



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

**EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE PLANTAS AROMÁTICAS E
MEDICINAIS (Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), Quebra
pedra (*Phyllanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia
paniculata*)): DADOS EXPERIMENTAIS, COMPOSIÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Danielle Cotta de Mello Nunes da Silva

Engenheiro de Alimentos (FURG, 2001)

Mestre em Engenharia de Alimentos (UFSC, 2004)

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Angela de Almeida Meireles

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

Campinas – São Paulo

2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38e Silva, Danielle Cotta de Mello Nunes da
Extração supercrítica de plantas aromáticas e medicinais (Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)): dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica / Danielle Cotta de Mello Nunes da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. *Aloysia gratissima*. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antiinflamatória. 4. Extração supercrítica. 5. Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*). 6. *Phyllanthus amarus*. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(fea/cars)

Título em inglês: Supercritical extraction of aromatic and medicinal plants (Brazilian lavender (*Aloysia gratissima*), Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) and Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*)): experimental data, composition and evaluation of activity biological

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Aloysia gratissima*, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Supercritical extraction, Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*), Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*)

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles

Lucio Cardozo Filho

Silvânia Regina Mendes Moreschi

Veridiana Vera de Rosso

Mário Roberto Maróstica Junior

Data de defesa: 23/06/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
DEA – FEA – UNICAMP
Orientadora

Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho
DEQ – UEM
Membro

Profa. Dra. Silvânia Regina Mendes Moreschi
UTFPR
Membro

Profa. Dra. Veridiana Vera De Rosso
DCA – FEA – UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral
DEA – FEA – UNICAMP
Membro

Dr. Mário Roberto Maróstica Jr
CENTROFLORA

A minha querida mãe Neuza, por ser a minha sólida base, exemplo de vida, perseverança e amor.

Ao meu querido companheiro Claudio, por sua dedicação, por sua calma, por sua alegria contagiante e por me fazer muito feliz.

Com muito carinho, dedico este trabalho.

Agradecimentos

A Deus que torna tudo possível.

À Profa Maria Angela de Almeida Meireles, que me deu a oportunidade de realizar este trabalho e de desenvolver parte deste no exterior, o que me proporcionou uma enorme aprendizagem em termos científicos e pessoais. Agradeço pela confiança, pela orientação, disponibilidade, sabedoria, e pelas muitas outras qualidades que fazem de você uma profissional exemplar. A você Maria Angela todo meu respeito e admiração. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realizar meu estudo de pós-graduação.

Je remercie à Dra. Chantal Menut par l'orientation, à patience, à amitié et à immense collaboration pour la réalisation de partie de mon travail développé dans ENSCM à Montpellier. Madame, merci beaucoup par tout!

Aos Membros da banca examinadora: Prof. Dr. Lucio Cardoso Filho, Profa. Dra. Silvânia Regina Mendes Moreschi, Profa. Dra. Veridiana Vera De Rosso, Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral, Dr. Mário Roberto Maróstica Jr pelas valiosas contribuições.

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento deste trabalho no Brasil e a na França.

Ao Pierre Brat, pela supervisão do trabalho realizado no CIRAD-FLHOR, em Montpellier.

Ao Pedro Melillo de Magalhães pelo fornecimento das matérias-primas utilizadas neste trabalho.

À Beatriz Benedetti, aluna de Iniciação Científica, que pela disposição em trabalhar e desenvolver parte deste trabalho.

Ao técnico do Lasefi Ariovaldo, pela colaboração, disponibilidade e auxílio técnico demonstrado ao longo destes anos.

À Juliana Prado, pela contribuição na revisão da versão final. Muito Obrigada!

A meu irmão Fabiano, a minha cunhada Maria Amanda e a pequena Maria Antonia pelo apoio e compreensão.

As colegas Patrícia, Thais e Juliana por estes 4 anos de conhecimentos compartilhados, incentivo e amizade.

Aos colegas do Lasefi que tornaram estes 4 anos de convivência muito agradáveis.

A Marie Rose Abdu e aos demais colegas de laboratório da ENSCM pela colaboração, paciência e amizade construída durante os seis meses em que estive em Montpellier.

Aos queridos amigos Leila, Lucielen, Marcelo (Caiçara), Otávio, Tatiane, Veridiana pela sua amizade, companheirismo, parceria de tantos anos de vida e história acadêmica.

A querida amiga Marcela, pela amizade conquistada nestes dois anos de convivência, pelas conversas, conselhos, jantas, dietas compartilhadas e por fazer de nossa casa um lugar aconchegante e sempre aberto para receber os amigos.

Aos colegas de pós-graduação da FEA pelos momentos de descontração.

Aos funcionários da FEA.

À todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

‘No final, vamos preservar o que apreciamos, e vamos apreciar só o que entendemos e vamos entender só o que nos foi ensinado.’

Baba Dioum

Índice Geral

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos	1
1.1 Objetivos	5
1.1.2 Objetivo Geral	5
1.1.3 Objetivos Específicos	5
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	7
2.1 Fundamentos em Extração Supercrítica (SFE)	7
2.1.1 Fluido supercrítico	7
2.1.2 Extração Supercrítica (SFE)	11
2.1.7 Aplicações da extração supercrítica	15
2.1.8 Aspectos econômicos e Perspectivas futuras da utilização de Fluidos Supercríticos (FSC) na indústria	16
2.1.9 Estudos sobre extração supercrítica realizados no Lasefi	18
2.1.10 Solubilidade	20
2.1.11 Rendimento Global de Extração	24
2.1.12 Mecanismo de transferência de Massa– Curvas Globais de extração (OEC) e Modelagem	26
2.3 Generalidades sobre Antioxidantes	28
2.3.1 Alguns Métodos para extração de compostos antioxidantes ou substâncias bioativas em vegetais	34
2.3.2 Métodos de Avaliação da Atividade antioxidante	38
2.4 Atividade antiinflamatória	41
2.5 Plantas	43
2.5.1 Lavanda brasileira (<i>Aloysia gratissima</i>)	44
2.5.2 Quebra pedra (<i>Phyllanthus amarus</i>)	47

2.5.3 Ginseng brasileiro (<i>Pfaffia paniculata</i>)	50
Capítulo 3 – Material e Métodos.....	54
3.1 Seleção e preparo das matérias-primas	60
3.2 Caracterização das matérias-primas	61
3.2.1 Umidade	61
3.2.2. Diâmetro médio das Partículas	62
3.2.3 Densidade Real e Aparente	62
3.2.3 Porosidade	62
3.3 Determinação da densidade do solvente	63
3.4. Métodos de Extração	63
3.4.1 Extração supercrítica (SFE).....	63
3.4.2 Extração a baixa pressão com solvente orgânico (LPSE).....	69
3.4.3 Hidrodestilação	70
3.4.4 Estudos do sistema matéria-prima + CO ₂	71
3.5 Análise química	72
3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	73
3.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	75
3.5.3 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)	76
3.6 Avaliação de atividades biológicas de extratos	77
3.6.1 Atividade antioxidante por meio da reação acoplada do β -caroteno e ácido linolênico (Teste Colorimétrico)	77
3.6.2 Atividade antioxidante – Método do DPPH.....	78
3.6.3 Atividade antioxidante – Método da capacidade de absorver radicais oxigênio - ORAC	81
3.6.4 Atividade antiinflamatória.....	85
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	88
4.1 Lavanda brasileira.....	89
4.1.1 Caracterização da Matéria-prima	89

4.1.2 Rendimento Global de Extração	89
4.1.3 Análises Químicas	93
4.1.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos SFE e óleo essencial de lavanda brasileira	99
4.2 Quebra pedra	107
4.2.1 Caracterização da Matéria-prima	107
4.2.2 Rendimento Global de Extração	107
4.2.3 Análises Químicas	111
4.2.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos de quebra pedra	117
4.3 <i>Ginseng brasileiro</i>	124
4.3.1 Caracterização da Matéria-prima	124
4.3.2 Rendimento Global de Extração	124
4.3.3 Cinética de extração.....	129
4.3.4 Análises Químicas	132
4.3.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos de ginseng brasileiro	148
Capítulo 5 – Conclusões	153
5.1 Lavanda brasileira.....	153
5.2 Quebra pedra	155
5.3 <i>Ginseng brasileiro</i>	157
5.4 Conclusão geral.....	160
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas.....	161
Capítulo 7 – Anexos.....	192
7.1 Cromatogramas lavanda brasileira	192
7.1.1 Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial e no extrato SFE de lavanda brasileira (Adams, 2001).	193
7.2 Atividade antiinflamatória	195
7.2.2 Resultados da atividade antiinflamatória do extrato SFE de ginseng brasileiro, do óleo essencial e do extrato SFE de lavanda brasileira e do extrato SFE de quebra pedra.	199

7.3 Atividade antioxidante pelo método DPPH	201
7.4 Resultados da atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro pelo método da reação acoplada do β -caroteno/acido linolênico.....	203
7.6 As Curvas padrão do estigmasterol e do β -sitosterol são apresentadas na Figura 7.613(a) e 7.13(b).....	212

Índice de Figuras

Figura 2.1: Diagrama de equilíbrio para substância pura (adaptado de Sandler, 1994).	9
Figura 2.2: Diagrama de fases PT adaptado de Sandler, 1994).	10
Figura 2.3: Estruturas químicas de terpenos extraídos por meio de SFE.	11
Figura 2.4: Isoterma de rendimento global para o sistema funcho + CO ₂ utilizando a semente (Moura <i>et al</i> , 2005).	25
Figura 2.5: Curva de Extração da carqueja (adaptada de Silva, 2004).	27
Figura 2.6: Mecanismo de reação da oxidação lipídica (Ramalho e Jorge, 2006).	30
Figura 2.7: Antioxidantes sintéticos.	31
Figura 2.8: Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação (adaptado de Cotran <i>et al</i> , 2000).	42
Figura 2.9: Lavanda brasileira (<i>Aloysia gratissima</i> (http://www.wildflower.org/plants)).	45
Figura 2.10: Quebra pedra (<i>Phyllanthus amarus</i>) cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP.	48
Figura 2.11: Ginseng brasileiro (<i>Pfaffia paniculata</i>) (http://www.rain-tree.com/Plant-Images/suma-pic.htm).	51
Figura 2.12: Estrutura química do ácido pffáfico (Rates e Gosmann, 2002).	52
Figura 3.1: Fluxograma esquemático da metodologia de trabalho.	56
Figura 3.2: Fluxograma do estudo realizado com a lavanda brasileira.	57
Figura 3.3: Fluxograma do estudo realizado com a quebra pedra.	58
Figura 3.4: Fluxograma do estudo realizado com o ginseng brasileiro.	59
Figura 3.5: Unidade de extração Spe-ed SFE (Applied Separations, Allentown, EUA).	64
Figura 3.6: Esquema da unidade de extração Spe-ed SFE (Applied Separations, Allentown, EUA) (Vasconcellos, 2007).	64
Figura 3.7: Unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH.	67
Figura 3.8: Diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH (Adaptado de Zetzel <i>et al</i> , 2003).	68
Figura 3.9: Unidade experimental de Hidrodestilação (Aparelho Schilcher)	71
Figura 3.10: Ilustração do procedimento de preparo da solução de DPPH.	80
Figura 3.11: Ilustração do procedimento de preparo das soluções de Rutina.	80

Figura 3.12: Ilustração do procedimento de preparo das soluções de extrato.....	80
Figura 3.13: Ilustração do procedimento de preparo das cubetas.	81
Figura 3.14: Ilustração do procedimento de preparo das cubetas.	83
Figura 3.15: Esquema da análise ORAC.	84
Figura 4.1(a): Isotermas de rendimento global do sistema lavanda brasileira + CO ₂	91
Figura 4.1(b): Isotermas de rendimento global do sistema lavanda brasileira + CO ₂	91
Figura 4.2: Compostos presentes no óleo volátil e no extrato supercrítico de lavanda brasileira.	96
Figura 4.3.: Estrutura química do DPPH e dos compostos de referência BHT e Rutina.	102
Figura 4.4: Estrutura química dos compostos majoritários presentes no óleo essencial e no extrato SFE de lavanda brasileira.	103
Figura 4.5: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de lavanda brasileira analisados pela reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico.	104
.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 4.6: Reação acoplada β -caroteno /ácido linolênico (absorbância <i>versus</i> tempo de reação) dos extratos de lavanda brasileira.	106
Figura 4.7(a): Isotermas de Rendimento Global do Sistema quebra pedra + CO ₂	109
Figura 4.7(b): Isotermas de Rendimento Global do Sistema quebra pedra + CO ₂	109
Figura 4.8: CCD para detecção de óleo volátil presente nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).	112
Figura 4.9: CCD para detecção de pigmentos presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).	113
Figura 4.10: CCD para detecção de flavonóides presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).	114
Figura 4.11: CCD para detecção de saponinas presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).	116

Figura 4.12: CCD para detecção de triterpenos presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).	117
Figura 4.13: Critério estrutural de um flavonóide que não apresenta atividade antioxidante.	119
Figura 4.14: Critério estrutural de um flavonóide com alta atividade antioxidante	119
Figura 4.15: Reação acoplada β -caroteno /ácido linolênico (absorbância <i>versus</i> tempo de reação) dos extratos de quebra pedra.	120
Figura 4.16: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de quebra pedra analisados pela reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico.	122
Figura 4.17: Extratos LPSE do ginseng brasileiro.	126
Figura 4.18(a): Isotermas de Rendimento Global do sistema ginseng brasileiro + CO ₂	128
Figura 4.18(b): Isotermas de Rendimento Global do sistema ginseng brasileiro + CO ₂	128
Figura 4.19: Curva de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.	130
Figura 4.20: Curva de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, 10% de etanol, $2,7 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.	132
Figura 4.21: Placas cromatográficas em camada delgada (CCD) de detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercrítico (1) 30 °C/300 bar; (2) 40 °C/100 bar), extrato hexânico (3), extrato etanólico (4), extrato metanólico (5) e SFE + co-solvente (6) de ginseng brasileiro.	133
Figura 4.22: Placa cromatográfica em camada delgada (CCD) de detecção de saponinas presentes no extrato supercrítico (SFE) de ginseng brasileiro.	134
Figura 4.23(a): CCD para o fracionamento do extrato SFE + co-solvente de ginseng brasileiro.	135
Figura 4.23(b): CCD do extrato SFE + co-solvente de ginseng brasileiro.	135
Figura 4.24: CCD para de detecção de óleos voláteis presentes no extrato (1) SFE (40 °C/150 bar) de ginseng brasileiro e comparação com os padrões comerciais (2) β -sitosterol e (3) estigmasterol em termos de coloração das bandas e Rfs.	136
Figura 4.25: CCD para detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercrítico (40 °C/150 bar), extrato hexânico, etanólico, metanólico de folhas e de raízes de <i>ginseng brasileiro</i>	137
Figura 4.26: CCD para detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercríticos de folhas de ginseng brasileiro nas seguintes condições de operação: 1 e 11 (30°C/100 bar), 2 e 12 (30	

°C/150 bar), 3 e 13 (30 °C/200 bar), 4 e 14(30 °C/250 bar), 5 e 15(30 °C/300 bar), 6 e 16(40 °C/100 bar), 7 e 17(40 °C/150 bar), 8 e 18(40 °C/200 bar), 9 e 19(40 °C/250 bar), 10(40 °C/300 bar), os extratos referentes à codificação de 11 a 19 são respectivamente a fração de voláteis retidos na coluna de adsorção.....	138
Figura 4.27: CCD para detecção de flavonóides presentes nos extratos supercrítico (40 °C/150 bar), extrato etanólico e metanólico de folhas e de raízes de ginseng brasileiro.	139
Figura 4.28: Composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro (em % área) obtidos na temperatura de 30 °C e nas pressões de 1-(100 bar); 2-(150 bar); 3-(200 bar); 3-(250 bar) e 4-(300 bar).....	141
Figura 4.29: Composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro (em % área) obtidos na temperatura de 40 °C e nas pressões de 1-(100 bar); 2-(150 bar); 3-(200 bar); 3-(250 bar) e 4-(300 bar).....	141
Figura 4.30(a): Compostos identificados no extrato de ginseng brasileiro em função do tempo de extração.	146
Figura 4.30(b): Compostos majoritário identificados no extrato de ginseng brasileiro em função do tempo de extração.	146
Figura 4.31:Estrutura química do fitol (a) e do ácido fitânico (b).	147
Figura 4.32: Reação acoplada β -caroteno /ácido linolênico (absorbância <i>versus</i> tempo de reação) dos extratos de ginseng brasileiro.	149
Figura 4.33: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de ginseng brasileiro analisados pela reação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico.	151
Figura 7.1.: Cromatogramas do óleo essencial de lavanda brasileira obtidos com a utilização da coluna polar DB-1 e da coluna apolar Carbowax.	192
Figura 7.2.: Solubilidade do óleo volátil de lavanda brasileira nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.	195
Figura 7.3: Solubilidade do extrato SFE de lavanda brasileira nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.	196
Figura 7.4: Solubilidade do extrato SFE de quebra pedra nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.	197
Figura 7.5: Solubilidade do extrato SFE de ginseng brasileiro nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.	198

Figura 7.6: Cinética da lipoxigenase de soja em relação ao composto de referência NDGA.	198
Figura 7.7: Atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato SFE de lavanda brasileira	201
Figura 7.8: Atividade antioxidante do extrato SFE de quebra pedra.	201
Figura 7.9: Atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato SFE de ginseng brasileiro. ...	202
Figura 7.10: Gráfico da comparação entre as atividades antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro.	202
7.5. Resultados referentes curva de SFE do ginseng brasileiro	205
Figura 7.11(a): Curvas de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.	206
Figura 7.11(b): Curvas de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 5 gramas.	206
Figura 7.13(a): Resultados das curvas padrão do β -sitosterol.	212
Figura 7.13(b): Resultados das curvas padrão do estigmasterol.	212

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Propriedades críticas de espécie puras selecionadas.	8
Tabela 2.2: Comparação entre as propriedades dos gases, líquidos e fluidos supercríticos.	10
Tabela 2.3: Vantagens e desvantagens da SFE	13
Tabela 2.4: Vantagens e desvantagens do uso de dióxido de carbono com SFC.....	14
Tabela 2.5 : Antioxidantes naturais extraídos com CO ₂ supercrítico.	37
Tabela 3.1: Fases móveis e reveladores utilizados nas análises de cromatografia em camada delgada.	74
Tabela 4.1: Tabela de organização dos resultados	88
Tabela 4.2: Rendimento global de extrato de lavanda brasileira obtido por SFE e por LPSE.	90
Tabela 4.3: Porcentagem em área dos compostos voláteis presentes no óleo essencial e no extrato supercrítico de lavanda brasileira.....	94
Tabela 4.4: Atividade antioxidante do óleo essencial, do extrato SFE de lavanda brasileira e do composto de referência (Rutina), ..	101
Tabela 4.5: Rendimento global de extração de quebra pedra obtido por SFE e por (LPSE).	107
Tabela 4.6: Atividade antioxidante dos compostos de referência (Rutina e BHT) e do extrato SFE de Quebra pedra.	119
Tabela 4.7: Rendimento global de extrato de ginseng brasileiro obtido por SFE e por LPSE. ...	125
Tabela 4.8: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro em diferentes condições de extração (°C/bar).	142
Tabela 4.9: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro retido na coluna de adsorção em diferentes condições de extração (°C/bar).	143
Tabela 4.10: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro coletados em diferentes tempos da curva de extração.	145
Tabela 4.11: Atividade antioxidante do extrato SFE de ginseng brasileiro e dos compostos de referência (Rutina e BHT).	149
Tabela 7.2.1: Solubilidade da Lavanda brasileira (óleo volátil)	195
Tabela 7.2.2. Solubilidade da Lavanda brasileira (extrato SFE).....	196
Tabela 7.2.3. Solubilidade da Quebra pedra (extrato SFE)	196
Tabela 7.2.4. Solubilidade do Ginseng brasileiro (extrato SFE).....	197

Tabela 7.4.1: Resultados da atividade antioxidante referentes à lavanda brasileira (<i>Absorbância</i>)	203
Tabela 7.4.2: Resultados da atividade antioxidante referentes à lavanda brasileira (<i>% de inibição</i>).	203
Tabela 7.4.3: Resultados da atividade antioxidante referentes à quebra pedra	204
(<i>Absorbância</i>)	204
Tabela 7.4.4: Resultados da atividade antioxidante referentes à quebra pedra (<i>% de inibição</i>)..	204
Tabela 7.4.5: Resultados da atividade antioxidante referentes à ginseng brasileiro	205
(<i>Absorbância</i>)	205
Tabela 7.4.6: Resultados da atividade antioxidante referentes à ginseng brasileiro (<i>% de inibição</i>)	205
Tabela 7.6.1: Extratos que apresentaram o tempo de retenção em torno de 43 minutos.	213

Nomenclatura/Acrônimos/Abreviações

AA: atividade antioxidante

AUC: area under curve (area abaixo da curva)

b.s: base seca

b.u: base úmida

CCD: cromatografia em camada delgada

CER: constant extraction rate period (período de taxa constante de extração)

CG: cromatografia gasosa

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

d_a : densidade real e aparente

d_{mg} : diâmetro médio das partículas

d_r : densidade real

FER: falling extraction rate period (período de taxa decrescente de extração)

FRAP: ferric reducing/antioxidant power (redução férrica/poder antioxidante)

IC₅₀: concentração referente à inibição de 50%

LPSE: low pressure solvent extraction (extração com solvente a baixa pressão)

m/m: massa por massa

M_{CER} : taxa de transferência de massa na etapa CER

OEC: overall extraction curve (curva global de extração)

OMS: organização mundial da saúde

ORAC: oxygen radical absorption capacity (capacidade de absorver radicais de oxigênio)

P: pressão

Q_{CO_2} : vazão do solvente

S/F: solvent/feed (razão entre a massa de solvente e a massa de matéria-prima de alimentação)

Sc: concentração referente a porcentagem de redução do radical DPPH

SFC: supercritical fluid (fluido supercrítico)

SFE: supercritical fluid extraction (extração com fluido supercrítico)

T: temperature

t_{CER} : tempo do período CER

TEAC: total radical absorption potentials (capacidade antioxidante equivalente Trolox)

v/v: volume por volume

X_0 : rendimento global de extração

Y_{CER} : razão mássica de soluto na fase fluida na etapa CER

Letras gregas

ε : porosidade

ρ_{CO_2} : densidade do CO_2

ρ_s : densidade do sólido ou densidade real (kg/m^3)

TESE DE DOUTORADO

Autor: Danielle Cotta de Mello Nunes da Silva

Título: Extração Supercrítica de Plantas Aromáticas e Medicinais (Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)): dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles – LASEFI – DEA/FEA – UNICAMP

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o rendimento global de extração, a atividade biológica e os perfis de composição de extratos de lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), obtidos por extração supercrítica (SFE), hidrodestilação e por extração com solvente a baixa pressão (LPSE) utilizando metanol, etanol e hexano.

A lavanda brasileira apresentou o rendimento global de extração (X_0) variando entre $2,0 \pm 0,1\%$ e $4,0 \pm 0,2\%$ (b.u), sendo que o maior rendimento de extrato foi obtido na condição de operação de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 300 bar ($4,0 \pm 0,2\%$). O rendimento do óleo volátil de lavanda brasileira obtido por hidrodestilação foi de $1,2 \pm 0,1\%$. Os rendimentos dos extratos obtidos por extração a baixa pressão foram: $9,4 \pm 0,1\%$ (metanol), $3,3 \pm 0,2\%$ (etanol) e $0,8 \pm 0,2\%$ (hexano). Os compostos majoritários presentes no óleo volátil e no extrato SFE de lavanda brasileira foram pinocanfona (13,5 - 16,3%), β -pineno (10,5 - 12%) e pinocarvil acetato (7,3 - 8,3%), guaiol (6,6 - 8,7%) e bulnesol (3,7 - 4,1%). No óleo volátil a concentração referente a 40% de redução do radical DPPH ($Sc_{40\text{ (óleo 1)}} (1,8 \pm 0,1) \times 10^3\text{ mg/L}$) e no extrato SFE a concentração referente a 50% de redução do radical DPPH ($Sc_{50\text{ (SFE)}} (1,3 \pm 0,3) \times 10^3\text{ mg/L}$) de lavanda brasileira demonstraram fraco potencial antioxidante pelo método DPPH (1,1-difenil-2-pirilhidrazina). Já pelo método ORAC o óleo volátil (203 ± 15 micromoles de Trolox/ g_{óleo} ($\mu\text{M TE/g}_{\text{óleo}}$)) e o extrato SFE

(225 ± 18 micromoles de Trolox/ g_{SFE} ($\mu\text{M TE/g}_{\text{SFE}}$)) apresentaram poder antioxidante comparável a rutina o composto de referência. Pelo método da reação acoplada do β -caroteno/ácido linolênico, a atividade antioxidante (AA) dos extratos de lavanda brasileira variou de acordo com o solvente utilizado (metanol, etanol e hexano) e de acordo com a condição SFE empregada. A atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira obtidos com solventes orgânicos variou de -5 a 62%; o extrato obtido a 50 °C e 300 bar por SFE apresentou AA, variando entre 119 e 188%; os demais extratos não apresentaram AA pelo método do β -caroteno/ácido linolênico.

A quebra pedra apresentou X_0 variando de $0,80 \pm 0,01$ % a $3,60 \pm 0,04$ % (b.u) de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), sendo que o maior rendimento de extração foi obtido na condição de operação de 50 °C e 250 bar ($3,60 \pm 0,04$ %). Os rendimentos dos extratos obtidos por extração a baixa pressão foram: $10,20 \pm 0,04$ % (metanol), $3,40 \pm 0,04$ % (etanol) e $1,90 \pm 0,04$ % (hexano). Por meio da cromatografia em camada delgada foram confirmadas as presenças de óleo volátil, pigmentos, flavonóides e triterpenos nos extratos SFE e nos extratos LSPE de quebra pedra. Pelo método DPPH de atividade antioxidante o extrato SFE de quebra pedra apresentou fraca AA comparado à atividade dos compostos de referência (butilhidroxitolueno e rutina). De maneira geral, os extratos SFE de quebra pedra apresentaram AA superior à do antioxidante controle β -caroteno pelo método da reação acoplada do β -caroteno/ácido linolênico. A atividade antioxidante dos extratos de quebra pedra obtidos com solventes orgânicos variou de 17 a 217%; o extrato SFE obtido a 40 °C e 200 bar apresentou AA em torno de 100% em uma, duas e três horas de reação; os demais extratos SFE (40 °C e 250 bar e 40 °C e 300 bar) apresentaram AA variando de 21 a 66%; os extratos de quebra pedra podem ser considerados antioxidantes naturais com boa estabilidade e efeito prolongado.

