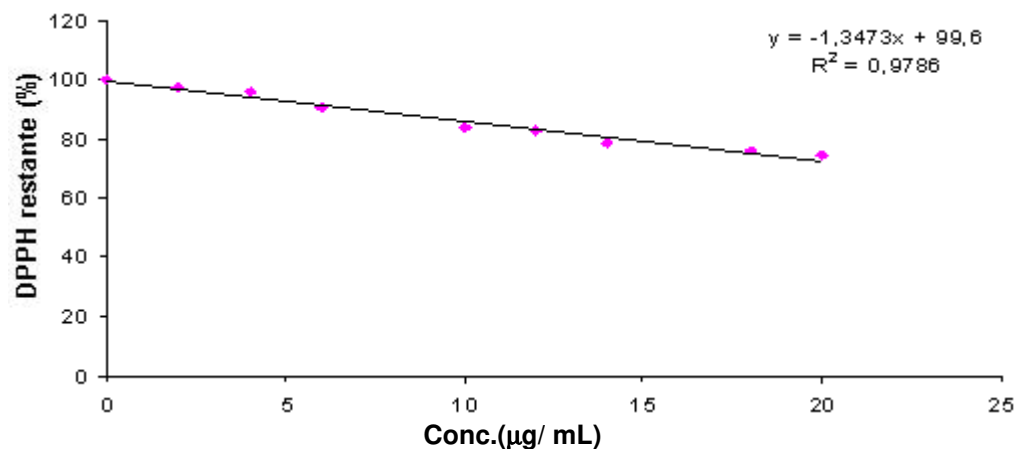


Figura 12.11 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 60°C e 400bar.

Conc. ($\mu\text{g/ mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3024	100,00
2	0,2896	95,77
4	0,2698	89,22
6	0,251	83,00
10	0,2338	77,31
12	0,2136	70,63
14	0,2134	70,57
18	0,187	61,84
20	0,182	60,19

Dados da reta:

$a = -2,0051$; $b = 97,885$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 23,88 \mu\text{g/ mL}$

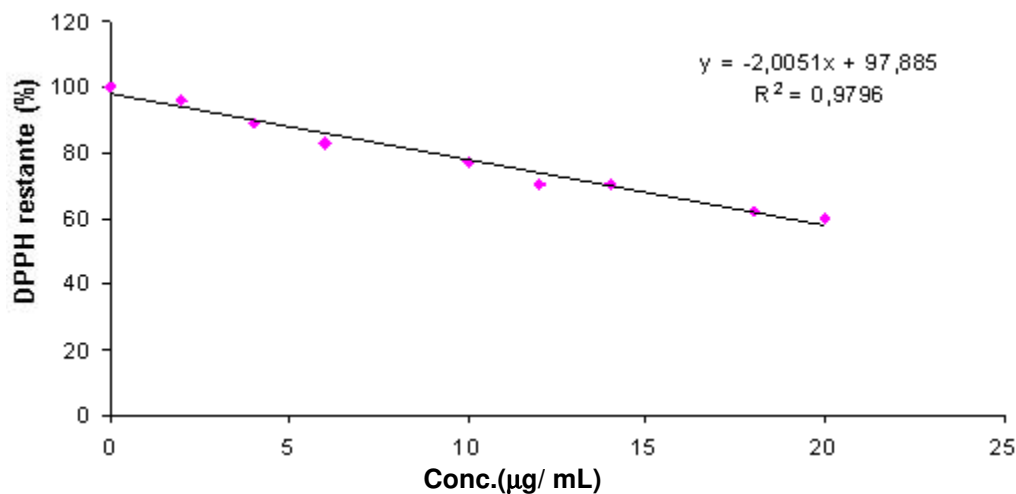


Figura 12.12 AA do extrato *B. dracunculifolia* obtido a 50°C e 300 bar + 5% (m/m) de etanol.

Conc. ($\mu\text{g/ mL}$)	Abs. (%)	DPPH restante (%)
0	0,3122	100,00
2	0,2906	93,08
4	0,2915	93,37
6	0,2833	90,74
10	0,256	82,00
12	0,2531	81,07
14	0,2452	78,54
18	0,2401	76,91
20	0,2334	74,76

Dados da reta:

$a = -1,2211$; $b = 97,276$; $y = 50$ (valor fixo)

$X = (50 - b)/a \rightarrow X = \text{ED}_{50} = 38,72 \mu\text{g/ mL}$

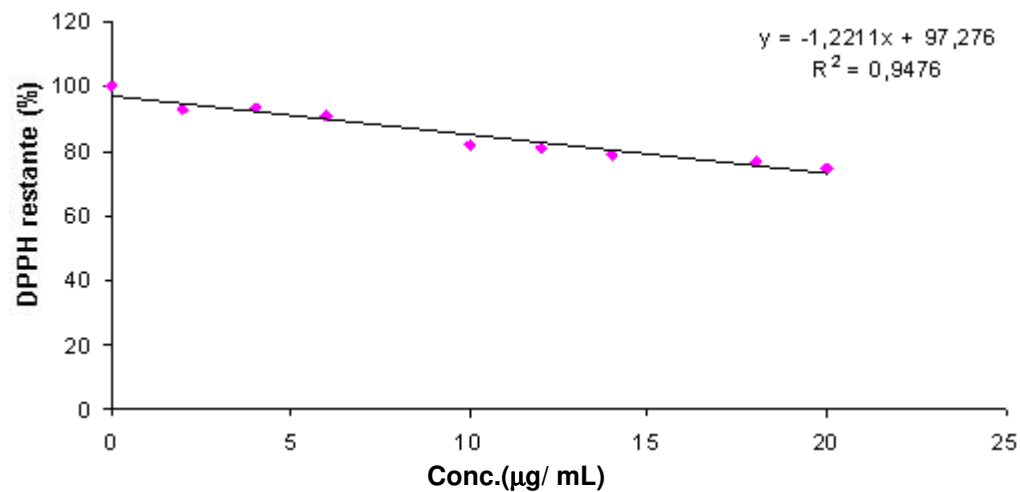


Figura 12.13 AA do extrato *B.dracunculifolia* obtido a 50°C e 300 bar + 5% (m/m) de acetato de etila.