O ginseng brasileiro apresentou X_0 variando de $0,50 \pm 0,02\%$ a $1,40 \pm 0,07\%$ (b.s) de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), sendo que o maior rendimento de extração foi obtido na condição de operação de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 bar ($1,40 \pm 0,07\%$). Os rendimentos dos extratos obtidos por extração a baixa pressão foram: $8,2 \pm 0,8\%$ (metanol), $2,2 \pm 0,7\%$ (etanol) e $0,6 \pm 0,1\%$ (hexano). Por meio das duas técnicas analíticas utilizadas para os extratos de ginseng brasileiro pode-se verificar a presença desde compostos de baixa massa molecular até compostos com estruturas complexas de alta massa molecular (saponinas, ácidos, triterpenos, esteróis) nos extratos SFE. Os compostos majoritários identificados nos extratos SFE de ginseng brasileiro foram ácido hexadecanóico ($0,5 - 27,1\%$), β -sitosterol e/ou estigmasterol ($1,1 - 20,1\%$), fitol ($6,0 - 30,8\%$) e hexatriacontane ($0,7 - 30,6\%$). Os compostos majoritários da fração retida na coluna de adsorção, instalada na saída da corrente de solvente foram o para-dietilbenzeno ($25,7 - 59,3\%$) e o meta-dietilbenzeno ($3,4 - 27,1\%$). Pelo método DPPH de atividade antioxidante o extrato SFE de ginseng brasileiro apresentou AA 25 vezes menos eficaz que a AA desempenhada pela rutina antioxidante natural. Pelo método da reação acoplada do β -caroteno/ácido linolênico a AA foi observada para o extrato metanólico, variando de 94 a 117%. Os extratos SFE que apresentaram maior potencial antioxidante foram obtidos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 bar e $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 300 bar , a porcentagem de inibição da oxidação destes extratos variou entre 143 e 246% e manteve-se estável com o tempo de reação.

O óleo volátil de lavanda brasileira e os extratos SFE de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro, não apresentaram efeito inibitório (atividade antiinflamatória) sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas ($4-10\text{ g/L}$).

Palavras-chave: *Aloysia gratissima*, Atividade antioxidante, Atividade antiinflamatória, Extração supercrítica, Extração com solvente à baixa pressão, Ginseng brasileiro, Lavanda brasileira, Quebra pedra, *Phyllanthus amarus*, *Pfaffia paniculata*.

DOCTORAL THESIS

Author: Danielle Cotta de Mello Nunes da Silva

Title: Supercritical extraction of aromatic and medicinal plants Brazilian Lavender (*Aloysia gratissima*), Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e Brazilian Ginseng (*Pfaffia paniculata*)): experimental data, composition and evaluation of activity.

Major Professor: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles – LASEFI – DEA/FEA – UNICAMP

ABSTRACT

This present work has as an objective evaluate the global yield of the extraction, biological activity, and the composition profiles of the Brazilian lavender (*Aloysia gratissima*), quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) and Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) extracts, obtained by supercritical extraction (SFE), hydrodistillation and by low pressure solvent extraction (LPSE) using methanol, ethanol e hexane.

The brazilian lavender showed a global extraction yield (X_0) varying between $2,0 \pm 0,1\%$ and $4,0 \pm 0,2\%$ (b.u), and the higher extract yield was obtained on $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 300 bar ($4,0 \pm 0,2\%$) of operational conditions. The global yield of the brazilian lavender volatile oil obtained by hydrodistillation was $1,2 \pm 0,1\%$. The global extracts yield obtained by low pressure extraction were: $9,4 \pm 0,1\%$ (methanol), $3,3 \pm 0,2\%$ (ethanol) and $0,8 \pm 0,2\%$ (hexane). The mainly components present in the volatile oil and in the SFE brazilian lavender extract were pinocamphone (13,5 - 16,3%), β -pinene (10,5 - 12%) and pinocarvyl acetate (7,3 - 8,3%), guaiol (6,6 - 8,7%) e bulnesol (3,7 - 4,1%). In the volatile oil the relating concentration to 40% of the radical reduction DPPH ($Sc_{40\text{ (oil)}}$) ($1,8 \pm 0,1 \times 10^3\text{ mg/L}$) and in the SFE extract the concentration relating to 50% of the radical reduction ($Sc_{50\text{ (SFE)}}$) ($1,3 \pm 0,3 \times 10^3\text{ mg/L}$) of brazilian lavender demonstrate a weak antioxidant potential by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. Although by the ORAC method the volatile oil ($203 \pm 15\text{ }\mu\text{M TE/ g}_{oil}$) ($\mu\text{M TE/g}_{oil}$) and the SFE extract ($225 \pm 18\text{ }\mu\text{M TE/ g}_{SFE}$) showed an antioxidant power similar to

the rutin the reference component. By the coupled reaction of the β -carotene/ linolenic acid method, the antioxidant activity (AA) of the brazilian lavender extracts varied according to the utilized solvent (methanol, ethanol and hexane) and according to the SFE condition employed. The brazilian lavender extracts antioxidant activity obtained with organic solvents varied from -5 to 62%; the obtained extract on 50 °C and 300 bar by SFE presented AA, varying between 119 and 188%; the others extracts did not present an AA by the β -carotene /linolenic acid method.

The quebra pedra presented X_0 varying between $0,80 \pm 0,01$ % to $3,60 \pm 0,04$ % (b.u) according to the extraction conditions (pressure and temperature), the higher extraction yield was obtained on 50 °C and 250 bar ($3,60 \pm 0,04$ %) of operational conditions. The global extracts yield obtained by low pressure extraction were: $10, 20 \pm 0,04$ % (methanol), $3,40 \pm 0,04$ % (ethanol) e $1,90 \pm 0,04$ % (hexane). By the thin layer cromatography were confirmed the presence of the volatile oils, pigments, flavonoids and triterpenes in the quebra pedra SFE and LSPE extracts. By the DPPH antioxidant activity method the quebra pedra SFE extract showed a weak AA related to the reference components (t-butyl hydroxyl toluene e rutin). Generally, the quebra perdra SFE extracts presents an AA superior to the β -carotene control antioxidant by the β -carotene/linolenic acid coupled reaction method. The quebra pedra extracts antioxidant activity obtained with organic solvent varied from 17 to 217%; the SFE extract obtained on 40 °C and 200 bar presented an AA around 100% in one, two and three reaction hours; the others SFE extracts (40 °C and 250 bar and 40 °C e 300 bar) presented an AA varying from 21 to 66%; the quebra pedra extracts can be considered natural antioxidants with good stability and prolonged effect.

The Brazilian ginseng presented X_0 varying from $0,50 \pm 0,02$ % to $1,40 \pm 0,07$ % (b.s) according to the extraction conditions (pressure and temperature), the higher extraction yield was obtained on the 30 °C and 250 bar ($1,40 \pm 0,07$ %) operation condition. The global extracts yield obtained by low pressure extraction were: $8,2 \pm 0,8$ % (methanol), $2,2 \pm 0,7$ % (ethanol) e $0,6 \pm 0,1$ %

(hexane). Through two analytical techniques utilized for the Brazilian ginseng extracts it can verify the presence from low molecular mass components until complex structures with high molecular mass. (saponins, acids, triterpenes, sterols) in the SFE extracts. The mainly components identified in the SFE Brazilian ginseng extracts were hexadecane acid - 27,1%), β -sitosterol e/ou stigmasterol (1,1 - 20,1%), phytol (6,0 - 30,8%) e hexatriacontane (0,7 - 30,6%). The mainly retained fraction on the adsorption column, installed on the solvent outlet were (25,7 - 59,3 %) for the p-diethylbenzene and (3,4 - 27,1 %) for the m-diethylbenzene. By the DPPH antioxidant activity method the SFE Brazilian ginseng extract presented an AA 25 times less efficient than the AA performed by the natural antioxidant rutin. By the β -carotene/ linolenic acid coupled reaction the AA was observed for the methanolic extract, varying from 94 to 117%. The SFE extracts that presented higher antioxidant potential were obtained on 50 °C and 200 bar and 500 °C and 300 bar, the inhibition percentage of these extracts oxidation varied between 143 and 246% and keeps it stable with the reaction time.

The Brazilian lavender volatile oil and the Brazilian lavender, quebrapaedra and Brazilian ginseng SFE extracts did not present an inhibited effect (anti-inflammatory activity) on the soybean lipoxygenase on the studied concentrations.

Key-words: *Aloysia gratissima*, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, supercritical extraction, low pressure solvent extraction, Brazilian ginseng, Brazilian lavender, Quebrapaedra, *Phyllanthus amarus*, *Pfaffia paniculata*.

JUSTIFICATIVA

Para a produção de extratos de alta qualidade obtidos de plantas é necessário o estudo dos métodos extrativos. O Brasil é um grande produtor de plantas aromáticas e medicinais e para aproveitar efetivamente seu potencial, o País precisa desenvolver e/ou adaptar tecnologias que sejam economicamente viáveis e ecologicamente corretas. A extração supercrítica (SFE = supercritical fluid extraction) utiliza como solvente fluido a alta pressão e é considerado um processo limpo, seus extratos apresentando alta pureza. A escolha das plantas estudadas neste trabalho foi realizada de acordo com a disponibilidade de obtenção destas, de acordo com estudos relatados sobre as plantas, suas possíveis propriedades terapêuticas e por existirem poucos estudos sobre a extração supercrítica da lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*) e da quebra pedra (*Phyllanthus amarus*). Em particular escolheu-se estudar as folhas e talos do ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) devido à inexistência de informações sobre estudos desta parte da planta. Outro fator que impulsionou a exploração do potencial terapêutico e a composição das folhas de ginseng brasileiro foi o grande potencial econômico que não tem progredido a contento devido ao longo tempo de cultivo (cinco anos) necessário para o desenvolvimento dos compostos de interesse obtidos a partir das raízes de *Pfaffia paniculata*. A falta de dados de processo, a comprovação das propriedades científicas relatadas pelas comunidades, às diferentes características botânicas e a variedade química dos compostos presentes em extratos de plantas impulsionaram a elaboração deste projeto de pesquisa envolvendo a lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi à obtenção de parâmetros de processo de extração supercrítica e extração a baixa pressão, a análise química e a determinação das atividades biológicas dos diferentes extratos.

Contextualização do trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas. A etapa de extração supercrítica (SFE); extração com solvente orgânico a baixa pressão (LPSE); avaliação da atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro pelo método da reação acoplada do β -caroteno; avaliação dos perfis de composição dos extratos de quebra pedra e ginseng brasileiro realizadas por meio de cromatografia gasosa (CG-DIC) e cromatografia em camada delgada (CCD); foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Naturais (LASEFI) – DEA/FEA/UNICAMP. A outra etapa do trabalho foi realizada durante o estágio de Doutorado sanduíche em Montpellier/França, como parte do projeto de cooperação internacional Brasil-França, intitulado “Valorização do Óleo de Vetiver – Investigação Científica e tecnológica” financiado pelo acordo CAPES-COFECUB, processo (424/3). Os experimentos de identificação dos compostos presentes no óleo volátil e no extrato supercrítico (SFE) de lavanda brasileira e a avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro foram realizados no Laboratório de Química Biomolecular (LCBM) da Escola Nacional Superior de Química de Montpellier (ENSCM). A avaliação do potencial antioxidante pelo método ORAC do óleo volátil e do extrato SFE de lavanda brasileira foram feitos no Departamento de Produção de Frutas e Hortaliças (FLHOR) do Centro Internacional de Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento (CIRAD), também em Montpellier.

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

No Brasil, a história da utilização de plantas no tratamento de doenças, apresenta influências da cultura africana, indígena e européia (Martins *et al*, 2000). A contribuição dos escravos africanos com a tradição do uso de plantas medicinais em nosso país se deu por meio das plantas que trouxeram consigo, e que eram utilizadas tanto em rituais religiosos, quanto por suas propriedades farmacológicas empiricamente descobertas e em rituais religiosos. Os índios que aqui viviam dispostos em inúmeras tribos utilizavam uma grande quantidade de plantas medicinais e, por intermédio dos pajés, este conhecimento, sobre as ervas locais e seus usos, foi transmitido e aprimorado de geração em geração. Os primeiros europeus que chegaram ao Brasil depararam-se com estes conhecimentos, que foram absorvidos por aqueles que passaram a viver no país e a partir da necessidade de viver do que a natureza oferecia localmente, assim como o contato com os índios que passaram a auxiliá-los como “guias”, fizeram com que estes ampliassem esse contato com a flora medicinal brasileira (Lorenzi e Matos, 2002).

A partir deste conhecimento, no Brasil, até o século XX, fazia grande uso das plantas medicinais para a cura de inúmeras doenças, sendo esta prática uma tradição que foi sendo transmitida ao longo dos tempos. No entanto, com o advento da industrialização, da urbanização e do avanço da tecnologia no que diz respeito à elaboração de fármacos sintéticos, houve aumento por parte da população da utilização destes medicamentos, deixando-se de lado o conhecimento tradicional das plantas medicinais (Lorenzi e Matos, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que, atualmente, a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial (Alves e Silva, 2002).

Para Lorenzi e Matos (2002), a preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável despertou um novo interesse, e o uso das plantas é visto como forma de cooperar para a melhoria da qualidade de vida da população. Lorenzi e Matos (2002), Matsuda *et al.* (2002) relataram que este crescente mercado espelha, de certa forma, a busca da população mundial por uma melhor qualidade de vida e procura por métodos mais naturais e saudáveis de manutenção da saúde.

Atualmente muitos pesquisadores vêm se empenhando no estudo de alimentos com propriedades funcionais capazes de evitar possíveis doenças e curar enfermidades já conhecidas. O interesse pela utilização de alimentos funcionais é resultado da preocupação da população atual com a saúde, o bem estar físico, a aparência e o surgimento de novas doenças ainda sem tratamento apropriado (Robbers e Tyler, 1999).

Neste contexto, o Brasil aparece como um país de grande diversidade de plantas, com grande potencial para a produção de ingredientes para a formulação de alimentos funcionais, para a prevenção, controle e tratamento de diversas enfermidades. As plantas são ricas em uma variedade de metabólitos secundários, como terpenóides, alcalóides e flavonóides que são encontrados *in vivo* e apresentam propriedades funcionais. A obtenção de novos compostos químicos com propriedades terapêuticas como atividade antioxidante, antiinflamatória, antireumática, digestiva entre outras, justifica o número crescente de estudos químicos e farmacológicos envolvendo plantas (Simões *et al.*, 2000).

Muitas plantas dos biomas brasileiros como Serrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica vêm sendo utilizadas pelas populações locais no tratamento de diversas doenças tropicais como leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas (Alves *et al.*, 2000, citado por Duarte *et al.*, 2005). Plantas como a lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), quebra pedra

(*Phyllanthus amarus*) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) vêm sendo atualmente pesquisadas sob o aspecto terapêutico.

A lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*) é uma planta originária da América do Sul, precisamente da Argentina. Esta planta é conhecida popularmente como lavanda brasileira e seu óleo essencial apresenta propriedades terapêuticas no tratamento de Herpes do tipo I (Garcia *et al*, 2003).

Plantas do gênero *Phyllanthus* popularmente conhecida como quebra pedra, têm sido largamente utilizadas na medicina tradicional na China, Filipinas, Nigéria, África, Caribe, América do Sul e Central no tratamento de diversos tipos de doenças (Thyagarajan *et al* (1988) citado por Sánchez-Lamar *et al* (1999)). Várias propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a plantas do gênero *Phyllanthus*, como atividade antipirética, antibacteriana (Vinayagamoothy, 1982), antiparasítica (Omulokoli *et al*, 1997), anticonceptiva (Filho *et al*, 1996) e antiviral (Ott *et al*, 1997).

A *Pfaffia paniculata* é usualmente conhecida como ginseng brasileiro. Plantas do gênero *Pfaffia* compreendem 27 espécies distribuídas no Brasil, principalmente nos estados da Amazônia, São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Vidal & Vidal *et al*, 1967; Teran, 1990; citados por Cortez *et al*, 1998). Após a descoberta do ácido pfáffico, presente nas raízes de *Pfaffia paniculata* o interesse no estudo das espécies do gênero vem crescendo devido à provável atividade antitumoral deste ácido (Nishimoto *et al*, 1984).

Para produção de extratos de plantas é necessário o estudo de técnicas para obtenção de extratos de alta qualidade, grande rendimento e baixo custo. A tecnologia supercrítica, que utiliza como solvente gases a alta pressão, é considerada um processo limpo, sendo que os extratos obtidos através desta técnica apresentam alta pureza. Esta tecnologia tem sido muito empregada na obtenção de extratos de plantas que podem ser utilizados na indústria alimentícia e

farmacêutica. Este processo apresenta vantagens distintas quando comparado com outras técnicas de separação: compostos termicamente instáveis podem ser separados a baixas temperaturas; o solvente pode ser removido facilmente do soluto por redução de pressão e/ou ajuste de temperatura; a necessidade de energia térmica é inferior à do processo de destilação; alta seletividade para os solutos; rápida extração devido à baixa viscosidade do solvente, alta difusividade e bom poder de solvatação do solvente (fluido supercrítico) (Charpentier e Sevenants, 1988).

No processo de extração supercrítica (SFE), variáveis como temperatura e pressão podem influenciar diretamente na qualidade do produto final. Entretanto variáveis como geometria do leito, número de extratores e vazão do solvente também influenciam no desempenho do processo. Usualmente a seleção das condições de operação do processo de SFE baseia-se na solubilidade do soluto no solvente ou no rendimento global de extração. A engenharia básica para projetos de equipamento que utilizam fluidos supercríticos está disponível, porém poucos dados têm sido publicados para o cálculo do aumento de escala de unidades de extração supercrítica (Perrut e Clavier, 2003).

1.1 Objetivos

1.1.2 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho consiste na aquisição de dados experimentais para a obtenção de extratos, por extração supercrítica e extração com solventes a baixa pressão de lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*) e ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) e na avaliação da composição química e atividade biológica destes extratos.

1.1.3 Objetivos Específicos

- Determinar o rendimento global de extração supercrítica e de extração com solvente à baixa pressão da lavanda brasileira, da quebra pedra e do ginseng brasileiro;
- Determinar a curva global de extração para o processo SFE,
- Determinar os parâmetros de processo t_{CER} (tempo de duração da etapa de taxa constante de extração), M_{CER} (taxa de extração na etapa de taxa constante de extração) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa de taxa constante de extração) no processo supercrítico;
- Determinar a composição dos extratos da lavanda brasileira, da quebra pedra e do ginseng brasileiro através de cromatografia gasosa (CG), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e cromatografia em camada delgada (CCD);
- Avaliar a qualidade e a funcionalidade dos extratos de lavanda brasileira, da quebra pedra e do ginseng brasileiro através da avaliação de suas atividades antioxidante e antiinflamatória.

- Comparar a extração supercrítica e a extração à baixa pressão em termos de rendimento global, atividade biológica e composição dos extratos.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1 Fundamentos em Extração Supercrítica (SFE)

2.1.1 Fluido supercrítico

Em 1869, nas *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Thomas Andrews (1813-1885) publicou o resultado de suas experiências sobre a liquefação dos gases, realizadas a partir de 1861. Nessa publicação, escreveu que acima de uma dada temperatura e pressão (às quais chamou críticas), o dióxido de carbono, em particular, e todos os gases em geral, pressão alguma, por maior que seja, pode causar sua liquefação. Nessas experiências, Andrews chegou a determinar como sendo 31 °C a temperatura crítica (T_c) do dióxido de carbono, e de 200 °C a do éter. Ainda como resultados dessas experiências, Andrews fez a distinção entre vapor e gás, afirmando que o vapor é um gás em qualquer temperatura abaixo de sua T_c . Quatro anos mais tarde, Van der Waals, baseado nas descobertas de Andrews, derivou a primeira descrição teórica do equilíbrio bifásico (Bassalo, 1998).

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

Os fluidos supercríticos têm capacidade de extrair certos compostos químicos com o uso de solventes específicos através da combinação de temperatura e pressão (Brunner, 2005). O CO_2 é o SFC mais utilizado por não ser tóxico, não ser inflamável, ser ecologicamente correto,

amplamente disponível com alto nível de pureza e baixo custo e por apresentar uma temperatura crítica de 31 °C. É um fluido supercrítico adotado para o processamento de produtos naturais com aplicação na indústria alimentícia, nutracêutica, farmacológica e cosmética. Apesar de suas vantagens o dióxido de carbono não é um bom solvente para compostos de alta volatilidade. Por outro lado, vê-se que as limitações do poder solvente do CO₂ podem ser reduzidas com o uso de co-solventes. Por outro lado, a baixa solubilidade de compostos voláteis deixa de ser desvantajosa quando se trata de refino, fracionamento e purificação de extratos. Nestes casos, compostos com maior pressão de vapor como (ácidos, ésteres, hidrocarbonetos, entre outros) podem ser facilmente separados.

A Tabela 2.1 mostra os valores críticos de alguns compostos comumente utilizados como fluidos supercríticos. Os fluidos que se encontram no estado acima do ponto crítico exibem comportamentos e propriedades físicas diferentes daquelas que apresentam no estado sólido, líquido e gasoso e se denominam fluidos supercríticos (FSC).

Tabela 2.1: Propriedades críticas de espécie puras selecionadas.

Fluido	T _c (°C) ^a	P _c (bar) ^b	P (kg/m ³) ^c
Acetona	235,0	47,00	278,0
Água	374,2	220,9	322,6
Dióxido de carbono	31,1	73,80	467,6
Etanol	240,4	61,40	276,0
Metanol	239,4	80,90	272,0
Etileno	9,3	50,40	195,8

Fonte: Velasco *et al*, 2007.

^a Temperatura crítica; ^b Pressão crítica; ^c densidade

A Figura 2.1 mostra a representação gráfica de todos os estados de equilíbrio possíveis de uma substância pura. Pode-se em função da pressão, temperatura e volume específico distinguir zonas de uma única fase, sólida, líquida e gasosa e zonas onde coexistem fases em equilíbrio,

além da linha tripla onde as três fases se encontram em equilíbrio em uma única pressão e temperatura. O ponto crítico indicado na Figura 2.1 é definido por sua temperatura crítica (T_c), pressão crítica (P_c) e volume específico crítico (V_c).

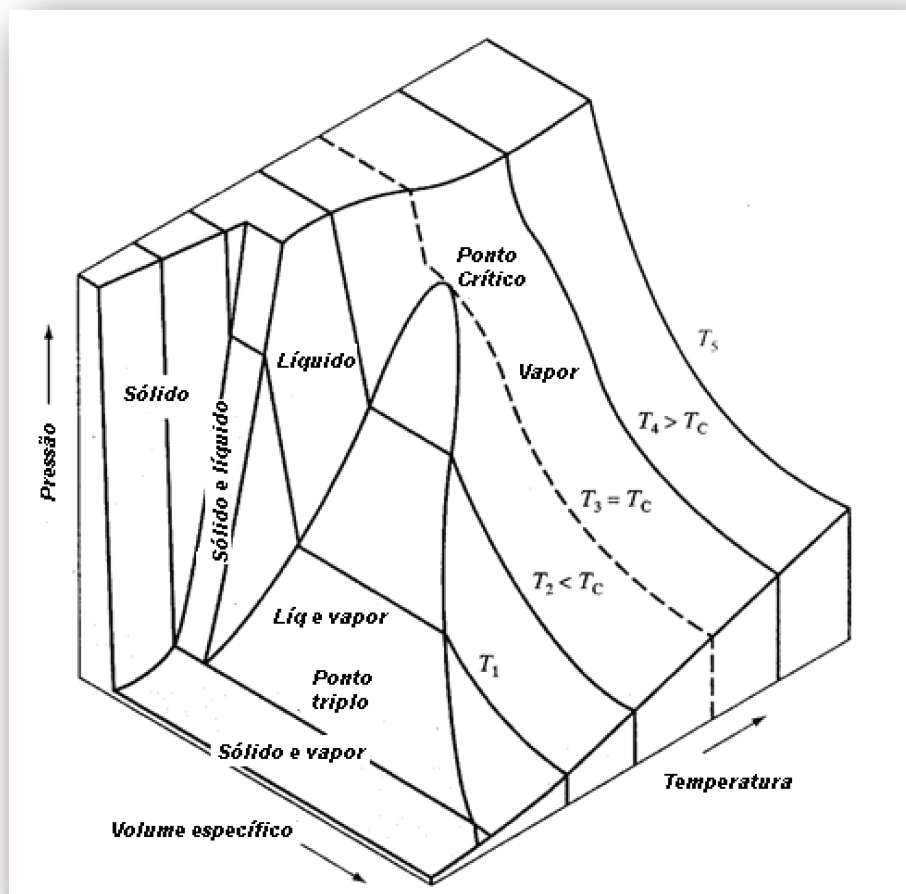


Figura 2.1: Diagrama de equilíbrio para substância pura (adaptado de Sandler, 1994).

Uma visão mais simplificada da Figura 2.1 se obtém projetando-a em uma superfície sobre o plano PT, como na Figura 2.2. Neste plano cada uma das regiões de equilíbrio bifásico se transforma em linhas, delimitando as zonas onde a substância se encontra sólida, líquida e gasosa.

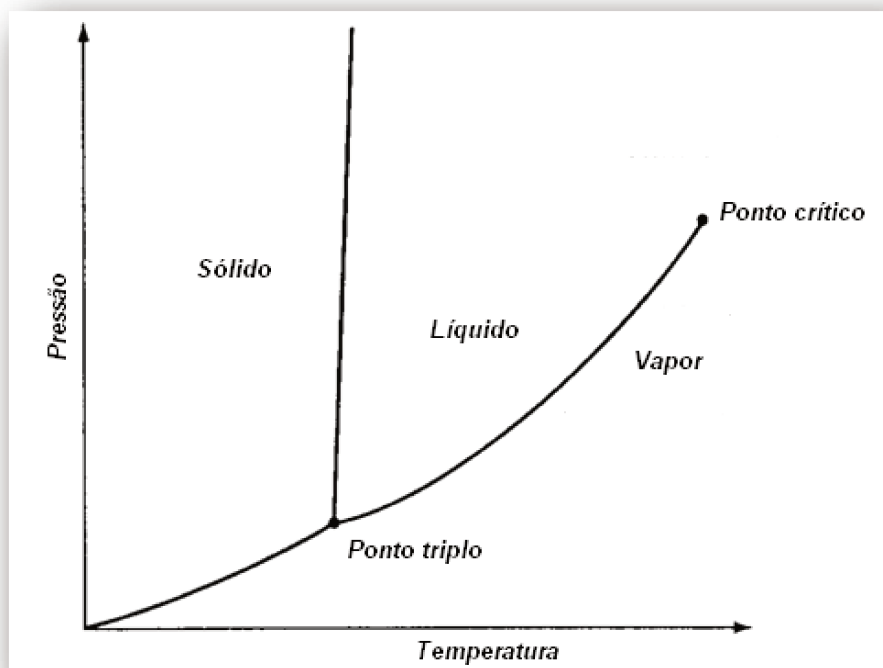


Figura 2.2: Diagrama de fases PT adaptado de Sandler, 1994).

No estado supercrítico a substância adquire um comportamento intermediário entre gases e líquidos, conforme mostra Tabela 2.2. A densidade, que é relacionada com a capacidade de solubilizar do fluido, é próxima à dos líquidos, a viscosidade é similar à dos gases e a difusividade intermediária entre os gases e líquidos permitindo assim uma penetração e difusão mais fácil na matriz da qual se quer extrair o soluto (McHugh e Krukonis, 1986).

Tabela 2.2: Comparação entre as propriedades dos gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Propriedade	Gás	Fluido Supercrítico	Líquido
Densidade (g/cm ³)	$(0,6 - 2,0) \times 10^{-3}$	0,2 - 0,9	0,6 - 1,6
Coefficiente de Difusão (cm ² /s)	0,1 - 0,4	$(0,2 - 0,7) \times 10^{-3}$	$(0,2 - 2,0) \times 10^{-5}$
Viscosidade cP	$(1 - 3) \times 10^{-2}$	$(1 - 9) \times 10^{-2}$	0,2 - 3,0

Fonte McHugh e Krukonis (1994).

Os fluidos supercríticos podem dissolver seletivamente certos compostos de misturas onde os componentes possuem volatilidades similares e estruturas químicas de misturas diferentes, já que mudanças de pressão e temperatura ocasionam mudança no poder de solvatação tornando o solvente mais seletivo (Callame e Steiner, 1982). Exemplos de compostos extraídos através da SFE podem ser observados na Figura 2.3 (Adams, 2001).

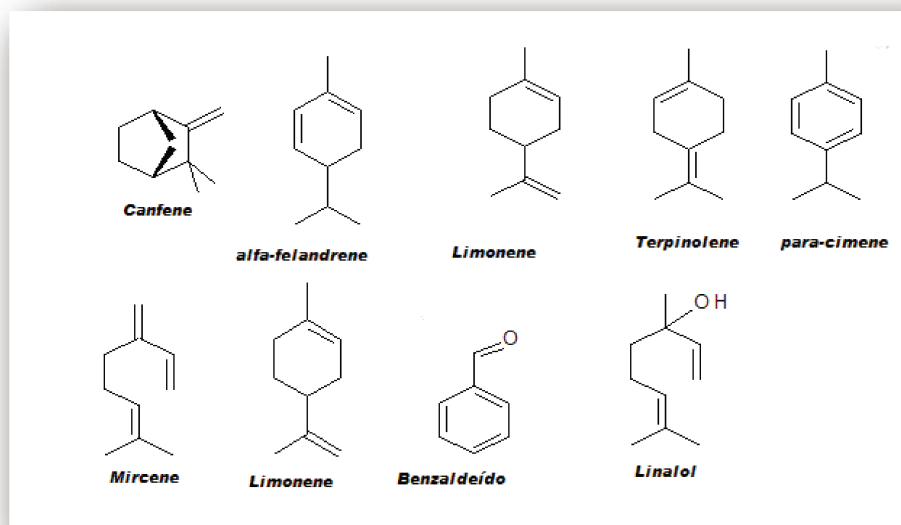


Figura 2.3: Estruturas químicas de terpenos extraídos por meio de SFE.

2.1.2 Extração Supercrítica (SFE)

A primeira aplicação em grande escala da tecnologia supercrítica na indústria de alimentos surgiu na Alemanha para descafeinização do café e chá, extração de oleoresina de lúpulo e posteriores aplicações de menor volume em extração de aromas, corantes e na indústria farmacêutica e cosmética. Atualmente, países como Estados Unidos, França, Itália, China e Coréia contam com plantas de extração supercrítica para obtenção de produtos farmacêuticos, Índia para extração de especiarias e aromas; plantas de média escala na Espanha e Inglaterra aplicam cromatografia supercrítica para a obtenção de nutracêuticos e nos Estados Unidos opera uma das maiores plantas do mundo em fabricação de tintas (Espinosa, 2001).

A tecnologia supercrítica vem sendo empregada de forma crescente para a obtenção de produtos naturais, visando principalmente a aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. As técnicas mais aplicadas são a extração e o fracionamento, com várias unidades já em funcionamento (Perrut e Clavier, 2003). Por outro lado, nos anos recentes, a investigação científica sobre novos produtos com potencial para exploração por meio da extração com fluido supercrítico tem aumentado significativamente, enfatizando o levantamento de dados de equilíbrio de fases em sistemas com fluido supercrítico, a obtenção de parâmetros de processo em escala de laboratório, e dados necessários para o cálculo do custo de manufatura e viabilidade econômica de unidades industriais de extração supercrítica (Meireles, 2003). Variáveis como geometria do leito, números de extratores e vazão de solvente também influenciam no desempenho do processo. Usualmente, a seleção das condições de operação do processo de SFE baseia-se na solubilidade do soluto no solvente e/ou no rendimento global de extração. A engenharia básica para projetos de equipamento que utilizam fluidos supercríticos está disponível, porém poucos dados têm sido publicados para o cálculo do aumento de escala de unidades de extração supercrítica (Perrut e Clavier, 2003). Segundo Meireles (2003), a questão do custo é atualmente o principal obstáculo à disseminação da tecnologia supercrítica, já que o potencial do processo e a grande variedade de produtos de alta qualidade que podem ser obtidos estão comprovados.

O Brasil possui uma grande biodiversidade contendo 55.000 das 350.000 espécies de plantas conhecidas no mundo. Isto, associado ao fato de que o Brasil tem tradição em produção agrícola, pode garantir a disponibilidade de materiais *in natura* em custo e qualidade adequados. Além disso, há diversas pesquisas na América do Sul relacionadas à SFE. Apesar disso, ainda não há unidades em escala industrial para produzir extratos por SFE nessa região (Meireles,

2003). As Tabelas 2.3 e 2.4 apresentam as vantagens e desvantagens da SFE e do uso de dióxido de carbono como fluido supercrítico.

Tabela 2.3: Vantagens e desvantagens da SFE

Vantagens	Desvantagens
• Os solventes usados, geralmente, são gasosos à pressão e temperatura ambientes, ou seja, após a extração, eles podem ser facilmente eliminados de ambos, os resíduos de extração e os produtos extraídos e recuperados; • As propriedades de solvatação dos gases comprimidos podem ser grandemente variadas, tanto pelo ajuste apropriado da temperatura e da pressão quanto pela introdução de agentes aditivos (co-solventes) que mudem a polaridade dos gases. Em adição, pela alteração gradual da temperatura e da pressão, podem ser feitas extrações multifase e fracionamento do extrato, nos produtos desejados; • Os extratos quase não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação, caramelização ou alterações térmicas, por isso representam melhor o material original; • Os solventes podem ser reutilizados, o que significa um menor custo operacional (Maul, 1999; Zancan <i>et al</i>, 2002).	• Os extratos obtidos podem possuir características diferentes dos obtidos pelos métodos convencionais (Quispe-Condori, 2005); • Compostos muito polares, dificilmente serão extraídos sem a adição de um co-solvente adequado (Maul, 1999); • Na modelagem da extração, não existe um único modelo que possa representar todas as matrizes. Cada matriz vegetal se comporta de uma maneira particular nas mesmas condições operacionais (Quispe-Condori, 2005); • Investimento relativamente alto devido à operação à alta pressão;

Tabela 2.4: Vantagens e desvantagens do uso de dióxido de carbono com SFC

Vantagens	Desvantagens
• É inerte; • Não cria problemas ambientais; • Não é tóxico nas quantidades utilizadas (o que o torna particularmente adequado na indústria alimentar); • Não é inflamável; • Largamente disponível; • Tem uma temperatura crítica de 31 °C; ou seja, as extrações podem ser conduzidas a baixa temperatura evitando danos às propriedades físico-químicas dos extratos; • A pressão crítica (73 bar) é relativamente baixa; • É de baixo custo em purezas elevadas quando comparado com outros solventes; • Não são necessários processos subseqüentes de purificação dos extratos; • Tem uma baixa polaridade, similar à do pentano e hexano; • Através da simples escolha de diferentes condições de temperatura e pressão para um número de vasos separadores seqüenciais é possível obter uma separação fracionada de compostos orgânicos; • É facilmente separado do produto que se pretende extrair através da alteração das condições de pressão e temperatura de modo que seja gasoso nessas condições (Ribeiro <i>et al</i>, 2001; Li <i>et al</i>, 2003).	• O equilíbrio de fases entre o solvente supercrítico e o soluto pode ser muito complexo; • Como é não-polar, dissolve muito bem apenas os solutos não polares; • A adição de co-solventes pode alterar a polaridade do CO₂, mas podem ficar resíduos desses solventes no extrato, sendo necessário um processo subseqüente de eliminação dessas impurezas; • A adição de co-solventes altera ainda mais o diagrama de equilíbrio de fases, complicando a realização do ‘scale-up’, o que agrava economicamente o processo;

2.1.7 Aplicações da extração supercrítica

São inúmeras as aplicações da extração com fluido a alta pressão. Como exemplos, mencionam-se:

- ✓ Extração, refino e fracionamento de óleos comestíveis, gorduras e ceras: a extração se refere à extração de alguns solutos presentes em materiais naturais sólidos, tais como sementes e frutos. A extração de óleos por metodologias convencionais (prensagem de sementes e extração com hexano) requer uma posterior remoção de fosfolipídios, ácidos graxos livres e produtos da oxidação. O CO₂ supercrítico pode ser usado para refinar óleos crus em processo contínuo utilizando colunas multi-estágios com escoamento em contracorrente. A limitação desta aplicação é o baixo poder de solvatação do dióxido de carbono, pois freqüentemente é desejável a utilização de um co-solvente, tal como etanol, de modo que a separação não ocorre apenas por mudança de pressão de vapor, mas, também por interações químicas específicas. Alguns exemplos são a separação supercrítica de ácidos graxos livres dos triglicerídeos de óleos naturais (Peter, 1993), a extração fracionada de aromas, polímeros, fármacos, óleo de fígado de bacalhau;
- ✓ Produção de nutracêuticos, aplicações farmacêuticas e cromatografia supercrítica;
- ✓ Extração de alcalóides de matrizes vegetais: Lack e Seidlitz (1993) apresenta uma ampla discussão sobre descafeinização de café e chá;
- ✓ Extração de aromas, antioxidantes e outras substâncias ativas de várias partes das plantas: alecrim, segurelha, coentro, tomilho, orégano, murta, cidreira, entre outras;
- ✓ Separação de compostos valiosos: carotenóides, tocoferóis, lecitina. Em geral estes compostos são obtidos de subprodutos da extração de óleos, provenientes de etapas da

desodorização. Os destilados desodorizados são ricos em compostos de alto valor agregado e podem ser extraídos por técnicas supercríticas;

- ✓ Extração de produtos de elevado valor agregado de algas ou de sementes;
- ✓ Extração de lúpulo, corantes naturais, esteróis, esteróides e alcalóides;
- ✓ Remoção de compostos poluentes de águas residuárias;
- ✓ Regeneração de catalisadores e adsorventes (Bernardo-Gil *et al*, 2002; Maul, 1999);
- ✓ Purificação de materiais, por exemplo: remoção de álcool de vinhos e cervejas (Vazquez da Silva e Barbosa, 2000); tratamento de produtos naturais para remoção de solventes orgânicos (Reverchon *et al*, 2000); obtenção de produtos de baixo teor de gorduras e colesterol (Castera, 1994);

2.1.8 Aspectos econômicos e Perspectivas futuras da utilização de Fluidos Supercríticos (FSC) na indústria

As perspectivas do emprego da extração supercrítica relacionadas com os resultados das pesquisas em desenvolvimento dão maior consciência aos demais profissionais da área sobre as possibilidades que o processo oferece, sobre sua viabilidade econômica, disseminação dos atuais conhecimentos sobre o assunto, escolha das matérias-primas mais adequadas, necessidade de obter produtos isentos de solventes orgânicos, as restrições cada vez mais presentes no uso dos solventes orgânicos tóxicos, necessidade de fracionamento de óleos essenciais sem quebra de molécula e obtenção de produtos idênticos aos existentes na natureza, os quais são adequados para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Maul, 1999 e Perrut, 2000).

O número de aplicações potenciais da extração por fluidos supercríticos continua a crescer em todo o mundo. Pelo que se verifica sua aplicação já é uma realidade, em parte impulsionada pela demanda crescente de produtos de alta qualidade e da globalização da economia, também no

comércio de insumos farmacêuticos, alimentícios, químicos e cosméticos, e principalmente pela seletividade, facilidade e capacidade de separação e fracionamento que oferece para um grande número de compostos orgânicos, muitas vezes impossíveis de extrair pelos processos tradicionais (Perrut, 2000).

Existem outros fatores fundamentalmente econômicos que se opõem à rápida difusão da tecnologia supercrítica. Altas pressões requerem altos gastos de investimento e de operação. Atualmente os processos supercríticos competem com os processos de extração tradicionais quando aplicados para obtenção de produtos de alto valor agregado. Por outro lado, observa-se tendências a mudanças nesse setor. As regulamentações cada vez mais restritas em relação aos efeitos sobre a camada de ozônio, o descarte de compostos orgânicos voláteis e concentrações residuais no produto final para proteção dos consumidores e do meio ambiente e regulamentações cada vez mais restritas de países que têm banido a utilização de muitos solventes para extração de produtos alimentícios, têm facilitado o desenvolvimento de processos de extração e fracionamento supercrítico, tornando-o mais competitivo (Perrut, 2000).

Ao se comparar os processos de obtenção dos extratos naturais, devem ser levadas em consideração as propriedades funcionais e a qualidade dos extratos obtidos por diferentes tecnologias de extração. A SFE certamente apresenta custo de investimento desfavorável frente a outras tecnologias como hidrodestilação (obtenção de óleos voláteis) ou qualquer outro processo de extração com solvente a baixa pressão (LPSE), levando-se em conta o número de operações unitárias (decantação, centrifugação, retirada do solvente do extrato e do lodo de sólidos (bagaço, material exaurido) que envolve destilação, evaporação, descoloração, etc) associadas a estes processos que não são requeridas pela SFE. As propriedades e a qualidade dos extratos obtidos por diferentes processos devem ser confrontadas, desse modo a SFE torna-se competitiva e um processo alternativo de extração (Meireles, 2003).

Alguns estudos recentes de custo de manufatura de extratos utilizando a tecnologia supercrítica têm mostrado que esta pode ser economicamente viável (Pereira e Meireles, 2007; Pereira e Meireles, 2006; Rosa e Meireles, 2005), além de fornecer uma composição química diferenciada quando comparada a outros processos. Desta forma, a SFE torna-se competitiva como um processo alternativo de extração.

Segundo Rosa e Meireles (2005), para estimar o custo de manufatura (COM – cost of manufacturing) é importante saber o tempo de extração e o rendimento obtido durante este tempo. Considera-se que a unidade de extração supercrítica, em escala industrial, deve ter o mesmo desempenho que a extração em escala laboratorial, se o tamanho da partícula, a densidade do leito e a relação entre a massa de sólido e a massa de CO₂ são mantidas constantes.

O COM é influenciado por uma série de fatores que podem ser divididos em categorias como custos diretos, custos fixos e despesas gerais. Os custos diretos levam em consideração as despesas que dependem diretamente da taxa de produção. Alguns dos itens que contribuem para custos diretos são a matéria-prima, as utilidades e a operação, dentre outros. O custo fixo não depende diretamente da taxa de produção e deve ser considerado mesmo se a operação for interrompida; como exemplos temos os impostos, seguros, depreciação dentre outros. As despesas gerais são necessárias para manter o negócio e consiste no custo administrativo, despesas de vendas e na pesquisa e desenvolvimento dentre outros (Pereira e Meireles, 2007).

2.1.9 Estudos sobre extração supercrítica realizados no Lasefi

Canela *et al* (2002) estudaram a cinética de extração supercrítica das substâncias lipídicas presentes na microalga *Spirulina* (*Spirulina máxima*) nas pressões de 150 a 180 bar e nas temperaturas de 20 a 70 °C. Os extratos foram analisados quanto ao perfil de sua composição em

ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM) e carotenóides totais por espectrofotometria.

Rodrigues *et al* (2003) estudaram a extração supercrítica do sistema erva-doce (*Pimpinella anisum* L) + CO₂. Concluíram que o rendimento global de extrato variou entre 3,13 e 10,67% (em massa), a solubilidade do óleo volátil em CO₂ variou de 0,011 a 0,0182 kg de soluto/kg de CO₂ na temperatura de 30°C e pressões de 80 a 140 bar. O principal composto identificado nos extratos foi o anetol. A modelagem matemática das curvas de extração foi realizada através do modelo de Sovová (1994).

Yoda *et al*, 2003 estudaram a remoção de glicosídeos de *Stevia rebaudiana* Bertonii por meio de extração supercrítica realizada num processo em duas etapas: pré-tratamento realizado pela extração supercrítica com dióxido de carbono e extração supercrítica com a utilização de água como co-solvente. Os resultados mostraram que as curvas de extração experimentais são descritas com sucesso pelo modelo de transferência de massa descrito por Sovová (1994), onde aproximadamente 72% dos compostos solúveis em CO₂ foram recuperados na etapa de pré-tratamento (SFE com CO₂) e o componente majoritário foi o diterpeno austroinulina .

Leal *et al*, 2003 estudaram extratos supercríticos de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), alecrim (*Rosemarinus officinalis* L) e cúrcuma (*Curcuma longa* L), obtidos com e sem adição de etanol e álcool isopropílico como co-solventes, foram avaliados quanto as suas atividades antioxidantes e antimicobacteriana. Os resultados mostraram que o extrato de alecrim apresentou grande atividade antioxidante, o extrato de cúrcuma apresenta atividade antimicobacteriana e o extrato de gengibre mostrou atividade seletiva anti câncer .

Braga *et al*, 2003 estudaram a obtenção de extrato de cúrcuma através de várias técnicas: hidrodestilação, extração com solvente a baixa pressão, soxhlet e extração supercrítica com dióxido de carbono e co-solvente. A quantidade máxima de curcuminóides (8,43%) foi obtida na

extração em Soxhlet (1:1, etanol:álcool isopropílico). Os extratos obtidos por Soxhlet e extração a baixa pressão apresentaram grande atividade antioxidante.

Carvalho Jr (2004) obteve extratos supercríticos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sendo o maior rendimento global para o processo foi obtido a 300 bar e 40 °C. A correlação de aumento de escala proposta para manter comparável o rendimento global, assim como a cinética de transferência de massa, foi obtida com a utilização de duas unidades de extração supercrítica com diferentes geometrias de leito fixo.

O estudo da obtenção de extrato de funcho (*Foeniculum vulgare*) por extração supercrítica foi realizado por Moura (2004). Neste estudo foram avaliados parâmetros cinéticos, isothermas de rendimento global e equilíbrio de fases. Os resultados mostraram que o rendimento global máximo 12,5% foi obtido a 30 °C e 250 bar; a geometria do leito (H_B/D_B) e a relação entre o consumo de solvente e a massa de alimentação (S/F) devem ser consideradas como variáveis de processo SFE. Além disso, os testes de estabilidade de fases mostrou que na isoterma de 30 °C ocorreu um pequeno envelope de equilíbrio líquido-vapor. Os principais compostos identificados no extrato de funcho foram o anetol, a fenchona e os ácidos graxos (ácido oléico, ácido linoléico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido palmito oléico) (Moura *et al*, 2005).

2.1.10 Solubilidade

A massa de soluto dissolvido em um fluido supercrítico depende das similaridades e diferenças nas propriedades termodinâmicas e estruturais do soluto e do solvente. Produtos naturais de interesse como óleos e misturas multicomponentes devem ser caracterizados previamente antes de analisar-se sua solubilidade em solventes supercríticos. Por outro lado, o comportamento de misturas complexas pode ser predito através do estudo de sistemas mais simples, binários ou ternários. Em 1954, Francis estudou a solubilidade do dióxido de carbono

líquido quase crítico em 261 solutos, comparando dados de solubilidade com a que teriam em hidrocarbonetos parafínicos, aromáticos e poliaromáticos. No mesmo trabalho reportou 464 diagramas ternários, distinguindo zonas de equilíbrio bifásico, sólido-líquido e líquido-líquido e zonas de equilíbrio trifásico, sólido-líquido-líquido e líquido-líquido-líquido. A importância de seu trabalho não se resumiu apenas na amplitude dos sistemas analisados, mas também na possibilidade de estender suas conclusões de solubilidade a outras condições, isto é, se um composto é solúvel em CO₂ líquido, também será solúvel em CO₂ supercrítico.

A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações acerca da qualidade e composição dos extratos (França *et al*, 1999).

Quando se colocam em contato duas fases de composições diferentes, pode ocorrer a transferência de massa de componentes de uma fase para outra. Esta é a base das operações de transferência de massa. Se estas fases ficarem em contato durante um intervalo de tempo suficiente, acabarão atingindo um estado de equilíbrio. É nesta diferença na composição das fases dos constituintes da mistura que se baseiam algumas operações unitárias, tais como destilação, adsorção, absorção, dessorção, separação por membranas, extração sólido-líquido, extração líquido-líquido e, também, os processos de extração envolvendo fluidos supercríticos (Sant'ana, 1996).

O equilíbrio de fases determina os limites para a transferência de massa entre diferentes fases envolvidas em processos de separação, como a extração com fluido supercrítico. Além da temperatura e da pressão outros fatores devem ser considerados para a determinação da solubilidade. Entre estes se podem citar o tamanho e a funcionalidade do soluto, a funcionalidade do solvente, a pressão de vapor do soluto, as interações moleculares existentes no sistema, as quantidades envolvidas e a complexibilidade do sistema (Brunner, 1994).

A Figura 2.4 mostra as curvas típicas de solubilidade de sólidos em gases em temperaturas ($T_1 < T_2$) (curva em forma de “S”), com mínimos e máximos bem definidos a moderada e alta pressão, respectivamente. As pressões baixas e moderadas a solubilidade é dada pela relação entre a pressão de vapor do sólido e a pressão total, de modo que a curva tende a uma pendente negativa com o aumento da pressão até chegar a um mínimo, a partir do qual ocorre um grande aumento da solubilidade como resultado de grandes mudanças na densidade na fase gasosa com pequenos aumentos na pressão. O máximo ocorre em altas densidades, quando as forças repulsivas entre o soluto e o solvente chegam a ser importantes. Desta forma, a solubilidade do substrato no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto. Ao se percorrer uma isoterma de solubilidade observa-se que com o aumento da pressão, a densidade do solvente aumenta. Por outro lado, se numa isobárica, observa-se que com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição da densidade do solvente e um aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condensação retrógrada. A inversão das curvas de solubilidade é resultado da predominância de um dos dois fatores (McHung e Krukoni, 1986).

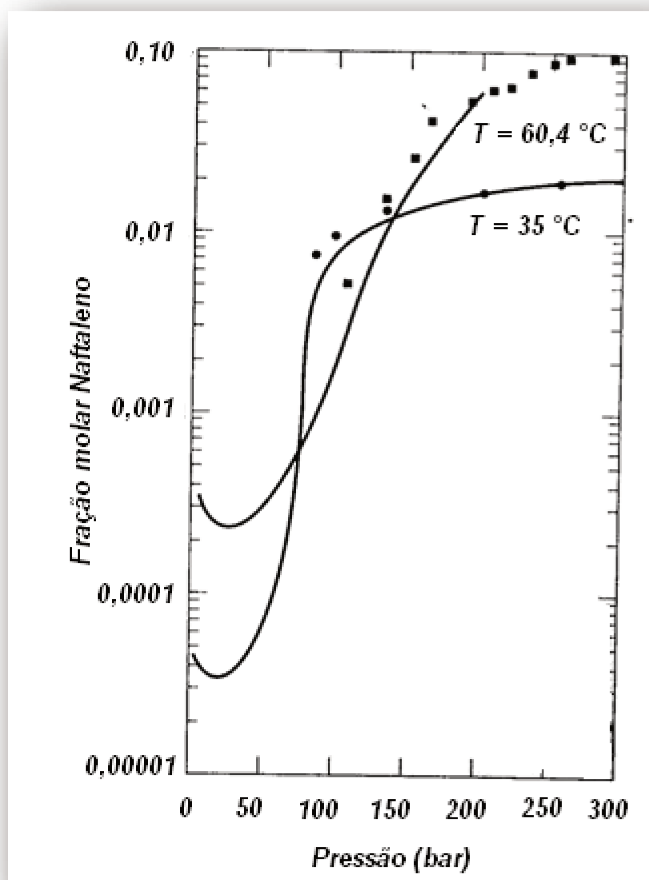


Figura 2.4: Solubilidade do naftaleno em dióxido de carbono supercrítico em função da pressão (adaptado de Sandler, 1994))

A seletividade do solvente por determinados componentes de uma mistura pode ser controlada mediante o ajuste das condições de temperatura e pressão do processo, dentro da região supercrítica. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior não somente a solubilidade de um determinado composto, como o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Assim, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa (França *et al*, 1999; Brunner, 1994).

Segundo Brunner (1994), a condição de equilíbrio em sistemas com fluidos supercríticos fornece informações sobre:

- a capacidade do solvente supercrítico de solubilizar substâncias no equilíbrio termodinâmico;
- a composição em equilíbrio na fase líquida;
- a seletividade do solvente (habilidade do solvente em solubilizar seletivamente um ou mais compostos da mistura).

2.1.11 Rendimento Global de Extração

O rendimento global (X_0) é definido como a máxima quantidade de material que pode ser extraído a uma determinada temperatura, pressão e vazão S/F. O valor X_0 , no entanto, não depende apenas das características da matéria-prima, mas também da forma com que os compostos nela presentes interagem com o solvente. Isto significa que as propriedades do solvente também influem no valor de X_0 . Entre estas propriedades está a densidade do solvente, que afeta diretamente o seu poder de solvatação. Rodrigues *et al*, 2002 mostram experimentalmente como variações na pressão e temperatura afetam a solubilidade de extratos de cravo-da-índia, gengibre e eucalipto em CO₂ supercrítico. Dados de X_0 experimentais ou estimados, de diferentes matrizes vegetais, foram compilados por Meireles (2003). De forma geral, foi observado que o comportamento do rendimento global com a temperatura e a pressão pode se assemelhar ao da solubilidade de soluto em fluidos supercríticos. O estudo do rendimento global permite visualizar o comportamento da solubilidade do extrato, indicando a temperatura e pressão na qual ocorre o ponto de inversão. Adicionalmente, proporcionar informações necessárias para a seleção das condições operacionais de extração, e é usado como um dado experimental importante na aplicação dos diversos modelos matemáticos.

Na Figura 2.4 é apresentado um comportamento do rendimento global com a temperatura e a pressão para o sistema funcho + CO₂ (Moura *et al*, 2004).

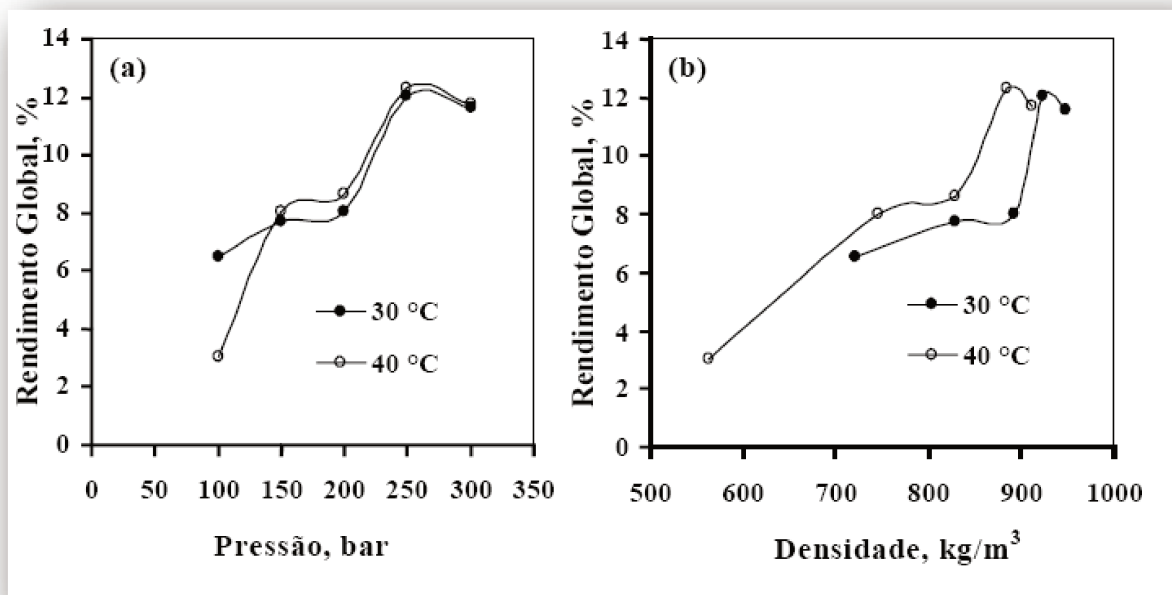


Figura 2.4: Isoterma de rendimento global para o sistema funcho + CO₂ utilizando a semente (Moura *et al*, 2005).

Na Figura 2.4 estão apresentados os rendimentos globais do extrato de funcho nas temperatura de 30 °C e 40 °C. A pressão de inversão é determinada a 150 bar. Para pressões maiores do que 150 bar a influência da temperatura no rendimento global é desprezível (Figura 2.4(a))., apesar de haver diferença em função a densidade do solvente (Figura 2.4(b)). Os efeitos da pressão e temperatura no rendimento global são semelhantes aos efeitos desses parâmetros na solubilidade do extrato de funcho em CO₂ supercrítico. Para o sistema funcho + CO₂ os efeitos da pressão de vapor do soluto sobre a pressão de inversão não são importantes. Entretanto a 100 bar, o rendimento global é maior a 30 °C do que a 40 °C, então para pressões menores que a pressão de inversão (150 bar) não pode ser negligenciado o efeito a densidade do solvente no rendimento global, ou seja para pressões inferiores a 150 bar a densidade do CO₂ é fortemente influenciada pela temperatura, assim, o efeito da pressão de vapor do soluto é menos importante que o efeito da densidade do solvente.

2.1.12 Mecanismo de transferência de Massa– Curvas Globais de extração (OEC) e Modelagem

O processo de extração de substratos de produtos naturais presentes em matrizes solidas pode ser dividido em duas etapas:

- Transporte de substâncias de dentro do material sólido até a interface sólido/fluido;
- Solubilização das substâncias pelo solvente e o transporte da mistura soluto/fluido.

As duas etapas do processo de extração de substâncias de produtos naturais podem ser desmembradas em cinco estágios do mecanismo de transferência de massa para sólidos:

- Difusão e adsorção do CO₂ na matriz sólida;
- Formação de um filme de óleo na superfície do sólido;
- Dissolução do filme de óleo no CO₂ supercrítico;
- Desorção e difusão do óleo no CO₂ supercrítico;
- Transporte convectivo do óleo pelo volume de CO₂.

Graficamente, o comportamento de uma extração geralmente é descrito por uma curva de extração. As curvas globais de extração (OEC), obtidas através do método dinâmico, são determinadas pela massa total de óleo extraído como função do tempo de extração, ou pela massa total de óleo extraído em função da massa de solvente utilizada (Brunner, 1994).

A típica curva de extração com fluido supercrítico é caracterizada por três etapas demonstradas na Figura 2.5 (Yoda, 2001; Rodrigues *et al*, 2002):

1) Etapa de taxa constante de extração (CER), onde a transferência de massa ocorre devido à convecção na fase fluida;

2) Etapa de taxa decrescente de extração (FER), onde tanto os efeitos convectivos na fase fluida quanto os difusionais na fase sólida determinam a velocidade de extração;

3) Etapa de taxa de extração difusional, onde ocorre o predomínio do fenômeno difusivo no sólido.

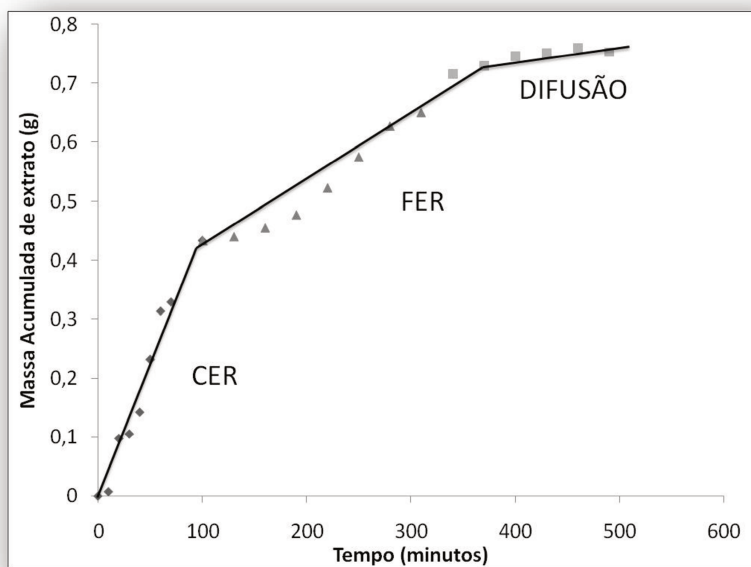


Figura 2.5: Curva de Extração da carqueja (adaptada de Silva, 2004).

A modelagem matemática dos dados experimentais da SFE tem o objetivo de determinar parâmetros para o desenvolvimento do processo, tais como dimensões do equipamento, taxa de escoamento do solvente e tamanho da partícula, para fazer possível a previsão da viabilidade de processos SFE em escala industrial, através da simulação das curvas globais de extração (Martinez *et al*, 2003). Do ponto de vista industrial, a otimização do processo SFE requer o conhecimento de características termodinâmicas (solubilidade e seletividade) bem como características cinéticas (taxa de transferência de massa) (Ferreira *et al*, 1999). Uma vez que no período de taxa de extração constante (CER – constant extraction rate) consegue-se extrair entre 50 e 90% do extrato total, a otimização do processo deveria ser focada neste período, e a modelagem poderia ser realizada considerando unicamente o fenômeno de convecção (Ferreira *et al*, 1999).

Os parâmetros cinéticos do período CER são:

- a) Taxa de extração para o período CER (M_{CER});
- b) Duração do período CER (t_{CER});
- c) Razão mássica de extrato na fase supercrítica na saída do leito (Y_{CER})), calculada como a razão entre M_{CER} e a vazão do solvente (Q_{CO_2}).

Os parâmetros cinéticos podem ser calculados através de um ajuste linear dos dados experimentais, segundo metodologia apresentada por Rodrigues *et al* (2002).

Há na literatura modelos totalmente empíricos empíricos baseados no formato das curvas de extração experimentais, mas a maior parte dos modelos parte do balanço de massa do processo. Alguns modelos matemáticos amplamente utilizados são, o modelo de Crank (1975), modelo de Tam e Liou (1989), modelo de Gotto (1993, modelo de Sovová (1994), modelo de França e Meireles (2000) entre outros. Modelos fenomenológicos do processo de extração consistem de equações de balanço de massa para o soluto na fase sólida e na fase fluida. Pela integração dessas equações diferenciais, perfis de concentração dependentes do tempo em ambas as fases são obtidos e a curva global de extração é calculada para a concentração na fase fluida na saída do extrator (Martinez *et al*, 2003, Sovová, 2005).

2.3 Generalidades sobre Antioxidantes

O processamento, e conseqüentemente a necessidade de preservação de alimentos estão intimamente relacionados com o incremento da procura de compostos com propriedades antioxidantes que aumentem o tempo de vida dos alimentos, reduzam as perdas nutricionais e que permitam o uso de óleos e gorduras que são mais suscetíveis à oxidação.

A rancificação auto-oxidativa, uma das principais reações de deterioração dos alimentos, implica no aparecimento de sabores e odores anômalos conhecidos como ranço. Essa reação de deterioração provoca redução do valor nutritivo do alimento, e como conseqüência a perda de

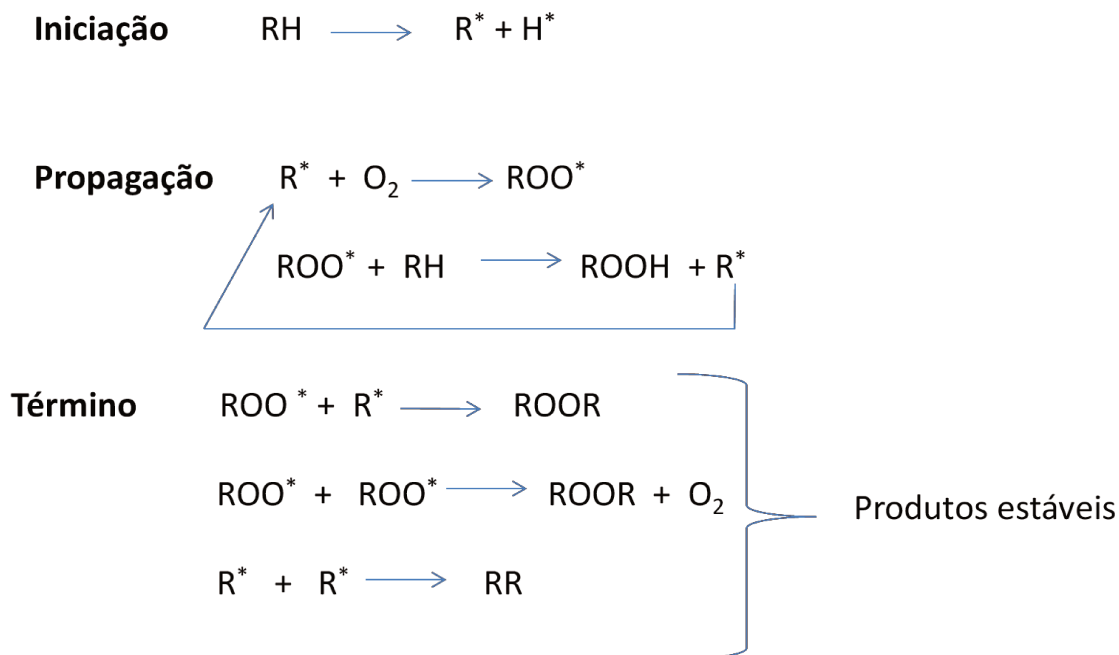
ácidos graxos essenciais, sendo alguns produtos, resultantes da reação, potencialmente tóxicos (Ordoñez *et al*, 2005).

A oxidação lipídica ocorre quando o oxigênio reage com lipídios em uma série de reações em cadeia dos radicais livres, e é que são freqüentemente iniciadas pela exposição dos lipídios à luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos ou catálise metalo-protéica, e que conduzem a complexas alterações químicas. A oxidação de lipídios em alimentos causa perdas na qualidade e, em seres humanos, pode causar diversas doenças como câncer, aterosclerose e processos de envelhecimento (Atoui *et al*, 2005; Fukumoto e Mazza 2000).

Os principais substratos da reação de oxidação lipídica são os ácidos graxos insaturados, pois as ligações duplas são centros ativos que podem reagir com o oxigênio. Os ácidos graxos insaturados oxidam-se mais facilmente quando estão livres, e o grau de insaturação também influi na velocidade de reação. O efeito nocivo das reações de oxidação dos lipídios pode ser minimizado basicamente com refrigeração, acondicionamento e armazenamento adequados, embora a reação não seja detida por completo já que a auto-oxidação requer energia de ativação reduzida (Hamilton, 1994).

O mecanismo de reação da oxidação lipídica envolve alguns processos fundamentais. Na etapa de iniciação ocorre a formação de radicais livres devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula do ácido graxo, na presença de luz e calor. Na propagação, os radicais livres (moléculas susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico) são convertidos em produtos primários (outros radicais) da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando num processo autocatalítico. No término, os radicais combinam-se formando produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjos dos peróxidos (epóxidos, compostos

voláteis e não voláteis) (Jadhav *et al*, 1996). O mecanismo de reação da oxidação lipídica é mostrado na Figura 2.6:



RH = Ácido graxo insaturado;

R^* = Radical livre;

ROO^* = Radical peróxido;

ROOH = Radical hidroperóxido.

Figura 2.6: Mecanismo de reação da oxidação lipídica (Ramalho e Jorge, 2006).

Gordon (1990) classificou os antioxidantes em dois grupos, os primários e os secundários. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável. Podem-se incluir nesse grupo os compostos fenólicos, que apresentam grupos doadores de elétrons nas posições orto e para de sua cadeia cíclica. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais como, por exemplo, o ácido etilenodiaminotetracético e o ácido cítrico.

A origem das substâncias antioxidantes pode ser sintética ou natural. Atualmente, existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, embora tenham que cumprir certos requisitos para seu uso em alimentos, sendo um

deles a segurança para a saúde. Em geral, os antioxidantes sintéticos são compostos com estruturas fenólicas que apresentam vários graus de substituição alquil, ao passo que antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas), ou carotenóides, bem como ácido ascórbico.

Os antioxidantes sintéticos (Figura 2.7) como o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG) são utilizados para diminuir a fase de propagação da reação de oxidação. Entretanto, apresentam inconveniente de serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas. Os riscos à saúde associados com o consumo crônico dessas substâncias são preocupantes e continuam a ser estudados (Martinez-Tome *et al*, 2001).

Apesar da elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana desses compostos, a sua utilização tem sido controversa, pela suspeita de uma possível toxicidade e/ou mutagenecidade desses antioxidantes, fator que tem sido objetivo de estudos por muitos anos, e tem trazido um novo interesse aos antioxidantes naturais (Ribeiro *et al*, 2001).

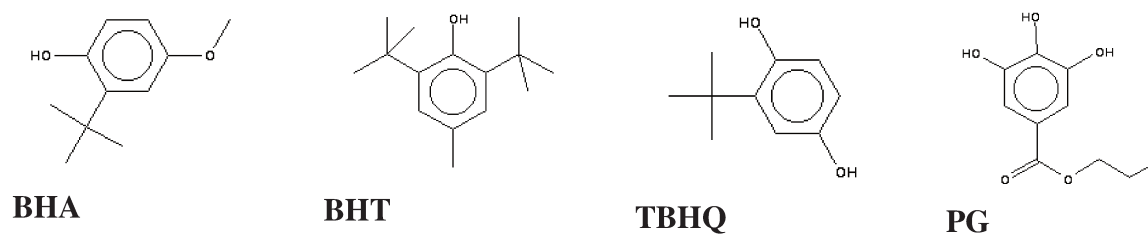


Figura 2.7: Antioxidantes sintéticos.

Há diversos relatórios recentes sobre o efeito do BHA na conversão de materiais ingeridos em substâncias tóxicas ou cancerígenas devido ao aumento da secreção de enzimas microsômicas do fígado e dos órgãos extra hepáticos, tais como os pulmões e a mucosa do

trato gastrointestinal. Além disso, tem sido relatado que o BHT é cancerígeno em ratos. Em adição o TBHQ não é aprovado para o uso em alimentos na Europa, Japão e Canadá (Ribeiro *et al*, 2001). Estudos revelam que a possibilidade dos antioxidantes BHA e BHT apresentarem certa toxicidade e eficiência inferior a alguns antioxidantes naturais, junto com uma maior consciência dos consumidores com relação à segurança dos aditivos em alimentos, cria a necessidade de identificar fontes naturais alternativas de antioxidantes para alimentos (Albu *et al*, 2004; Ribeiro *et al*, 2001).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de plantas. Muitas ervas e especiarias, utilizadas como condimentos em alguns pratos, são excelentes fontes de compostos fenólicos. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usadas como conservantes naturais para alimentos (Wang e Zheng, 2001). Muitas espécies incluindo alecrim, cravo, pimenta preta, gengibre, alho e cebola exibem atividade antioxidante em uma variedade de sistemas (Auroma *et al*, 1996). Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades funcionais (como antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído a sua ação antioxidante em alimentos (Balasundram *et al*, 2006).

Antioxidantes naturais extraídos de plantas podem ser usados como alternativas aos antioxidantes sintéticos, devido a seu efeito equivalente ou maior na inibição da oxidação lipídica. Alimentos ricos em antioxidantes têm sido apresentados como tendo papel essencial na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, sendo as mais conhecidas as doenças de Parkinson e Alzheimer, e problemas causados pelo envelhecimento das células (Bandoniene *et al*, 2002; Torre *et al*, 2001).

Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes. Esses compostos incluem flavonóides, ácidos fenólicos,

terpenos, tocoferóis, fosfolipídios, ácidos orgânicos polifuncionais e também extratos de plantas (Ribeiro *et al*, 2001).

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou a adoção de medidas que permitam limitar o fenômeno de oxidação durante fases de processamento e armazenagem dos produtos (escolha de processos que limitem as operações de arejamento e tratamento térmico; utilização de matérias-primas refinadas, com baixos teores de água e isentas de pró-oxidantes; armazenamento a baixas temperaturas em atmosfera inerte, adição de compostos antioxidantes, utilização de embalagens estanques e opacas a radiação UV, etc). Deste conjunto de ações a adição de compostos antioxidantes é sem dúvida uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, neutralidade organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade, são premissas para a sua seleção e utilização a nível industrial.

A interrupção da reação em cadeia de oxidação lipídica pelos antioxidantes em alimentos não está completamente elucidada, principalmente sob certos aspectos, como a interação entre os constituintes do meio. O emprego de antioxidantes em formulações é muitas vezes empírico, de tal modo que a garantia de sua eficácia nem sempre existe (Silva *et al*, 1999).

O antioxidante ideal deverá ser seguro do ponto de vista alimentar, não alterar o sabor, o aroma ou a cor do alimento, ser eficiente em baixas concentrações e a temperaturas de fritura e cozimento, ser facilmente incorporável no alimento, ser de fácil obtenção e de baixo custo.

É freqüente haver sinergismo entre os compostos com características antioxidantes, o que implica que o uso simultâneo de dois antioxidantes diferentes seja mais efetivo que a quantidade equivalente de qualquer um deles.

2.3.1 Alguns Métodos para extração de compostos antioxidantes ou substâncias bioativas em vegetais

Dentre os métodos conhecidos para extração de compostos antioxidantes de matrizes vegetais podemos citar os métodos tradicionais de extração que utilizam solventes orgânicos (etanol, éter, metanol dentre outros) e a extração supercrítica que mediante mudanças na pressão e na temperatura transforma qualquer fluido em um fluido supercrítico para a extração (Leal *et al*, 2003).

É importante esclarecer que conforme o método empregado para extração de um óleo volátil ou de um extrato, suas características químicas poderão ser totalmente alteradas fazendo com que as suas propriedades funcionais também sejam alteradas.

Para identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais é necessária a realização de extração com solventes de diferentes polaridades. As pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de comparar seus resultados e encontrar a melhor alternativa para sua aplicação em alimentos.

2.3.1.1 Extração com solventes orgânicos

Pesquisa realizada com folhas de *Blumea balsamifera*, mediante extração sequencial com éter, clorofórmio e metanol possibilitou a determinação da atividade antioxidante sequestradora de radical livre e a identificação de 11 tipos de flavonóides. O extrato metanólico apresentou a maior atividade antioxidante, seguida pelo extrato clorofórmico e pelo extrato etéreo (Nessa *et al*, 2004).

Anagnostopoulou *et al* (2006) estudaram uma variedade de extratos de cascas de laranja. Os extratos foram obtidos sucessivamente com tolueno, diclorometano e metanol, de acordo com o aumento da polaridade do solvente. A fração na qual o solvente acetato de etila foi empregado

pôde ser utilizada como eficiente antioxidante em alimentos e formulações medicinais, devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos e atividade seqüestradora de radicais livres encontrados na amostra. O extrato metanólico seco foi dissolvido em água aquecida e a solução particionada com éter dietílico, acetato de etila e butanol. Nesse estudo, os extratos foram comparados com os compostos de referência (Trolox (antioxidante análogo à vitamina E e solúvel em água)), ácido ascórbico e quercetina, por apresentarem atividade antioxidante conhecida.

A atividade antioxidante de folhas de orégano foi avaliada por Bendini *et al* (2002). Para a extração dos compostos fenólicos foram empregados quatro tipos de solventes: etanol, dietil éter, n-hexano:2-propanol 4:1 (v/v) e n-pentano. O melhor rendimento de extração foi obtido com etanol. O metanol, embora seja considerado o melhor solvente para compostos fenólicos, não foi utilizado devido à sua toxicidade e necessidade de ser totalmente removido depois da extração para que o extrato pudesse ser empregado como aditivo alimentício.

Em folhas de ginsengue (*Panax ginseng*), o extrato etanólico evidenciou maior ação seqüestradora de radical livre e atividade quelante de íons ferro. Além disso, conteve maior quantidade de compostos fenólicos (2.333,2 mg/100g) e flavonóides (1.199,1 mg/100g) do que os extratos aquoso e metanólico em extração seqüencial com água, etanol e metanol, respectivamente (Jung *et al*, 2006).

Yildirim *et al* (2001) determinaram a atividade antioxidante e antimicrobiana de *Rumex crispus* L., denominada popularmente como língua de vaca. As folhas secas do vegetal foram picadas e analisadas quanto ao melhor solvente para se efetuar a extração dos compostos fenólicos. Os solventes empregados foram éter etílico, etanol e água.

Frutos de sorva (*Sorbus domestica*) em diferentes estágios de maturação, cujos extratos foram obtidos com diclorometano, éter dietílico e acetato de etila, revelaram atividade seqüestradora de radical livre maior que a do Trolox. Essa propriedade foi atribuída ao conteúdo

total de compostos fenólicos presentes nos frutos. As amostras foram extraídas primeiramente com metanol e evaporadas, sendo os resíduos ressuspenos em água e depois particionados com os solventes correspondentes (Termentzi *et al*, 2006).

A água extrai com eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante devido à sua polaridade. Em estudo realizado com cogumelos “Ling Chih” (*Ganoderma tsugae*), o extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante, porém baixa concentração de compostos fenólicos (24 a 35,5 mg/g) (Mau *et al*, 2005a). Já no extrato aquoso, o teor de compostos fenólicos obtido foi de 40,86 a 42,34 mg/g (Mau *et al*, 2005b)

2.3.1.2 Extração supercrítica

As indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica têm interesse pela extração supercrítica para a substituição dos processos de extração convencionais (como a extração com solventes orgânicos e a hidrosdestilação) para obtenção de óleos voláteis e oleoresinas. A extração supercrítica produz extratos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis (Zancan *et al*, 2002).

O grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos excessivamente caros. Outras vantagens como, por exemplo, alta pureza dos extratos e a grande eficiência do processo podem torná-la viável para aplicação em alimentos (Herrero *et al*, 2006).

O CO₂ supercrítico está sendo utilizado para obtenção de tocoferóis a partir de soja (Del Valle *et al*, 2005) e para obtenção de subprodutos do azeite de oliva (Ibañez *et al*, 2000). Antioxidantes naturais têm sido extraídos a partir de plantas como a sálvia, que tem demonstrado atividade similar ou maior que a atividade de antioxidantes sintéticos (Señorans *et al*, 2000).

Owen *et al* (2000) relataram que no Centro de Investigação do Câncer de Heidelberg, na Alemanha foi estudado o potencial antioxidante e anticancerígeno de diferentes compostos fenólicos obtidos a partir do azeite de oliva.

A Tabela 2.5 mostra alguns dos antioxidantes naturais extraídos com CO₂ supercrítico.

Tabela 2.5 : Antioxidantes naturais extraídos com CO₂ supercrítico.

Matéria-prima	Compostos de interesse	Condições de operação		Referências
		T (°C)	P (bar)	
<i>Pistachia vera</i>	Antioxidantes	35-60	101-355	Goli <i>et al</i> (2005)
<i>Zingiber officinale</i> R	Gingeróis	20-40	150-200	Martinez <i>et al</i> (2003)
<i>Zingiber officinale</i> R	Gingeróis	20-40	100-300	Rodrigues <i>et al</i> (2002)
<i>Zingiber officinale</i> R	Gingeróis	20-35	200-250	Zancan <i>et al</i> (2002)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	Antioxidantes	40-60	100-400	Ramirez <i>et al</i> (2004)
<i>Coriander sativum</i>	Antioxidantes	58-85	116-280	Yépez <i>et al</i> (2002)
<i>Hierochloe odorata</i>	Antioxidantes	40	250-350	Grigonis <i>et al</i> (2005)

Grigonis *et al* (2005) estudaram a ação antioxidante de extratos de erva-doce americana, mediante três tipos de extração. Na primeira utilizaram aparelho de Soxhlet, na segunda microondas e na terceira dióxido de carbono supercrítico. Esse último foi considerado o método de extração mais eficiente com relação ao rendimento dos extratos e concentração de compostos bioativos, além dos aspectos ambientais.

Luengthanaphol *et al* (2004) compararam o rendimento e a atividade antioxidante de extratos de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) extraídos com CO₂ supercrítico e CO₂ supercrítico + co-solvente (etanol 10 %) com os extratos obtidos com etanol e acetato de etila. Verificaram baixo rendimento na extração com fluido supercrítico, porém a adição do co-

solvente melhorou significativamente a extração dos antioxidantes. Obtiveram extração mais efetiva utilizando etanol como solvente, na qual constataram menores valores no teste de peróxidos.

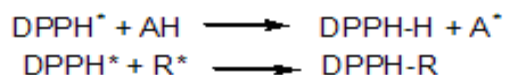
Os extratos de folhas de boldo obtidos sob alta pressão com CO₂ supercrítico apresentaram menor atividade antioxidante que os extraídos com água quente pressurizada (110 °C) e os obtidos em aparelho Soxhlet com metanol (Del Valle *et al*, 2005). Extratos de Aloe vera (*Aloe barbadensis*) obtidos com CO₂ supercrítico apresentaram menor atividade sequestradora de radical livre que os extratos etanólico, porém evidenciaram maior atividade antioxidante que o alfa-tocoferol e o BHT (Hu *et al*, 2005).

A extração de compostos antioxidantes presentes em ervas e especiarias tem demonstrado maior eficiência quando submetidos à extração supercrítica com CO₂. O rendimento e a atividade antioxidante de extratos de alecrim demonstraram resultados mais satisfatórios nessas condições, quando comparados com os processos de hidrodestilação e extração com etanol e hexano (Carvalho Jr *et al*, 2005).

2.3.2 Métodos de Avaliação da Atividade antioxidante

2.3.2.1 Método DPPH

Este método avalia a habilidade do antioxidante doar hidrogênio. O antioxidante reage com o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), convertendo-o em sua forma reduzida DPPH* conforme ilustra a reação.



Nesta reação a solução de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarelada e o grau deste descoloramento indica a habilidade do antioxidante de sequestrar o radical livre.

2.3.2.2 Reação acoplada do β -caroteno - ácido linolênico

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linolênico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas de descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linolênico.

2.3.2.3 Novos métodos de avaliação da atividade antioxidante

Embora os antioxidantes sejam reconhecidos como fitonutrientes importantes (Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, 2000), atualmente não há nenhum “antioxidante total” com um índice nutritivo disponível para o alimento devido à falta de métodos padrão quantitativos. Ao contrário de outros nutrientes, os antioxidantes são quimicamente diversos. Os antioxidantes mais comuns atualmente nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides, os flavonóides e os compostos do tiol (SH), etc. A diversidade química dos antioxidantes dificulta a separação e quantificação dos antioxidantes da matriz vegetal individualmente. Conseqüentemente, é desejável estabelecer um método que permita medir o nível de atividade antioxidante total diretamente dos extratos vegetais.

Recentemente, muitos métodos foram desenvolvidos para medida de atividade antioxidante total (Rice-Evans, 2000), capacidade antioxidante (Young, 2001; Kirschbaum, 2001) ou potencial antioxidante total (Lissi *et al*, 1995; Simonetti *et al*, 1997). Entre estes a capacidade antioxidante equivalente Trolox (TEAC) (Van de Berg *et al*, 1999), o potencial de adsorção radical total (TRAP) (Evelson *et al*, 2001), a redução férrica/poder antioxidante (FRAP) (Benzie *et al*, 1999) e a capacidade de absorver radicais de oxigênio (ORAC) (Cao *et al*, 1999) são representativos. Mecanicamente, estes métodos são baseados em uma única reação de

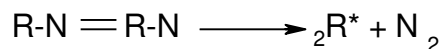
transferência de elétrons ou em uma reação de transferência do átomo de hidrogênio entre um oxidante e um radical livre.

O método ORAC (capacidade de absorver radicais oxigênio) é utilizado pelo USDA (United States Department of Agriculture) para selecionar alimentos com grande poder antioxidante, sendo conhecido como valor ORAC. Estes alimentos são destacados por apresentar proteção antioxidante *in vivo* para os consumidores por via alimentar. Este método está sendo utilizado por permitir uma medida global do poder antioxidante de substâncias puras e misturas como em frutas e extratos de plantas.

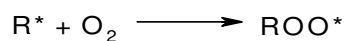
O teste ORAC é realizado em espectrofotômetro e consiste na medida da proteção exercida pelas moléculas contra a oxidação da fluoresceína pelo radical livre AAPH (2,2' – azobis 2 – amidino – propano diidrocloreto). Os resultados são dados referentes à proteção exercida por um composto de referência, o Trolox (Ou *et al*, 2002).

O princípio do ensaio ORAC foi desenvolvido inicialmente por Cao *et al* (1999) e melhorado significativamente por Ou *et al* (2001).

Ou *et al* (2001) identificaram os produtos oxidados da fluoresceína e o mecanismo de reação foi determinado. Na reação um mol de AAPH perde um dinitrogênio para gerar dois moles de um radical AAPH em uma taxa constante.

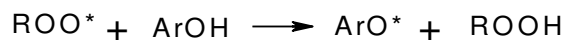


O radical AAPH reage com o oxigênio para formar um radical peroxil mais estável ROO*.



A perda de fluorescência da fluoresceína é uma indicação da extensão da sua reação com o radical peroxil. Na presença do antioxidante, o ROO* retira um átomo de hidrogênio desta para

formar um hidroperóxido (ROOH) e um radical antioxidante estável (ArO*), em consequência os danos à fluoresceína induzidos pelo radical peroxil são inibidos.



Ou *et al* (2001) mostraram que, sob circunstâncias experimentais de ORAC, a diminuição da fluorescência independe das concentrações de fluoresceína, mas dependem da concentração de AAPH. Assim, a taxa de reação é limitada pelo AAPH. A maioria das amostras não afeta a taxa de decomposição do AAPH, e o AAPH não reage diretamente com o antioxidante. Em consequência, o ensaio de ORAC mede diretamente a atividade antioxidante pelo mecanismo de quebra de corrente dos radicais peroxil. Ou *et al* (2002) sugerem que a ordem da atividade antioxidante de vegetais deve ser baseada em resultados ORAC. Estes pesquisadores analisaram em torno de 1000 extratos vegetais representativos e que fornecem dados valiosos para o estabelecimento de uma medida global do poder antioxidante de substâncias puras, misturas como em frutas e extratos de plantas.

2.4 Atividade antiinflamatória

As lipoxigenases (linoleato:oxigênio oxiredutase Ec 1.13.11.12) são isoenzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno, para formar hidroperóxidos (Bunker *et al*, 1995).

Os principais substratos das lipoxigenases em plantas superiores são os ácidos linoléico (C_{18:2}) e linolênico (C_{18:3}). As lipoxigenases vegetais estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como ácido traumático e ácido jasmônico (Anderson *et al*, 1989), crescimento e desenvolvimento (Hildebrand *et al*, 1989), senescência (Rouet-Mayer *et al*, 1992),

germinação de sementes (Croft *et al*, 1993), resposta a ferimento (Vieira *et al*, 2001) e reserva vegetativa (Stephenson *et al*, 1998).

A Figura 2.8 apresenta um esquema da reação de inflamação da lipoxigenase em seres humanos. A via das lipoxigenases faz parte de uma síntese mais complexa de eicosanóides. Estas são substâncias com 20 átomos de carbono derivadas de ácidos graxos essenciais responsáveis pela ação das prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos que exercem funções como, controle da pressão arterial, indução a agregação plaquetária e indução da resposta inflamatória, respectivamente (Cotran *et al*, 2000).

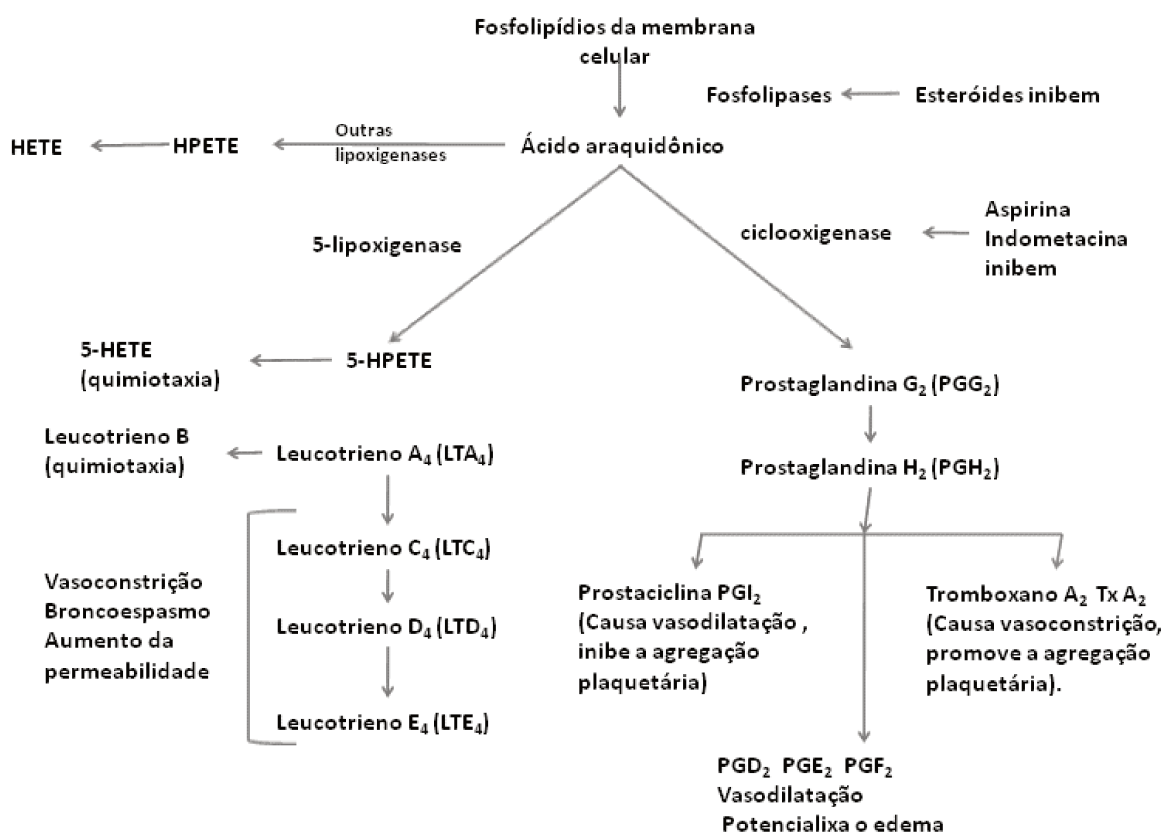


Figura 2.8: Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação (adaptado de Cotran *et al*, 2000).

O estudo da reação inflamatória e o desenvolvimento de novas terapias e drogas sempre dependeram de modelos animais e de reações modelo bioquímico *in vitro*. Do ponto de vista

laboratorial existem diversos métodos experimentais empregados na investigação do processo inflamatório. Estes métodos são bastante variáveis e analisam alguns aspectos do processo inflamatório (Garcia & Leme, 1979). Exemplos:

- os fenômenos vasculares precoces: dilatação, alterações de fluxo, dinâmica circulatória;
- as alterações da permeabilidade vascular;
- o desenvolvimento de edemas;
- a pesquisa de fatores quimiotáticos (responsáveis por recrutar células inflamatórias) e seu mecanismo;
- os processos fagocitários;
- a análise química e farmacológica de exsudatos inflamatórios e perfusatos de áreas inflamadas, para detecção de substâncias ativas (mediadores e enzimas);
- as alterações no sistema linfático;
- os processos cicatriciais.

A inibição da lipoxigenase de soja proposta como modelo bioquímico *in vitro*, avalia a ação antiinflamatória de drogas usadas no tratamento de Coliti ulcerativa (Allgayer *et al*, 1984).

2.5 Plantas

Plantas medicinais têm sido utilizadas como alternativa em vários países no tratamento de doenças. Os extratos e óleos voláteis de muitas plantas têm tido suas propriedades biológicas avaliadas *in vitro* e *in vivo*, a fim de elucidar e avaliar as propriedades terapêuticas atribuídas pela medicina popular.

Várias espécies aromáticas superiores são usadas na medicina popular por suas atividades biológicas e propriedades de inibição de fungos e bactérias.

Brasil, Cuba, Índia, Jordânia e México são países com flora de grande diversidade e rica tradição no uso de plantas medicinais (Duarte *et al*, 2005).

2.5.1 Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*)

A família das Verbenaceae compreende cerca de 170 gêneros e 2300 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, principalmente no hemisfério Sul (De Figueiredo *et al*, 2004).

Aloysia gratissima (Gill. & Hook.) Tronc. [sinônimos botânicos *Aloysia lycioides* Cham, *Verbena gratissima* Gill e Hook, *Lippia lycioides* (Cham.) Steudel] (Figura 2.9), muito difundida na medicina popular sul americana, é uma planta aromática, rica em óleo essencial, nativa da América do Sul. Esta planta apresenta uma grande variedade de nomes populares, sendo as denominações mais conhecidas no Brasil, “erva de nossa senhora”, “erva da graça” (Alice *et al*, 1995), “mimo do Brasil”, “garupa”, “erva da pontada”, “ervas das sepulturas” e “erva santa” (Castro e Chemale, 1995), “lavanda brasileira” (Ricciardi *et al*, 2006) e “alfazema brasileira” (Franco *et al*, 2007). Na Argentina, de acordo com Ricciardi *et al* (1999), é conhecida como “angel”, “organillo”, “azhar Del campo” e “niño rupá” (nome também utilizado pelos índios guaranis). No Uruguai é conhecida por “cedron del monte” e nos EUA por “withebrush”. Apresenta-se como um arbusto que alcança uma altura máxima de 3 metros. Ocorre como touceiras densas e desordenadas contendo espinhos nos ramos. Possui flores de coloração branca, dispostas em cachos ao longo dos ramos, muito perfumadas, florescendo de agosto a fevereiro (Franco *et al*, 2007).



Figura 2.9: Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima* (<http://www.wildflower.org/plants>)).

A Lavanda brasileira é amplamente utilizada na medicina tradicional. Infusões das partes aéreas desta planta são largamente utilizadas na Argentina por ser tônica eficiente para problemas estomacais e digestivos, por apresentar propriedades diaforética e afrodisíaca (Ricciardi *et al*, 2006). Na Bolívia esta planta é utilizada como sedativo e para problemas estomacais, no Paraguai e no Uruguai é utilizada por suas propriedades antiespasmódias (Bassols e Gurni, 1996). No Brasil as folhas frescas de lavanda brasileira são utilizadas para tratar distúrbios brônquicos e digestivos (Lorenzi *et al*, 2002).

Foram efetuadas investigações sobre os óleos voláteis obtidos a partir de partes aéreas de lavanda brasileira. Na maioria dos estudos de plantas coletadas na Argentina os principais compostos mencionados foram: monoterpenos (pinenos, limoneno, 1,8 - cineol), bem como sesquiterpenos (De Riscala *et al*, 1973; Toursarkissian, 1980). Pulegone (65,8%) foi mencionado no óleo de flores da espécie colhidas em Córdoba (Zygadlo *et al*, 1995), compostos sesquiterpênicos dominados por cadinol (17 - 33%) e óxido de cariofileno (11-15,8%) foram identificados em todo o extrato vegetal volátil (Bailac *et al*, 1999; Duschatzky *et al*, 2004).

Recentemente, Ricciardi *et al* (2006) reportaram a composição química do óleo de plantas colhidas em diferentes estações do ano em três localidades na província de Corrientes, Argentina. Foram observadas significativas variações na composição química; os constituintes majoritários foram: α -tujona (6,8 - 17,5%), β -elemeno (tr a 35.7%), viridiflorol (0,9 - 33,6%), β -cariofileno (1,8 - 28,0%), germacreno D (1,9 - 10,1%), biciclogermacreno (3,8 - 12,8%), (E)-nerolidol (tr a 11,6%) and 10-*epi*-cubebol (0,1 - 13,4%). O rendimento do óleo não mostrou diferenças significativas (0,7-1,3%) e o grupo dos sesquiterpenos foi predominante para todos os óleos estudados (57%-89,2%).

Análises químicas do óleo essencial obtido de flores (Soler *et al*, 1986a) e folhas (Soler *et al*, 1986b) de lavanda brasileira colhidas no Uruguai apresentaram quantidade significativa de sabineno para ambas as amostras, entretanto a quantidade de sesquiterpenos difere com a parte da planta: β -bisaboleno e copaenol foram os compostos majoritários das folhas e β -cariofileno, óxido de cariofileno e globulol foram os compostos majoritários presentes nas flores de *A. gratissima*.

De acordo com Bauer *et al* (1969), o óleo volátil de lavanda brasileira obtido de plantas brasileira apresentou em sua composição 1,8-cineol (3%), ésteres (9,7%), limoneno, alcoóis sesquiterpênicos e recentemente pulegone, limoneno, espatulenol, α -pineno, α -tujona e pinocanfene foram identificados (Trovati *et al*, 2003). Finalmente, o extrato hexânico de partes aéreas de plantas desta espécie colhidas em Goiânia apresentou em sua composição sesquiterpenóides como guaiol, bisabolol e espatulenol (Da Silva *et al*, 2006).

Investigações biológicas sobre óleos essenciais de lavanda brasileira indicaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Bailac *et al*, 1999) e significativa atividade fungicida contra *Ascosphaera apis*, responsável pelo

desenvolvimento de micoses (Dellacasa *et al* , 2003). Foi observado um efeito nematocidal contra o nematodo *Meloidogyne* (Duschatzky *et al*, 2004). Significativa atividade contra *Candida albicans* foi observada (MIC acima de 2,0 mg/mL) em uma amostra de lavanda brasileira colhida no Brasil mas, infelizmente, estes resultados foram relatados, sem qualquer informação sobre a composição química do óleo (Duarte *et al*, 2005).

2.5.2 Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*)

Plantas do gênero *Phyllanthus* têm sido largamente utilizadas na medicina tradicional na China, Filipinas, Nigéria, África, Caribe, América do Sul e Central no tratamento de diversos tipos de doenças (Thyagarajan *et al*, 1988 citado por Sánchez-Lamar *et al*, 2002).

Phyllanthus amarus, de gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), é uma erva anual, lisa, com folhas delgadas, ramificada de galhos pequenos e encontrada por toda parte quente da Índia e na maioria dos países tropicais (Puslhpangandan *et al*, 2001 citado por Rai *et al*, 2005). No Brasil é encontrada no nordeste do país e é popularmente conhecida como “quebra-pedra” por ser indicada no tratamento de litíase renal (Lorenzi e Matos, 2002). A Figura 2.1 apresenta uma foto da planta utilizada neste estudo.



Figura 2.10: Quebra pedra (*Phyllanthus amarus*) cultivada no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP.

Várias propriedades terapêuticas têm sido atribuídas às plantas do gênero *Phyllanthus*, como atividade antipirética, antibacteriana (Vinayagamoothy, 1982), antiparasítica (Omulokoli *et al*, 1997), anticonceptiva (Filho *et al*, 1996) e antiviral (Ott *et al*, 1997).

A planta tem emprego em práticas caseiras justificadas pelos efeitos: antiinflamatório (Kierner *et al*, 2003), antimutagênico (Sripanidkulchai *et al*, 2002), antiviral, capaz de controlar a replicação do vírus HIV (Notka *et al*, 2003) e atuar contra o vírus da hepatite B (Lorenzi e Matos, 2002).

Espécies como *Phyllanthus amarus* L. e *Phyllanthus emblica* apresentaram extratos brutos com atividades antioxidante e/ou proteção antigenotóxica (Dhir *et al*, 1990; Dhir *et al*, 1993, Gowrishanker e Vivekanandan, 1994 citados por Sánchez-Lamar *et al*, 1999).

A atividade antiviral contra o vírus da hepatite é a mais relevante propriedade descoberta desta planta (Venkateswaran *et al*, 1987; Thyajarajan *et al*, 1990). Estudos pré-clínicos foram desenvolvidos a fim de verificar a eficácia da utilização do extrato de *Phyllanthus orbicularis*

como alternativa no tratamento de Hepatite B e Herpes do tipo II (Del Bairro *et al*, 1995 citado por Sánchez-Lamar *et al*, 1999). Extrato aquoso de *Phyllanthus amarus* é utilizado tanto na medicina tradicional como na medicina popular devido a sua atividade antiviral.

Phyllanthus amarus e outras espécies de *Phyllanthus* têm demonstrado inibição contra o vírus HIV *in vitro* (Qian-Cutrone *et al*, 1996; Ogata *et al*, 1992).

Espécies químicas mostraram que o extrato de plantas do gênero *Phyllanthus* apresentam como constituintes compostos amargos, ácido ricinoléico, lignanas (filantina e hipofilantina), alcalóides e flavonóides (quercetina) (Symasundar *et al*, 1985).

A análise fitoquímica dos extratos de quebra pedra registra a presença de lignanas, quando extraídas com hexano (Kassuya *et al*, 2003), de triterpenóides quando extraídas com hexano, glicosídeos, flavonóides, alcalóides e taninas, quando extraídas com álcool, e alcalóides, taninas e saponinas, quando extraídas com água (Khatoon *et al*, 2005).

Dentre os antioxidantes naturais encontrados no extrato de quebra pedra estão as ligninas (Shahidi, 1997), as taninas, como a quercitina, e os flavonóides (Simic e Karel, 1980). Na extração de quercitina com a tecnologia supercrítica é recomendado o uso de um co-solvente que aumente a solubilidade da quercetina no fluido supercrítico, ou seja, que altere sua polaridade (Chafer *et al*, 2004). Do mesmo modo Chiu *et al* (2002) indicam o uso de etanol como co-solvente para aumentar a concentração de flavonóides quando extraído com CO₂ supercrítico.

Foram isoladas do extrato hexânico de quebra pedra frações ricas em lignanas como filtetralina, nirtetrakina e nirantina (Kassuya *et al*, 2003). Lignanas possuem relevantes propriedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatória, antiviral e imunomodulatória (MacRae e Towers, 1984).

Cândida *et al* (2006) estudaram a ação antiinflamatória do extrato hexânico de quebra pedra associado a presença de lignanas especialmente nirantina. Esta lignana causou pronunciada

atividade antiinflamatória e antialodínica quando associada com PAF (1-O-hexadecil-2-O-acetil-sn-gliceril-3-fosforilcolina) receptor.

O interesse pelas filantinas e hipofilantinas presentes nos extratos de *Phyllanthus* esta relacionada com as propriedades hepatoprotetora destas substâncias contra o tetracloreto de carbono e a galactosamina causadores de citotoxicidade em ratos (Symansundar *et al*, 1985).

Segundo Kumaran e Kurunakaran (2007) os extratos metanólico das plantas estudadas, todas do gênero *Phyllanthus*, mostraram elevadas atividades antioxidante e antiradical (DPPH), atividade de eliminação de superóxido ânion, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico e capacidade de quelar metais quando comparados com hidroxitolueno butilado (BHT) e ácido ascórbico.

O extrato metanólico de quebra pedra apresentou significativa atividade antimicrobiana contra *Shigella sp*, *E. coli*, *V. cholerae* e *S. aureus* e moderada atividade antimicrobiana contra *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Khebsiella* e *Streptococcus spp*.

Lim e Murtijaya (2007) mostraram que os métodos de secagem interferiram na atividade antioxidante da quebra pedra. O extrato metanólico da planta que sofreu secagem por microondas apresentou menor atividade antioxidante enquanto que extratos obtidos por hidrodestilação apresentaram significativa atividade antioxidante devido à grande solubilidade dos compostos, quebra dos constituintes celulares e hidrólise de taninas. Concluiu-se que a alta atividade antiradical dos extratos de quebra pedra sugere um grande potencial de aplicação na indústria como ingrediente de alimentos funcionais.

2.5.3 Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)

O Brasil é o centro mais importante de colheita de plantas do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) das Américas (Siqueira, 1988) encontradas principalmente nos estados da

Amazônia, São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Goiás (Vidal e Vidal *et al*, 1967; Terán, 1990; citados por Cortez, 1998). A Figura 2.11 apresenta uma foto do ginseng brasileiro.



Figura 2.11: Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) (<http://www.rain-tree.com/Plant-Images/sumapic.htm>)

No Brasil, várias espécies do gênero *Pfaffia*, pertencentes à família Amaranthaceae são utilizadas em substituição ao ginseng, sendo conhecidas como “ginseng brasileiro” e fáfia. Entre essas espécies são citadas: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, *Pfaffia iresinoides* Sprengel e *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze (Shiobara *et al*, 1992). Dentre os países da América do Sul, o Brasil se destaca como o mais importante centro de cultivo de plantas do gênero *Pfaffia* (Siqueira, 1988, citato por Freitas *et al*, 2004), uma das plantas medicinais nativas brasileiras mais empregadas nos últimos anos (Queiroga, 2004). O ginseng brasileiro está entre os maiores volumes de venda da indústria nacional de fitoterápicos (Comissão de Homeopatia e Fitoterapia do Sindufarm, 1995). O exemplo do ginseng, o uso de *Pfaffia* tornou-se uma panacéia, sendo popularmente denominada “para-tudo”, “suma” ou “corango” (Oliveira, 1986). Os produtos são, geralmente, rotulados como *P. paniculata* ou ginseng-brasileiro e as indicações fornecidas pelos

fabricantes são: “revigorante, regenerador celular, indicado para esgotamento físico e mental e falta de memória” ou “indicado como auxiliar no tratamento de irregularidades circulatórias, estresse, anemia, diabetes...” ou “indicado nos caso de fadiga física, intelectual e de indisposição em geral; contribui no tratamento de fraqueza sexual”.

O termo ginseng pode se referir a muitas plantas. A raiz seca da espécie *Panax ginseng*, conhecida como Ginseng coreano ou chinês, é uma famosa e preciosa erva usada por muitos anos como medicamento de cura e tônico na China, Coréia e Japão (Wu *et al*, 2005). Entre seus diversos efeitos sobre o sistema nervoso, o Ginseng é conhecido principalmente por ser um estimulante do aprendizado e da memória (Qiao *et al*, 2005). Os mais importantes princípios ativos do Ginseng são as saponinas, compostas por vários ginsenosídeos e exercem inúmeros efeitos sobre o estresse e o sistema imunológico (Kim *et al*, 2003)

Os principais compostos presentes no ginseng brasileiro que constam na literatura são: sitosterol, estigmasterol, alantoína, ácido pfáffico e os pfaffosídeos A, B, C, D, E e F (Takemoto *et al*, 1983; Nishimoto *et al*, 1984; Nakai *et al*, 1984), sendo que os mesmo autores detectaram efeito inibitório do ácido pfáffico e dos pfaffosídeos no crescimento de células tumorais de melanoma B-16 (modelo para estudos de tumores metastáticos, tendo afinidade quase que exclusiva para o tecido pulmonar). O tumor pode ser mantido na forma de cultura de células, sendo implantado no tecido celular subcutâneo em ratos. A estrutura química do ácido pfáffico é apresentada na Figura 2.12.

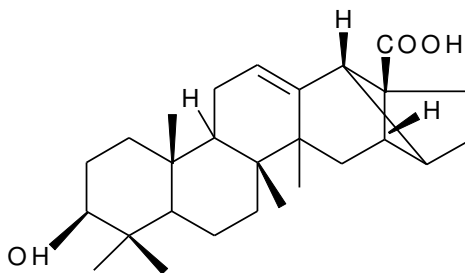


Figura 2.12: Estrutura química do ácido pfáffico (Rates e Gosmann, 2002).

Após a descoberta do ácido pfáffico, presente nas raízes de *Pfaffia paniculata* o interesse no estudo das espécies do gênero vem crescendo devido à atividade antitumoral deste ácido (Nishimoto *et al*, 1984).

A raiz moída do ginseng brasileiro era usada por índios da América do Sul para uma série de pequenas enfermidades e segundo De Araujo *et al*, 1994 citado por Ballas, 2000, contribui para o melhoramento do quadro da “Doenças das Células Frágeis”, doença que atinge as células sanguíneas tornando-as deformadas. Ballas (2000) estudou o efeito do ginseng brasileiro no processo de hidratação de eritrócitos deformados *in vitro* e concluiu que a utilização da espécie sozinha ou combinada com outros agentes é uma alternativa eficaz no tratamento deste tipo de doença.

Mazzantine e Braghirolli (1994) citados por Neto *et al* (2005), reportaram atividade analgésica e antiinflamatória do extrato bruto de ginseng brasileiro. Esteróis e outros compostos presentes nas raízes de ginseng brasileiro apresentaram atividade antineoplásica e estudos mostraram que esteróis (stigmasterol e sitosterol) adicionados a dieta reduzem o colesterol (Cleghorn *et al*, 2003 e Ling e Jones, 1995), apresentam ação antiinflamatória (Aboutabl *et al*, 2002 e Navarro *et al*, 2001), efeito analgésico e antiinflamatório (Aboutabl *et al*, 2002 e Villaseñor *et al*, 2002).

O ginseng brasileiro é comercialmente acessível como cápsulas contendo raízes em pó, misturadas ou não com extratos etanólicos destas plantas (Matsuzaki *et al*, 2003). Os extratos supercríticos sem co-solvente de ginseng brasileiro, obtidos por Leal *et al* (2005(a)), entre as diferentes pressões (100 a 300 bar) e temperaturas (30 °C e 50 °C) estudadas, exibiram atividade antioxidante praticamente constante e menor que a dos extraídos por hidrodestilação e extração com solvente orgânico.

Capítulo 3 – Material e Métodos

Neste capítulo são apresentados e descritos os materiais e métodos utilizados para determinação de parâmetros de processo da obtenção dos extratos por extração supercrítica, de três plantas (lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro) conforme Figura 3.1.

Inicialmente, foram realizados experimentos para determinação do rendimento global de extração supercrítica, sendo este um importante parâmetro de processo que informa a quantidade de substâncias extraíveis da matriz vegetal a determinadas temperatura, pressão e S/F. Paralelamente, foram realizadas extrações à baixa pressão (LPSE) e hidrodestilação a fim de verificar a influência do método de extração utilizado no rendimento global, na composição dos extratos e em suas atividades biológicas. Na sequência foram realizadas as análises do perfil de composição dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração. As técnicas empregadas para avaliação da composição dos extratos foram Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC) e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM). A atividade biológica dos extratos também foi avaliada. As técnicas empregadas foram método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), o método ORAC (capacidade de absorver radicais de oxigênio) e o método da reação acoplada beta-caroteno e ácido linolênico para determinação da atividade antioxidante dos extratos e método da determinação da atividade inibitória da lipoxigenase de soja para avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos.

Os experimentos de extração foram realizados no LASEFI – Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Naturais, DEA/FEA - UNICAMP.

A identificação dos compostos presentes no óleo volátil e no extrato SFE de lavanda brasileira e as determinações da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e pelo método ORAC e a avaliação da atividade inibitória da lipoxigenase (atividade antiinflamatória) dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro foram realizadas no Laboratoire de Chimie Biomoléculaire, ENSCM, Montpellier, França.

Os fluxogramas Figura 3.2 – 3.4 mostram as etapas do estudo realizado com cada planta.

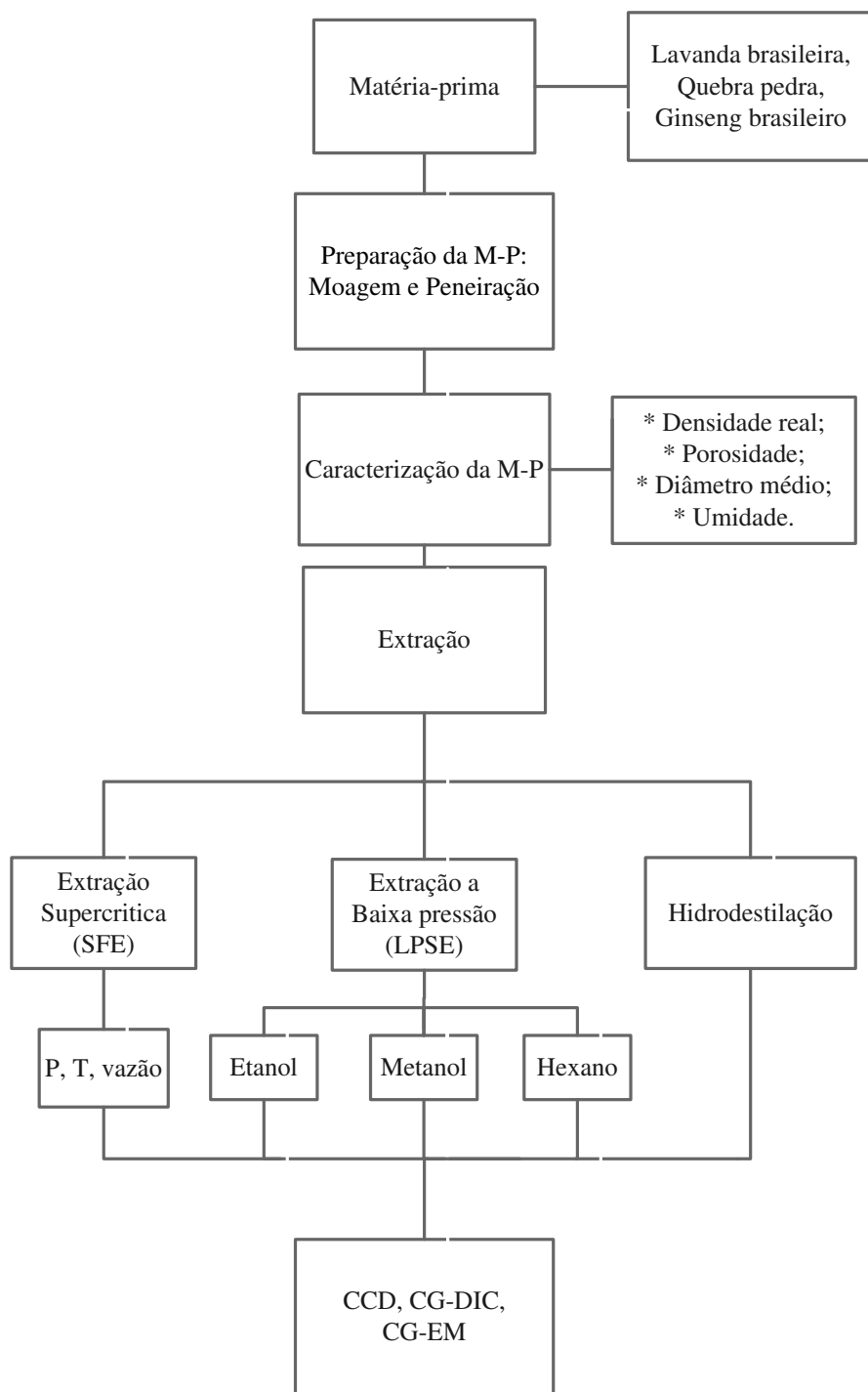


Figura 3.1: Fluxograma esquemático da metodologia de trabalho.

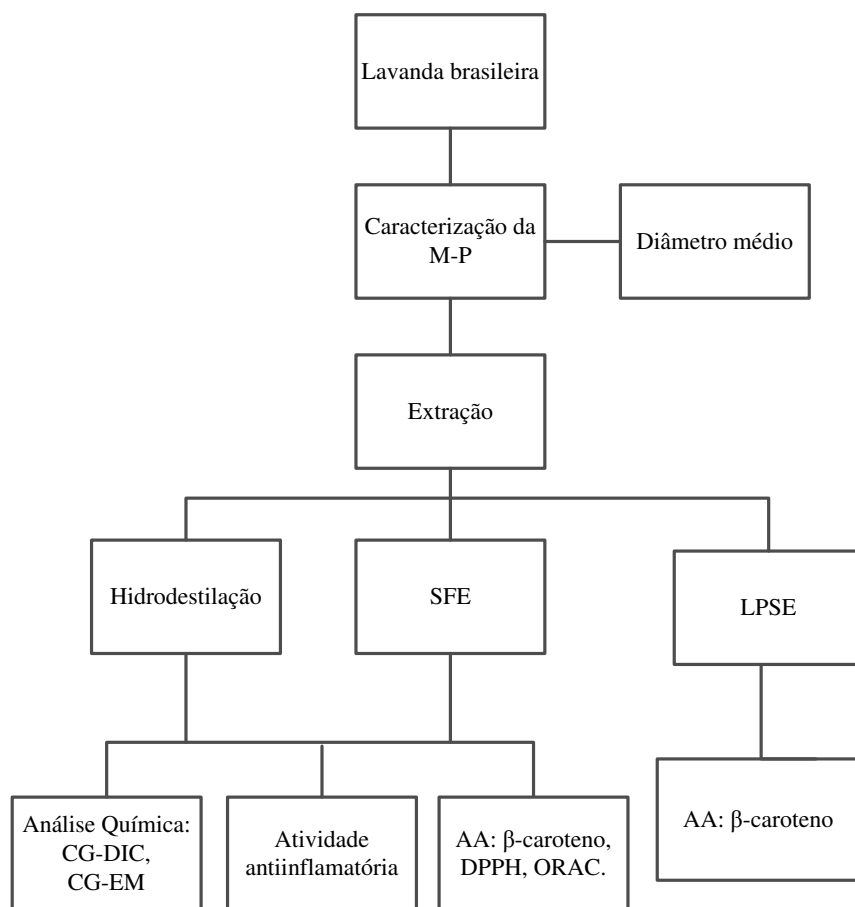


Figura 3.2: Fluxograma do estudo realizado com a lavanda brasileira.

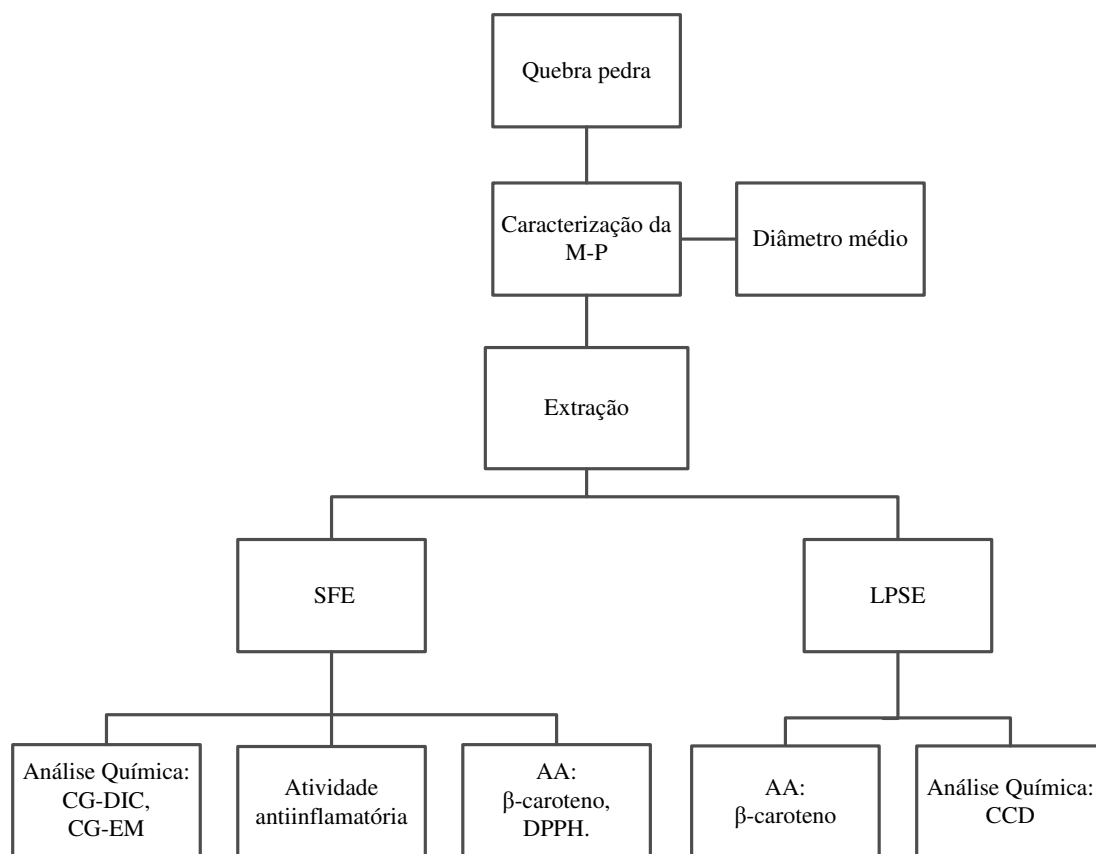


Figura 3.3: Fluxograma do estudo realizado com a quebra pedra.

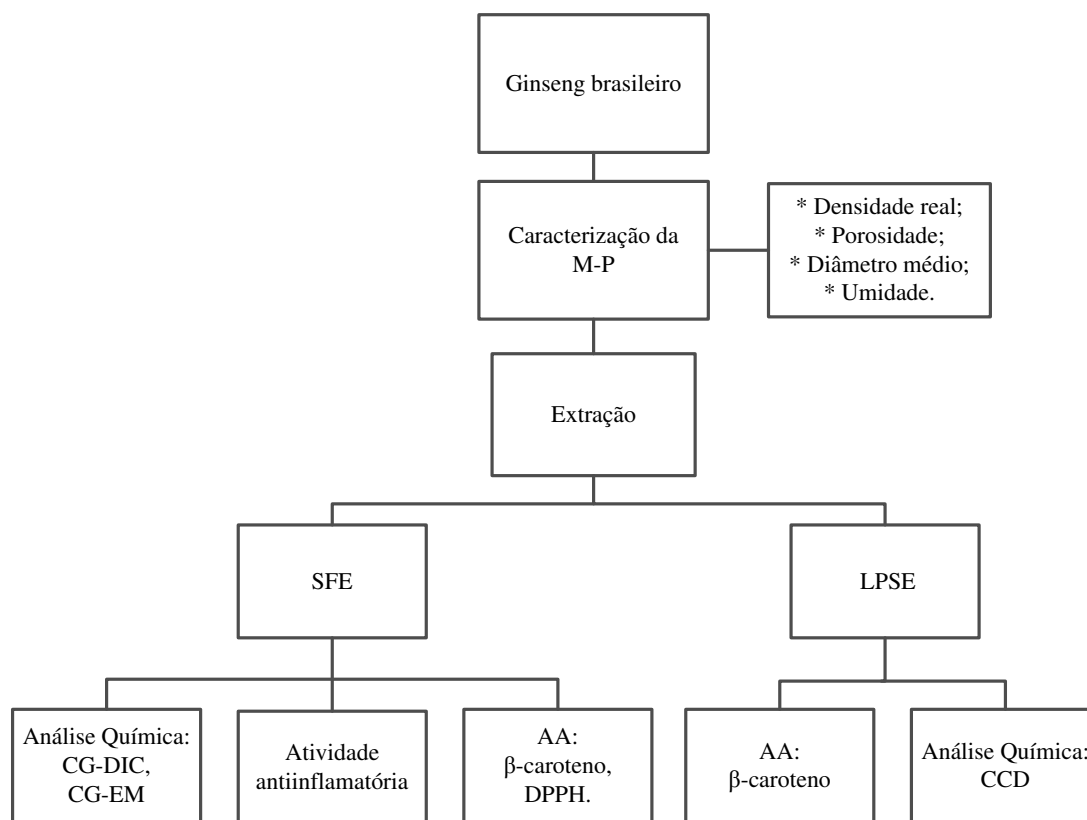


Figura 3.4: Fluxograma do estudo realizado com o ginseng brasileiro.

3.1 Seleção e preparo das matérias-primas

As plantas aromáticas e/ou medicinais foram cultivadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP. As plantas foram coletadas e secas a 40 °C e acondicionadas em sacos plásticos à temperatura ambiente. As matérias-primas foram trituradas em moinho (Tecnal, modelo TE-631, Piracicaba, SP) e peneiradas por 20 minutos, utilizando uma série de peneiras Tyler (W.S. Tyler, EUA) com aberturas mesh 16, 24, 32, 48 com agitação mecânica num agitador magnético (Bertel, São Paulo, SP). As massas retidas em cada uma das peneiras foram pesadas em balança semi-analítica (Marte, modelo AS 2000 ± 0,01g, ARTLAB, São Paulo, SP) imediatamente acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em freezer (Metalfrio, modelo DA 420, São Paulo, SP) –10°C.

Lavanda brasileira

Data de colheita: Novembro 2005 e Maio 2006

Parte da planta utilizada: folhas, flores e talos.

A espécie foi identificada por Gillies & Hook. Tronc (Gillies, John; Hooker, William Jackson; Troncoso, Nélida Sara) voucher espécimes specimens UEC 121.393 foi depositada no Herbarium 501 do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

Quebra pedra

Data de colheita: Março 2005

Parte da planta utilizada: folhas, frutos e talos

Fornecida pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

Ginseng brasileiro

Data de colheita: Maio 2004

Parte da planta utilizada: folhas e talos

Fornecida pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

3.2 Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas foram caracterizadas quanto à umidade, distribuição do tamanho das partículas, porosidade, densidade real e aparente. As propriedades de transporte, como porosidade do leito e a densidade das partículas foram utilizadas na modelagem matemática das curvas de extração.

3.2.1 Umidade

A umidade da matéria-prima (ginseng brasileiro) foi determinada pelo método da destilação com solvente imiscível xilol (Jacobs, 1973). Este método é indicado para matérias-primas que contêm material volátil. O equipamento utilizado para determinação da umidade é constituído de um condensador, um coletor graduado que recebe água evaporada da amostra, uma manta de aquecimento e um balão de 250 mL.

Para o experimento, foram utilizados 16 g de folhas de *P. paniculata* imersa em 130 mL de xilol (Ecibra, lote 16150, São Paulo, SP). Conectou-se o tubo coletor graduado ao condensador e ao balão, ligou-se a manta de aquecimento e iniciou-se o refluxo até o volume de água permanecer constante. A umidade da amostra foi calculada pela Equação (3.1).

$$U = \frac{V \times \rho_{CO_2}}{F} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde: U = é a umidade; V = volume de água condensada (m³); ρ_{CO_2} = densidade da água (kg/m³); F = massa de alimentação (kg).

3.2.2 Diâmetro médio das Partículas

Para determinação do diâmetro médio das partículas foi utilizada a metodologia para cálculo do diâmetro médio geométrico (d_{mg}), de acordo com o método (ASAE S 319.2) pela ASAE Standard (ASAE, 1993):

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

Onde: $\bar{d}_i = \sqrt[0,5]{d_i \cdot d_{i+1}}$; 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 retida na i-ésima peneira; n = número de peneiras.

3.2.3 Densidade Real e Aparente

A determinação da densidade real das partículas foi efetuada através da técnica de picnometria com gás Hélio. Esta análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp. A densidade aparente (Equação 3.3) foi calculada através da massa de matéria-prima utilizada nas extrações e o volume da célula extratora (kg/m^3).

$$d_a = \frac{m}{V} \quad (3.3)$$

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

3.2.3 Porosidade

A porosidade do leito (ε) e das partículas foi calculada utilizando a densidade real das partículas e a densidade aparente do leito, pela Equação 3.4.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (3.4)$$

Onde: d_r = densidade real

3.3 Determinação da densidade do solvente

A densidade do dióxido de carbono (CO_2), empregado como solvente supercrítico foi determinada para as condições operacionais através das tabelas de Angus *et al* (1976), baseada em dados experimentais.

3.4 Métodos de Extração

Os métodos de extração descritos a seguir foram realizados baseados nos tipos de compostos existentes em cada planta. A hidrodestilação foi realizada somente para extração da lavanda brasileira, pois esta planta apresenta óleo volátil, as demais plantas não apresentam óleo volátil. A extração à baixa pressão e a extração supercrítica foram realizadas para obtenção de extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro.

3.4.1 Extração supercrítica (SFE)

As extrações supercríticas da lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro foram realizadas utilizando duas unidades de extração: Unidade de extração Spe-ed SFE e Unidade de extração LASEFI-TUHH, descritas a seguir.

3.4.1.1 Unidade de extração Spe-ed SFE

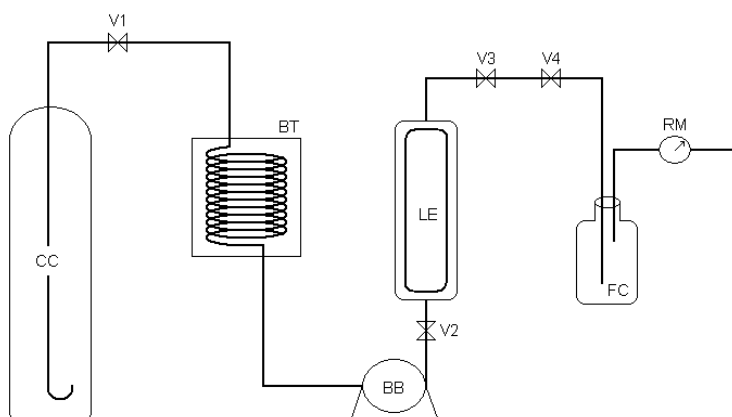
A unidade de extração supercrítica Spe-ed SFE (Applied Separations, Allentown, EUA), com coluna de 3 mL (Thar Desings CL 1165, Pittsburgh, EUA), pode ser visualizada na Figura 3.5, e seu esquema é mostrado na Figura 3.6.

A unidade consta de: (1) cilindro de CO_2 (99% de pureza, Gama Gases especiais, Campinas, SP); (2) banho de resfriamento (PolyScience, modelo 9110, Niles, EUA);. (3) unidade

de bombeamento (Applied Separation, Allentown, EUA) e unidade de controle de temperatura (Applied Separation, Allentown, EUA).



Figura 3.5: Unidade de extração Spe-ed SFE (Applied Separations, Allentown, EUA).



CC – cilindro de CO₂
 BT – banho termostático
 BB – bomba
 LE – leito de extração
 FC – frasco de coleta do extrato
 RM – rotômetro

Válvulas
 V1 – saída do cilindro de CO₂
 V2 – entrada do extrator
 V3 – saída do extrator
 V4 – micrométrica (controle de vazão)

Figura 3.6: Esquema da unidade de extração Spe-ed SFE (Applied Separations, Allentown, EUA) (Vasconcellos, 2007).

Procedimento Experimental

- a) Ligar o banho de resfriamento de CO₂ duas horas antes do início do experimento. A máxima temperatura do banho deve ser de -5 °C;
- b) Verificar se as válvulas de entrada, saída e de ventilação estão fechadas;
- c) Ligar as unidades de controle de temperatura e de bombeamento;
- d) Conectar a coluna de extração devidamente preenchida com a matéria-prima na linha da unidade de controle de temperatura. O termopar deverá estar conectado junto à coluna de extração;
- e) Aumentar a pressão com o botão regulador da unidade de bombeamento até a pressão de operação;
- f) Abrir o cilindro de CO₂;
- g) Abrir a válvula de alimentação de CO₂ para pressurizar a coluna e o sistema;
- h) Regular o indicador de temperatura na temperatura de operação;
- i) Atingidas as condições operacionais, regular o indicador da temperatura da válvula micrométrica para evitar o congelamento pelo efeito Joule-Thompson;
- j) Quando estas condições forem atingidas, abrir a unidade de controle de temperatura para verificar se não há vazamento na coluna de extração ou na linha do sistema;
- k) Conectar o(s) frasco(s) coletor(es) e a coluna de adsorção (porapack);
- l) Abrir a válvula de saída e micrométrica vagarosamente, até conseguir a vazão de solvente de operação;

Cabe mencionar que antes do início desta sequência operacional a coluna de extração deverá estar corretamente preenchida com o material e os frascos de coleta deverão estar pesados.

Finalizado o experimento, o seguinte procedimento deve ser seguido:

- a) Fechar a válvula de alimentação de CO₂. As válvulas de saída e micrométrica deverão ficar abertas para despressurizar a coluna;
- b) Desligar os botões de aquecimento da unidade de controle de temperatura;
- c) Esperar resfriar o sistema e retirar a coluna de extração;
- d) Limpar a linha de saída com etanol e/ou acetato de etila,
- e) Desligar o banho de resfriamento da bomba de CO₂;
- f) Diminuir a pressão com o botão regulador da unidade de bombeamento até a pressão do cilindro;
- g) Desligar as unidades de bombeamento e controle de temperatura;
- h) Fechar o cilindro de CO₂.

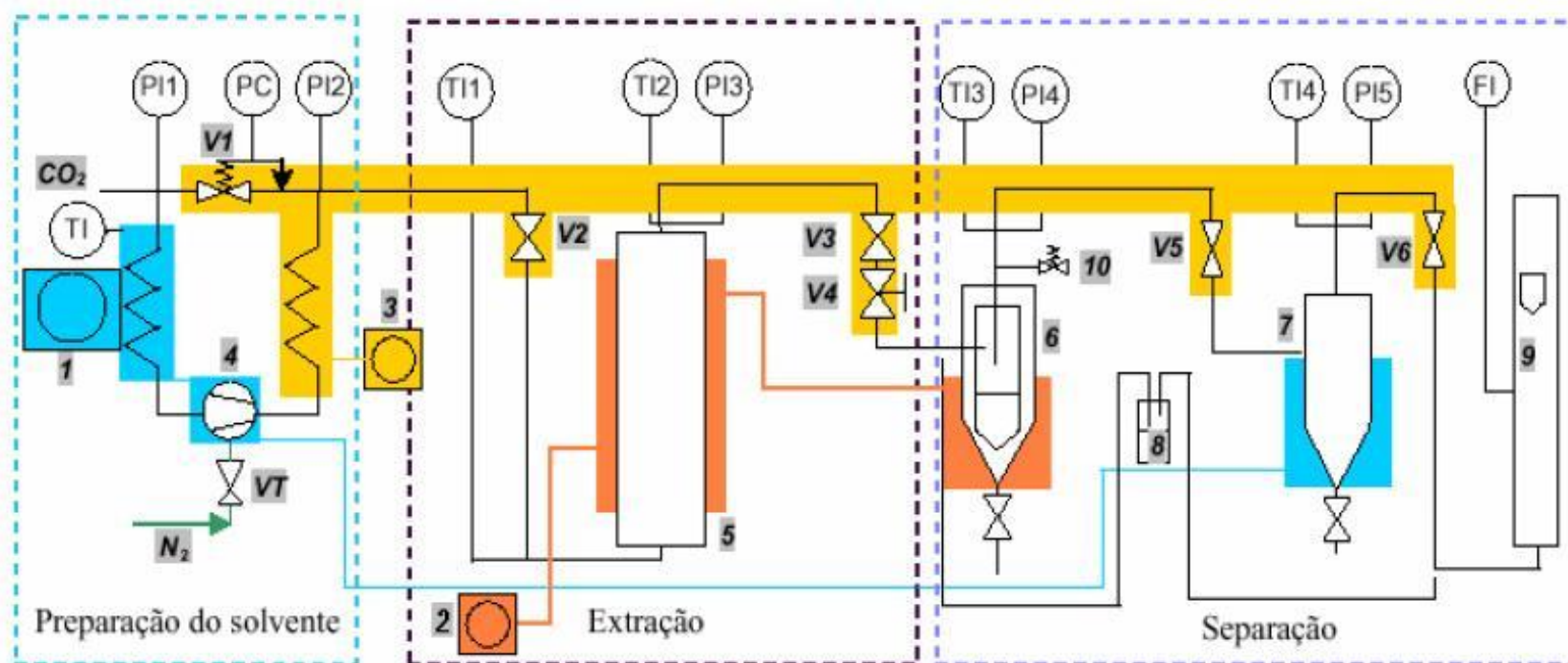
3.4.1.2 Unidade de extração LASEFI_TUHH

Na Figura 3.7 é apresentada a unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH. Este equipamento foi construído no âmbito do projeto de cooperação internacional “Supernat” (CNPq/Brasil e DLR/Alemanha), entre o Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Naturais LASEFI/FEA/UNICAMP (Campinas, Brasil) e a Arbeitsbereich Thermische Verfahrenstechnik – Technical University Hamburg Harburg (TUHH) (Hamburgo, Alemanha). O equipamento foi descrito por Zetzl et al (2003). A unidade consta de três seções: (i) preparação do solvente, (ii) extração e (iii) separação. A Figura 3.8 mostra o diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH. Na seção preparação do solvente, a unidade possui um cilindro de CO₂ pressurizado, um banho de refrigeração que usa uma mistura de água e etileno glicol, mantida a -10 °C e uma bomba de ar para pressurizar o sistema. Na seção de extração, a unidade consta de uma coluna de extração encamisada, construída em aço inoxidável. A capacidade do extrator é de 100 cm³, tendo 2 cm de diâmetro e

32 cm de altura. O sistema de aquecimento é constituído por um banho termostatzado com controlador digital de temperatura. Na seção de separação, a unidade é formada por dois separadores colocados em série sendo o primeiro um separador ciclônico. Adicionalmente, a unidade também inclui válvulas micrométricas, válvulas de regulagem, um medidor de vazão e manômetros.



Figura 3.7: Unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH.



- 1- Resfriamento de CO_2
- 2- Sistema de aquecimento da coluna
- 3- Sistema de aquecimento das válvulas de expansão
- 4- Bomba de CO_2 – Air driven (“Booster”) 1:110
- 5- Extrator encamisado (100 cm^3)
- 6- Ciclone encamisado
- 7- Separador encamisado
- 8- Linha de coleta alternativa
- 9- Medidor de vazão

- TI1 - Temperatura na entrada do extrator
- TI2 - Temperatura na saída do extrator
- TI3 - Temperatura na saída do ciclone
- TI4 - Temperatura na saída do separador
- PI 1 - Pressão do cilindro de CO_2
- PI 2 - Pressão do ciclo de preparação do CO_2
- PI 3 - Pressão do extrator
- PI 4 - Pressão do ciclone
- PI 5 - Pressão do separador

- VT - válvula de estrangulamento
- V1 - regulador de pressão
- V2 - válvula de entrada do extrator
- V3 - válvula de saída do extrator
- V4 - válvula agulha
- V5 - válvula de regulação – pressão do ciclone
- V6 - válvula de regulação – pressão do separador

Figura 3.8: Diagrama da unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH (Adaptado de Zetzi *et al*, 2003).

Procedimento experimental:

- a) Verifica-se se o sistema está limpo e se o cilindro de CO₂ tem a quantidade suficiente de gás para a realização do experimento;
- b) O banho de resfriamento de CO₂ é ligado duas horas antes do início do experimento.
- c) Meia hora antes do início do experimento liga-se o sistema de aquecimento das válvulas de expansão e o sistema de aquecimento da coluna de extração. Selecionam-se as temperaturas de operação;
- d) Empacota-se o leito (se forem utilizadas esferas de vidro, deve-se colocá-las na base do extrator, na entrada do CO₂);
- e) Verifica-se que todas as válvulas estejam fechadas.
- f) Abre-se o cilindro de CO₂;
- g) Para pressurizar a Seção de Extração, abre-se a válvula de entrada do extrator (V2);

Atingidas as condições de operação, escolhe-se uma das duas alternativas seguintes:

- Se os ciclones não forem utilizados, conecta-se a linha de saída do extrator diretamente à linha alternativa (8) – diretamente para o frasco coletor, abre-se as válvulas V3 e micrométrica (V4) vagarosamente até atingir a vazão de solvente do ensaio.
- Caso contrário, conecta-se a linha de saída do extrator diretamente ao ciclone (6) e separador (7), abre-se as válvulas V3 e V4 até atingir a pressão do ciclone (6), e na sequência, abre-se as válvulas V5 e V6 para regular a vazão do solvente.

3.4.2 Extração a baixa pressão com solvente orgânico (LPSE)

A técnica utilizada para obtenção de oleoresinas e para co-extração de compostos consiste basicamente em uma extração com solvente a frio realizada apenas para amostras sólidas. A

extração a baixa pressão foi realizada com etanol (Ecibra, lote 17048, São Paulo, SP), metanol (Synth, lote 33176, Diadema, SP) e hexano (Merck, lote K33280374 420, Darmstadt, Alemanha) para as plantas em estudo.

Procedimento: colocou-se em torno de 0,5 g de matéria-prima seca e 4 mL de solvente em frascos de 10 mL. Segundo método de Pesek *et al* (1985), os frascos foram centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm em centrífuga (Jovan, modelo BR4i, St. Herblain, França), depois mantidos em repouso por 30 minutos. O material foi filtrado a vácuo e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador (Laborota, modelo 4001, Viertrieb, Alemanha) a 50 °C e 120 mbar. Os extratos assim obtidos foram colocados em frascos de penicilina pesados e acondicionados em freezer doméstico.

3.4.3 Hidrodestilação

O aparelho Schilcher (Figura 3.9) foi utilizado para a obtenção de óleo essencial de lavanda brasileira segundo o método da A.O.A.C número 962.17 (1987). O equipamento utilizado para a hidrodestilação é composto por: manta aquecedora (1), balão de vidro (2), condensador (3) e tubo coletor graduado. A quantidade de matéria-prima usada foi aproximadamente 40 g de *Aloysia gratissima*. A matéria-prima foi inserida em um balão de 1000 mL e acrescentada de água destilada até cobrir o material vegetal (proporção 1:10). Este balão foi aquecido permitindo a ebulição e o refluxo de água num período de 2 h, após este período o processo foi interrompido e o óleo essencial foi separado da água por diferença de densidade.

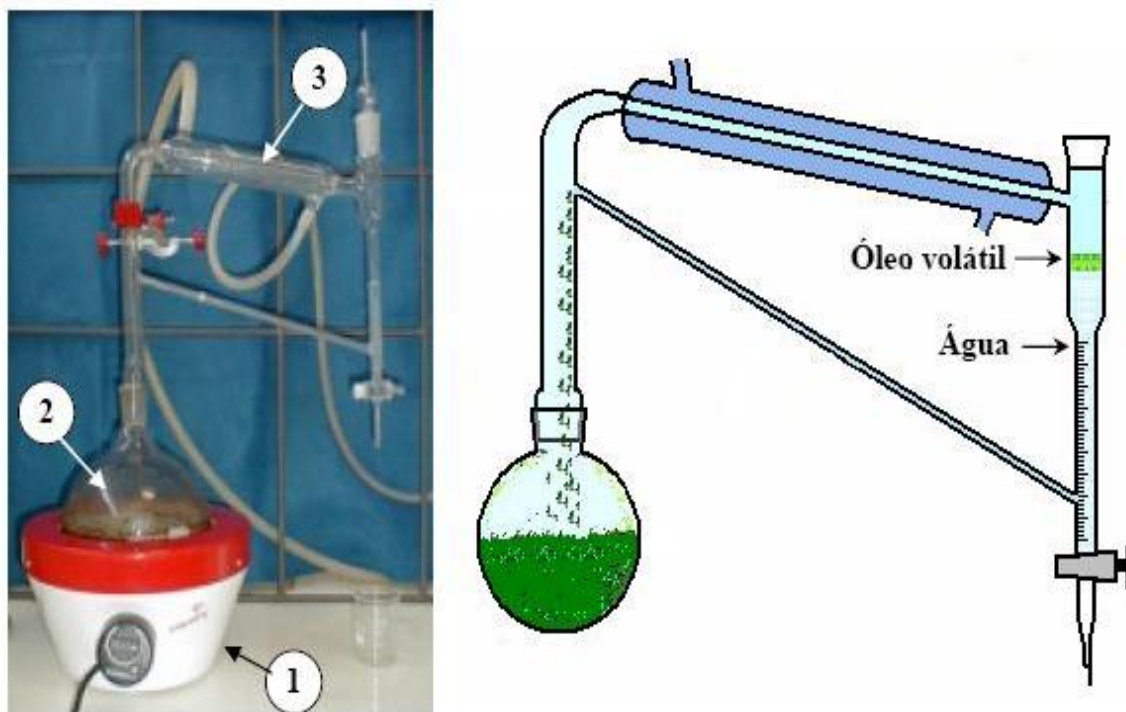


Figura 3.9: Unidade experimental de Hidrodestilação (Aparelho Schilcher)

3.4.4 Estudos do sistema matéria-prima + CO₂

3.4.4.1 Determinação do rendimento global

O rendimento global de extração (X_0) indica a quantidade de solúveis presentes na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão e S/F (Meireles, 2003).

Os rendimentos globais de extração dos sistemas lavanda brasileira + CO₂, quebra pedra + CO₂ e ginseng brasileiro/CO₂ foram determinados para diferentes condições de processo. As condições de extração para ginseng brasileiro foram de 30, 40 e 50 °C com pressões variando de 100 a 300 bar. Para o quebra pedra e lavanda brasileira, as temperaturas foram de 40 e 50 °C e as pressões variaram de 100 a 300 bar. A massa de matéria-prima seca utilizada nas extrações variou entre 1,50 g e 3,00 g, a vazão de CO₂ foi de $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e o período de duração das extrações foi de 2 horas. Portanto a massa de solvente foi constante e igual a 0,504 kg CO₂; os ensaios

foram realizados em duplicata e o valor final de X_0 foi obtido com a média dos valores experimentais. Para determinação do rendimento global de extração foi utilizada a unidade de extração supercrítica Spe-ed SFE.

3.4.4.2 Determinação das curvas globais de extração (OEC)

Os experimentos cinéticos foram realizados na unidade de extração supercrítica LASEFI_TUHH.

O sistema estudado foi do ginseng brasileiro. As condições operacionais foram de 250 bar, 40 °C e $7,05 \times 10^{-5}$ kg/s. A quantidade de matéria-prima utilizada 5 g e 30 g. O tempo de coleta variou conforme a etapa de extração. Variou de 10 em 10 minutos até 200 minutos, após variou de 30 em 30 minutos até 380 minutos e finalmente variou de 60 em 60 minutos até o final da extração aos 620 minutos.

3.4.4.3 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos das OEC

Os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com o procedimento descrito por Rodrigues *et al* (2002). A metodologia de Gauss-Newton para obtenção dos parâmetros de extração através do ajuste linear e não linear de duas e três retas à curva experimental, pode ser realizada utilizando o software SAS Learning Edition. As estimativas iniciais dos pontos de intersecção foram feitas por uma análise visual das curvas de extração.

3.5 Análise química

Nesta etapa foi realizada a identificação dos compostos presentes nos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro obtidos mediante hidrodestilação, extração com solvente orgânico (LPSE) e extração supercrítica (SFE). Os extratos obtidos pelas diferentes

técnicas foram inicialmente submetidos a cromatografia em camada delgada para verificar a presença de compostos de maior massa molecular como triterpenos, saponinas, flavonóides e pigmentos. Estas análises foram realizadas para os extratos de quebra pedra e ginseng brasileiro. Na etapa seguinte, os extratos foram submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) para análise qualitativa de seus constituintes e, posteriormente, a cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG-DIC), para a análise quantitativa.

3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada (CCD) a fase estacionária foi uma placa de alumínio com uma fina camada de sílica gel UV sensível (Merck, Sílica gel F254, lote OB 466477, Darmstadt, Alemanha).

Pequenas gotas das soluções de amostra a serem analisadas foram aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa. Deixou-se a placa secar, então colocou-se a placa em um recipiente contendo a fase móvel (solvente ou mistura de solventes) conforme mostra a Tabela 3.1. A polaridade do solvente foi definida de acordo com a substância que se desejou separar (óleo volátil, pigmentos, flavonóides, saponinas e triterpenos). Como somente a base da placa ficou submersa, o solvente começou a molhar e a fase estacionária subiu por capilaridade.

Após a eluição, a placa secou a temperatura ambiente e a revelação da placa foi feita com a aplicação de um reagente escolhido de acordo com a substância de interesse, também conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Fases móveis e reveladores utilizados nas análises de cromatografia em camada delgada.

<i>Compostos de Interesse</i>	
<i>Óleo Volátil</i>	Eluente: (80:20) hexano (Merck, lote k33280374-420, Alemanha): acetato de etila (Merck, lote k32703923-346, Alemanha)
	Revelador: anisaldeído
<i>Flavonóides e Pigmentos</i>	Eluente: (67,6:7,5:7,4:17,5) acetato de etila (Merck, lote k32703923-346, Alemanha): ácido fórmico (Vetec, 98-100% de pureza, lote 044755, Rio de Janeiro, RJ): ácido acético glacial (Ecibra, PA/ACS, lote 15695, São Paulo, SP): água
	Revelador: anisaldeído
<i>Triterpenos</i>	Eluente: (40:40:10) tolueno (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo): clorofórmio (Synth, PA/ACS, lote 71112, São Paulo, SP): etanol (Ecibra, 99,5° de pureza, lote 17048, São Paulo, SP)
	Revelador: anisaldeído
<i>Saponinas</i>	Eluente: (64:32:12:8) clorofórmio (Merck, lote k3390404544, Alemanha): ácido acético glacial : metanol (Ecibra, PA/ACS, lote 16646, São Paulo, SP): água
	Revelador: anisaldeído
	Eluente: (80:20) hexano (Merck, lote k33280374-420, Alemanha): acetato de etila (Merck, lote k32703923-346, Alemanha)
	Revelador: Cloridrato de antimônio 20%

Preparação do revelador

O revelador anisaldeído (Merck, 97,5% de pureza, lote Darmstadt, Alemanha). foi preparado com 50 cm³ de ácido acético glacial, 1 cm³ de ácido sulfúrico concentrado (Vetec, 98% de pureza, lote 993150, Rio de Janeiro, RJ) e 0,5 cm³ de anisaldeído, adicionados nesta ordem.

Uma solução 20 % de revelador cloridrato de antimônio (Vetec, lote 048095, Rio de Janeiro, RJ) preparada em etanol foi utilizada como um dos reveladores de saponinas.

3.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Nesta etapa foram utilizadas 3 programações distintas para caracterização da composição dos extratos.

3.5.2.1 CG-EM do extrato de lavanda brasileira

As análises de CG-EM foram executadas em dois equipamentos diferentes. O primeiro foi um GC Agilent 6890 equipado com DB-Wax coluna de sílica (30 m × 0.25 mm i.d. × 0,25 µm) e interface com detector seletivo de massa Agilent (Modelo 5973, Network, Palo Alto, EUA). A programação de temperatura da coluna foi de 40 a 220 °C (3 °C/minuto), a temperatura do injetor foi de 245 °C, gás carregador foi o hélio, a uma vazão de 1,1 cm³/minuto, e injetor split (1 µL de amostra dissolvido em 1 cm³ de dietil éter) com voltagem de ionização 70 eV. O segundo equipamento foi um Hewlett-Packard equipado com coluna de sílica fundida HP1 (30 m × 0,25 mm, 0,25µm) e interface com detector quadrupolo (Modelo 5970). A programação de temperatura da coluna foi de 70 a 200 °C (10 °C/minuto). A temperatura do injetor foi 220 °C, e a temperatura do detector foi 250 °C, o gás carregador foi o hélio, a uma vazão de 0,6 cm³/minuto e voltagem de ionização 70 eV.

A caracterização dos constituintes do extrato foi baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação destes com dados da literatura (Joulain e König, 1998; Adams, 1995). Esta análise foi realizada no Laboratoire de Chimie Biomoléculaire, ENSCM, Montpellier, França.

3.5.2.2 CG-EM do extrato de ginseng brasileiro

Os extratos foram caracterizados quanto à composição química por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de 30 a 500 U.M.A (Unidades de massa atômica), utilizando-se coluna capilar apolar HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura inicial foi de 60 °C e depois esta foi elevada a até 246 °C; à taxa de 3 °C/minuto. A temperatura do injetor foi de 220 °C a razão de split de 20:1. Para a identificação dos compostos, fez-se a interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis nas bibliotecas Wiley, Nist e Adams. Esta análise foi realizada pela empresa *T & E Analitica* (Centro Analítico & Científico, Campinas, SP)

3.5.3 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chamas (CG-DIC)

3.5.3.1 CG-DIC do extrato de lavanda brasileira

Os extratos foram analisados em cromatógrafo gasoso Varian CP-3380, equipado com detectores de ionização de chama e com duas colunas capilares de sílica: CP Sil 5 CB (100% dimethyl polysiloxane, Chrompack capillary column/Varian, Palo Alto, EUA) coluna capilar (30 m × 0,24 mm) e Supelcowax 10 (polyethylene glucol, Supleco Inc, Bellefonte, EUA) coluna capilar (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25µm filme). A programação de temperatura foi de 50 a 200 °C a 5 °C/minuto, a temperatura do injetor 220 °C, a temperatura do detector 250 °C. O nitrogênio foi

utilizado como gás carregador à vazão de 0,8 cm³/minuto. A quantificação foi obtida por integração eletrônica, pela técnica de normalização. O índice de retenção linear (Índice de Kovats) foi calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos. Esta análise foi realizada no Laboratoire de Chimie Biomoléculaire, ENSCM, Montpellier, France.

3.5.3.2 CG-DIC extrato de ginseng brasileiro

Os extratos foram analisados em cromatógrafo a gás equipado com detectores de ionização (*Shimadzu*, modelo 17 A, Kyoto, Japão) e coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) com fase estacionária: 5% diphenil e 95% dimethylpolisiloxane, (*J & W Scientific*, Folsom, EUA). A programação de temperatura foi de 60 °C a 280 °C a 3 °C/min; temperatura do injetor foi 220 °C e a temperatura do detector foi 246 °C. A quantificação foi obtida por integração eletrônica, pela técnica de normalização. O índice de retenção linear (Índice de Kovats) foi calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos. Esta análise foi realizada no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Naturais (LASEFI - DEA/FEA – UNICAMP).

3.6 Avaliação de atividades biológicas de extratos

3.6.1 Atividade antioxidante por meio da reação acoplada do β -caroteno e ácido linolênico (Teste Colorimétrico)

A metodologia utilizada para determinação da atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro foi baseada na descrita por Leal *et al* (2003) que utilizaram a metodologia de Hammerschmidt e Pratt (1978) com algumas modificações para extratos obtidos por tecnologia supercrítica.

O substrato foi preparado utilizando 10 mg de β -caroteno (99 %, Arcos, New Jersey, EUA) 10 cm³ de clorofórmio, 60 mg de ácido linolênico (Sigma Aldrich Inc, St.Louis, EUA) e 200 mg de Tween 80 (99%, Sigma – Aldrich, lotes L032K0104, St. Louis, EUA). Esta solução foi concentrada em rota-evaporador (Heildoph Instruments, modelo Laborota 4001, Viertried, Alemanha) com controlador de vácuo (Heildoph Instruments, modelo Rotavac Control, Viertried, Alemanha) a 50 °C e 470 mbar de vácuo. Em seguida, foi diluída com 50 mL de água destilada. A reação foi conduzida usando-se 1 cm³ de substrato, adicionando 2 cm³ de água destilada e 0,05 cm³ de extrato diluído em etanol (0,02 g de extrato/1 cm³ de etanol). A mistura foi colocada em banho (Tecnal, TE 159, Piracicaba, SP) a 40 °C, e o produto foi monitorado utilizando espectrofotômetro (Hitachi, U-3010, Tóquio, Japão) em 0, 1, 2, e 3 horas de reação. A leitura foi realizada na absorvância de 470 nm. A atividade antioxidante foi calculada através da Equação 3.5 (Skerget *et al*, 2005):

$$AA = 100 \times \left(1 - \left[\frac{abs_{extrato}^{t=0} - abs_{extrato}^t}{abs_{controle}^{t=0} - abs_{controle}^t} \right] \right) \quad (3.5)$$

Onde:

AA = atividade antioxidante;

$abs_{extrato}^{t=0}$ = absorvância do extrato no início da reação (t=0);

$abs_{controle}^{t=0}$ = absorvância do controle no início da reação (t=0);

$abs_{extrato}^{t=t}$ = absorvância do extrato no tempo de reação t onde t=1, 2 ou 3 horas;

$abs_{controle}^{t=t}$ = absorvância do controle no tempo de reação t onde t=1, 2 ou 3 horas.

3.6.2 Atividade antioxidante – Método do DPPH

Os reagentes utilizados foram DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) (Sigma Aldrich Co, Steinheim, Alemanha); butilhidroxitolueno e rutina hidrato (Sigma Aldrich Co, Steinheim, Alemanha); as soluções foram preparadas com solventes analíticos de categoria padrão comercial.

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o radical DPPH segundo método descrito por Mellors e Tappel (1996), adaptado para óleos voláteis (Agnaniet *et al*, 2004).

O DPPH foi dissolvido em etanol na concentração de 100 μM , conforme mostra o esquema na Figura 3.10. As soluções referentes aos antioxidantes (BHT e Rutina) foram preparadas em diferentes concentrações partindo-se da concentração de 1 mg/cm^3 para o BHT e 3 mg/cm^3 para rutina, conforme o esquema da Figura 3.11. Os extratos foram preparados de forma semelhante, a concentração inicial para os extratos de lavanda brasileira e quebra pedra foi de 50 mg/cm^3 , para o extrato de ginseng brasileiro a concentração inicial foi de 20 mg/cm^3 . A Figura 3.12 mostra o esquema de preparo das soluções de extrato. Após a etapa de preparo das soluções partiu-se para determinação da atividade anti-radical livre. Em cada cubeta foram adicionadas solução de DPPH e solução de antioxidante de referência ou solução de extrato nas diferentes concentrações; a Figura 3.13 mostra o esquema de preparo das cubetas. A redução da absorção foi medida a 517 nm durante 30 minutos, a temperatura ambiente. A absorção real foi calculada através da subtração do resultado da absorção do controle. As medidas de absorção foram obtidas em triplicata, e a concentração referente a 50 % de redução (Sc_{50}) foi determinada graficamente. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro SAFAS UV mc^2 , equipado com sistema multi-células/multi-cinética e com termostato. Esta análise foi realizada no Laboratoire de Chimie Biomoléculaire, ENSCM, Montpellier, França.

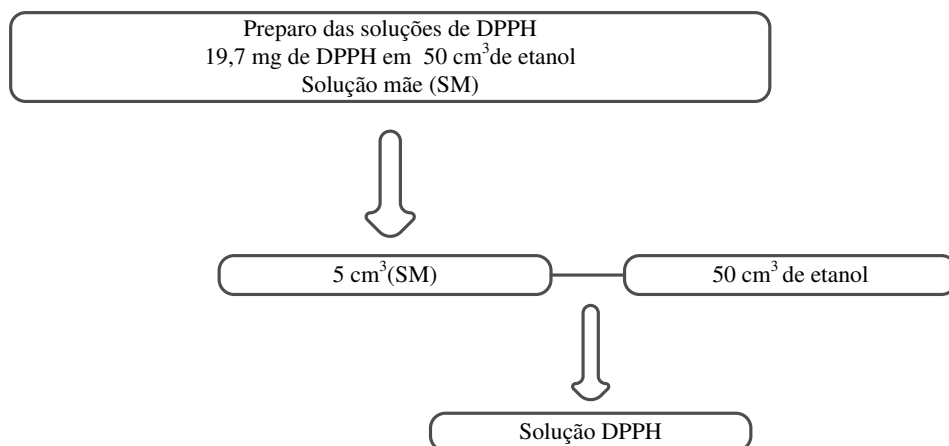


Figura 3.10: Ilustração do procedimento de preparo da solução de DPPH.

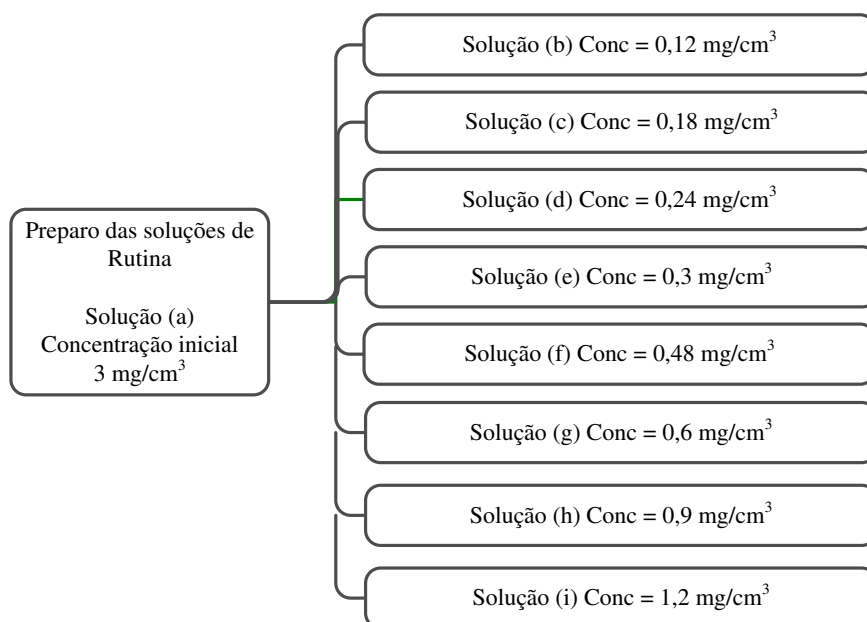


Figura 3.11: Ilustração do procedimento de preparo das soluções de Rutina.

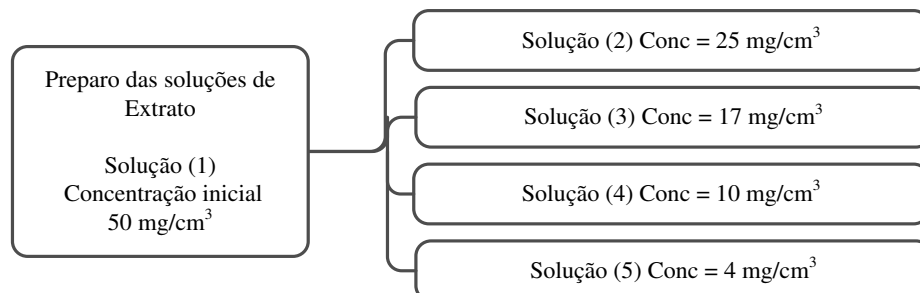


Figura 3.12: Ilustração do procedimento de preparo das soluções de extrato.

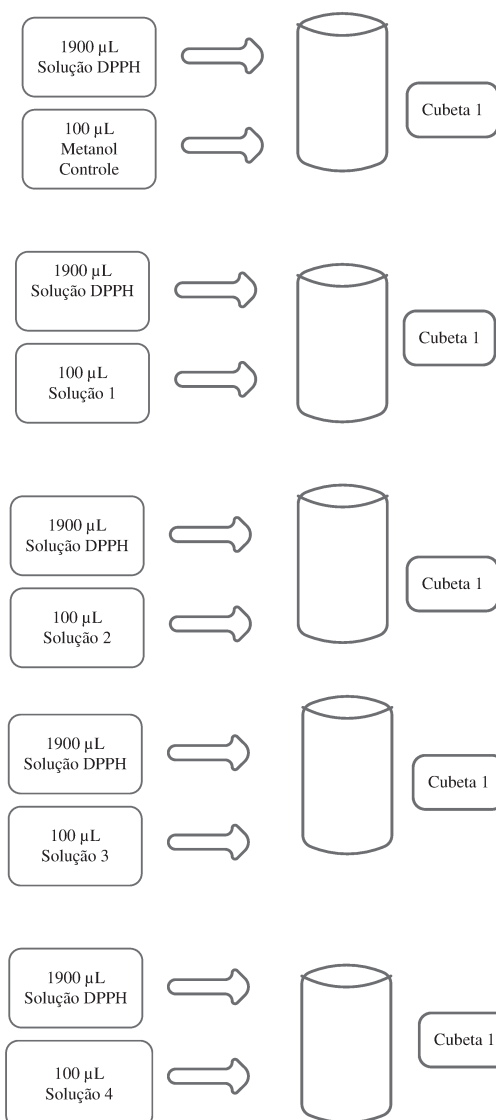


Figura 3.13: Ilustração do procedimento de preparo das cubetas.

3.6.3 Atividade antioxidante – Método da capacidade de absorver radicais oxigênio - ORAC

Esta análise foi realizada somente com extrato SFE e com o óleo volátil de lavanda brasileira.

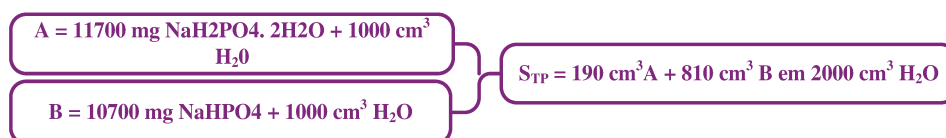
β -ciclodextrina metilada randomizada (RMCD) foi fornecida por Cyclolab R & D Ltd (Budapest, Hungria). FL (fluoresceína) (Sigma Aldrich Co, St.Louis, EUA), Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-2- ácido carboxílico) (Sigma Aldrich Co, lote 01401HV-233, St.Louis, EUA), 2,6-di-ter.-butil-4-metil-fenol (Sigma Aldrich Co, St.Louis, EUA) e hidrato de rutina (Sigma

Aldrich Co, St.Louis, EUA). O reagente APPH (2,2'-Azibis 2-amidino-propano diidrocloreto) foi fornecido pela Wako Chemical USA, Inc (lote NVP5336, Richmond, EUA).

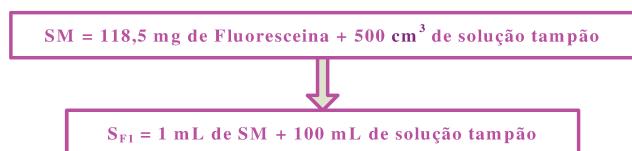
O procedimento foi baseado em estudos anteriores que utilizaram a fluoresceína como agente fluorescente (Ou *et al*, 2001). O método foi adaptado para avaliação da atividade anti radical livre de antioxidantes lipofílicos (Huang *et al*, 2002). Com exceção das soluções de Trolox que foram preparadas utilizando RMCD a 7% como solvente, as outras soluções foram preparadas com solução tampão fosfato 75 cm³ (pH 7,4).

Preparo das soluções:

Solução tampão fosfato 75 mM pH 7,4 (S_{TP}):



Solução de Fluoresceína $6,3 \times 10^{-6}$ em tampão fosfato 75 mM pH 7,4 (S_{F1})



Solução de AAPH a 0,128 M em tampão fosfato 75 mM pH 7,4 (SM_{AAPH}):

$$SM_{AAPH} = 3,47 \text{ g} + 100 \text{ cm}^3 \text{ de solução tampão (0,128 M)}$$

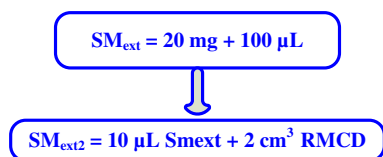
Solução de β -ciclodextrina metilada randomizada (RMCD) a 7 % (S_{RMCD}):

$$S_{RMCD} = 7000 \text{ mg RMCD} + 1000 \text{ cm}^3 \text{ de acetona:água (1:1)}$$

Solução Trolox a 2×10^{-3} M em solução de RMCD a 7 % (S_{Trolox}):

$$S_{Trolox} = 50,1 \text{ mg Trolox} + 100 \text{ cm}^3 \text{ de solução RMCD}$$

Solução de extrato SFE e óleo essencial de lavanda brasileira (SM_{ext2}):



A Figura 3.14 apresenta as diferentes soluções anteriormente descritas que foram utilizadas para o preparo da reação ORAC. A reação foi desencadeada pela adição do AAPH as demais soluções. A Figura 3.15 mostra a redução da fluorescência com o passar do tempo.

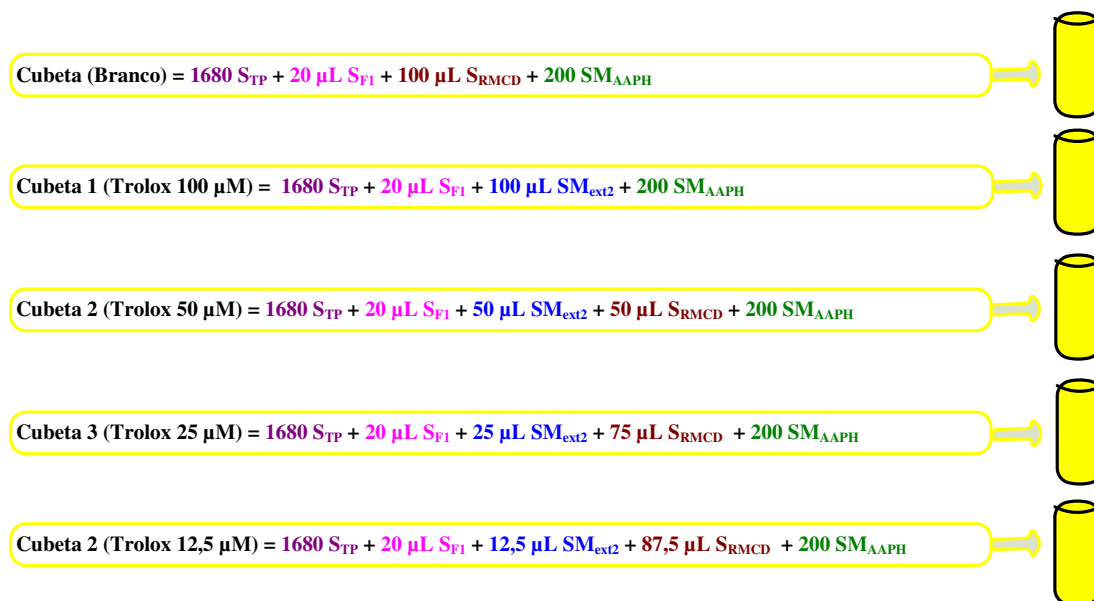


Figura 3.14: Ilustração do procedimento de preparo das cubetas.

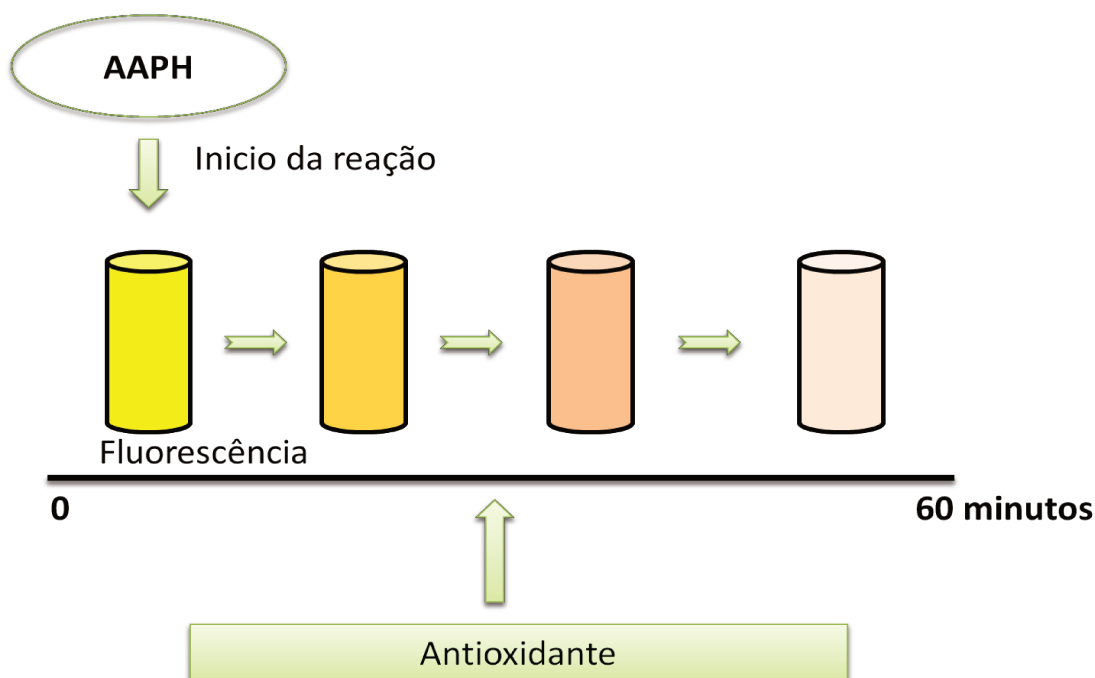


Figura 3.15: Esquema da análise ORAC.

As medidas foram feitas em duplicata em espectrofotômetro Hitachi F-2500, equipado com célula termostática e agitador. O comprimento de onda de excitação e emissão foram de 493 e 517 nm, respectivamente.

A avaliação da inibição foi realizada através da diferença de áreas entre a curva obtida com o controle e as curvas obtidas com as amostras (extratos) (Ou *et al*, 2001; Ou *et al*, 2002; Huang *et al*, 2002).

Para os compostos puros BHT e rutina, os valores de ORAC relativo foram calculados em relação ao Trolox equivalente de acordo com a Equação 3.6 (Ou *et al*, 2001):

$$\text{Re lativo ORAC} = \left\{ \left[\frac{AUC_{amostra} - AUC_{branco}}{AUC_{Trolox} - AUC_{branco}} \right] * \left(\frac{\text{molaridade Trolox}}{\text{molaridade amostra}} \right) \right\} \quad (3.6)$$

Para os extratos SFE e óleo essencial, utilizou-se a seguinte Equação 3.7 (OU *et al*, 2002):

$$Re\ lativo\ ORAC = \left\{ \left[\frac{AUC_{amostra} - AUC_{branco}}{AUC_{Trolox} - AUC_{branco}} \right] * \left(\frac{molaridade\ Trolox}{conc\ amostra} \right) \right\} \quad (3.7)$$

As unidades do ORAC foram expressas em micromoles de Trolox por grama de amostra (μ M TE/g).

3.6.4 Atividade antiinflamatória

A lipoxigenase de soja (EC 1.13.11.12) foi fornecida por Fluka (Steinheim, Alemanha), o ácido nordiidroguaiaretico (NDGA) foi fornecido pela Sigma Aldrich Co (Steinheim, Alemanha) e o ácido linoléico foi fornecido pela Sigma Aldrich Co (Steinheim, Alemanha). A solução tampão fosfato de potássio 0.1 M e pH 9 foi preparada com reagentes analíticos de categoria padrão comercial. Água deionizada foi empregada para preparação destas soluções.

A lipoxigenase de soja é conhecida por catalisar a oxidação de ácidos graxos insaturados que contém estruturas 1-4-dieno. A conversão do ácido linoléico em 13-hidroperóxido ácido linoléico foi seguida espectrofotometricamente pela aparição de um conjugado dieno em 234 nm. O ácido nordiidroguaiaretico (NDGA), um conhecido inibidor da lipoxigenase de soja, foi usado como droga de referência. As condições experimentais foram adaptadas da literatura (Mellors e Tappel 1966; Sircar *et al*, 1983; Safayhi *et al*, 1992 e Agnani *et al*, 2004). Primeiramente, fez-se a cinética de inibição da lipoxigenase de soja pelo NDGA. Preparou-se soluções de NDGA com concentrações variando de (0,0001 a 0,001 mg/cm³), adicionou-se substrato, etanol e a enzima, e em seguida procedeu-se à leitura da absorbância destas soluções no comprimento de onda de 243 nm. Na etapa seguinte, testou-se a solubilidade dos extratos de plantas na solução composta por substrato, etanol e soluções com diferentes concentrações de extrato variando de (2 a 10 mg/cm³). Este procedimento foi realizado a fim de certificar a solubilidade dos extratos em

função da concentração nos comprimentos de onda de 210 a 234 nm. As Figuras de 7.2.2 a 7.2.5 do Anexo 7.2 mostram as curvas referentes à solubilidade dos extratos em diferentes concentrações. A absorbância dos extratos não deve ultrapassar o valor de 1, valores acima deste indicam falta de solubilidade da solução e interferem diretamente nos valores da análise em questão.

Definiu-se que os extratos são solúveis na solução composta por substrato, etanol e soluções de extrato na concentração de 10 mg/cm³, no comprimento de onda de 234 nm. A reação foi preparada nas cubetas com a adição de substrato, solução de extrato e solução de lipoxigenase de soja (preparada em solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M pH 9,0). A reação enzimática foi executada na presença e na ausência de inibidor, e suas cinéticas foram comparadas. Os inibidores (extratos das plantas) foram dissolvidos em etanol de maneira que cada alíquota de 10 µL reportasse uma concentração final de no máximo 100 ppm em cada ensaio. O cálculo da porcentagem de inibição da atividade enzimática foi baseado na comparação entre os extratos e o composto de referência o NDGA. Todas as concentrações de inibidor foram examinadas em triplicata e os resultados foram obtidos com a média destes valores. A concentração referente à inibição de 50 % (IC₅₀) foi calculada de acordo com a concentração de cada inibidor.

O cálculo da velocidade de reação do NDGA foi realizado de acordo com a Equação 3.8:

$$V(x) = \frac{abs_{t=x} - abs_{t=0}}{t = x} \quad (3.8)$$

Cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a Equação 3.9 :

$$\% IC = \frac{V_{t=t} - V_x}{V_{t=t}} \quad (3.9)$$

Onde: V_(t=t) = velocidade da referência; V_(x) = velocidade

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

A Tabela 4.1 mostra como os resultados da lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro foram organizados.

Tabela 4.1: Tabela de organização dos resultados

Planta	Lavanda brasileira	Quebra pedra	Ginseng brasileiro
Caracterização da M-P	Diâmetro médio das partículas	Diâmetro médio das partículas	Diâmetro médio das partículas, Umidade, Densidade Real e Densidade aparente
Métodos de Extração			
Hidrodestilação	Rendimento global do óleo volátil da planta colhida em novembro de 2005 e em maio de 2006	-	-
SFE	Rendimento global 40 °C (100, 200 e 300 bar) 50 °C (100, 200 e 300 bar)	Rendimento global 40 °C (100, 150, 200 e 300 bar) 50 °C (100, 150, 200, 250 e 300 bar)	Rendimento global 30 °C (100, 150, 200, 250 e 300 bar) 40 °C (100, 150, 200, 250 e 300 bar) 50 °C (100, 200 e 300 bar) Cinética :40 °C, 250 bar ,7,0 x 10 ⁻⁵ kg/s e 5 g e 40 °C, 250 bar ,7,05 x 10 ⁻⁵ kg/s e 30 g.
SFE + co-solvente	-	-	10% etanol; 40 °C/250 bar; 2,5 x 10 ⁻⁵ kg/s
LPSE	Solventes: Metanol, etanol e hexano	Solventes: Metanol, etanol e hexano	Solventes: Metanol, etanol e hexano
Análises Químicas			
CG-DIC e CG-EM	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar Óleo volátil da planta colhida em novembro de 2005 e em maio de 2006	-	Extratos SFE: 30 °C (100, 150, 200, 250 e 300 bar) 40 °C (100, 150, 200, 250 e 300 bar)
CCD			
Óleo volátil	-	-	Extratos SFE: 30 °C (100, 200 e 300 bar) e 40 °C (100, 200, 300 bar); Extratos metanólico, etanólico e hexânico; Extrato SFE+co-solvente
Óleo volátil, Saponinas, Triterpenos, Flavonóides, Pigmentos	-	Extratos SFE: 30 °C (100, 200 e 300 bar) e 40 °C (100, 200, 300 bar); Extrato metanólico, etanólico e hexânico;	Extrato 40 °C/ 250 bar
Atividades Biológicas			
Atividade antiinflamatória	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar Óleo volátil	Extrato SFE: 40 °C e 250 bar	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar
Atividade antioxidante			
DPPH	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar Óleo volátil	Extrato SFE: 40 °C e 250 bar	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar
ORAC	Extrato SFE: 40 °C e 200 bar Óleo volátil	-	-
β-caroteno	Extrato SFE: 40 °C (100, 200 e 300 bar); 50 °C (100, 200 e 300 bar) Extratos metanólico, etanólico e hexânico;	Extrato SFE: 40 °C (100, 200 e 300 bar); e 50 °C(100, 200 e 300 bar) Extratos metanólico, etanólico e hexânico;	Extrato SFE: 40 °C (100, 200 e 300 bar); e 50 °C(100, 200 e 300 bar) Extratos metanólico, etanólico e hexânico;

4.1 Lavanda brasileira

4.1.1 Caracterização da Matéria-prima

O diâmetro médio das partículas (dp) utilizadas nos ensaios para determinação do rendimento global foi de $7,5 \times 10^{-4}$ m.

4.1.2 Rendimento Global de Extração

A hidrodestilação das folhas e talos de lavanda brasileira forneceu um óleo essencial de cor esverdeada, com rendimento médio de $1,2 \pm 0,1$ % em relação à massa de matéria-prima seca. Ricciardi *et al* (2006) estudaram a composição das partes aéreas de lavanda brasileira colhidas em diferentes épocas do ano; o rendimento obtido pela destilação a vapor da matéria vegetal variou de (0,7 - 1,3 %). Duschatzky *et al* (2004) também estudaram a composição do óleo essencial de lavanda brasileira; o rendimento obtido da hidrodestilação das folhas e frutos desta planta foi de 1,5 % (m/m).

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de rendimento global dos extratos obtidos por SFE em diferentes condições de processo e os rendimentos obtidos através da extração a baixa pressão (LPS) com solventes orgânicos (metanol, etanol e hexano).

Tabela 4.2: Rendimento global de extrato de lavanda brasileira obtido por SFE e por LPSE.

Extração SFE				Extração LPSE	
Condições de Operação		Densidade	Rendimento	Solvente	Rendimento
T (°C)	P (bar)	CO ₂ (kg/m ³)	(% massa) ^a		(% massa) ^b
40	100	628	2,4 ± 0,1	Metanol	9,4 ± 0,1
	200	839	2,5 ± 0,3	Etanol	3,3 ± 0,2
	300	909	3,0 ± 0,2	Hexano	0,8 ± 0,2
50	100	384	2,8 ± 0,1		
	200	784	2,0 ± 0,1		
	300	870	4,0 ± 0,2		

^a Rendimento do extrato SFE de lavanda brasileira em base úmida.

^b Rendimento do extrato LPSE de lavanda brasileira em base úmida.

As isotermas de rendimento global da lavanda brasileira são mostradas na Figura 4.1(a) e 4.1(b).

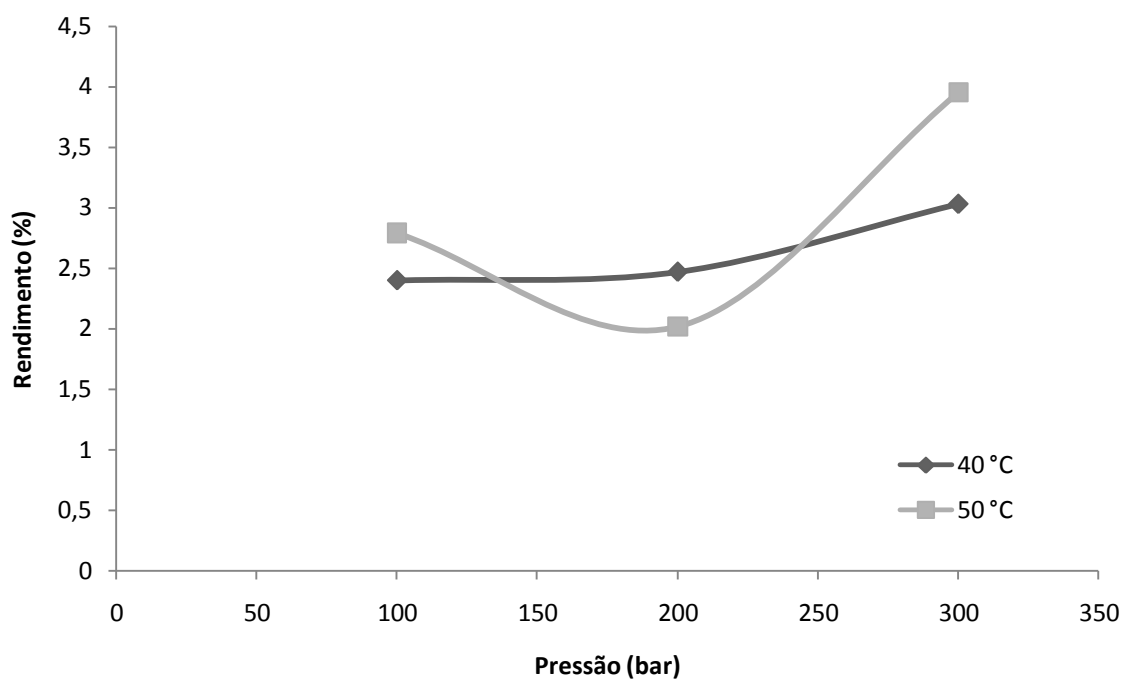


Figura 4.1(a): Isotermas de rendimento global do sistema lavanda brasileira + CO₂.

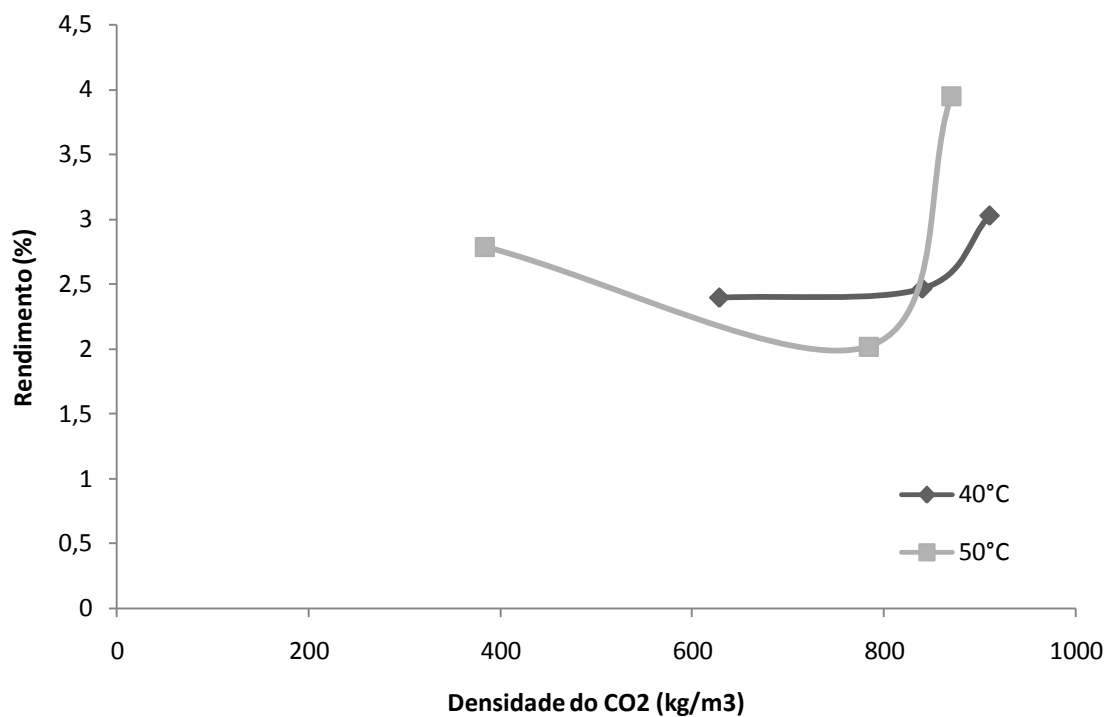


Figura 4.1(b): Isotermas de rendimento global do sistema lavanda brasileira + CO₂.

Sistemas formados por um fluido supercrítico podem apresentar um comportamento de inversão das isotermas. As pressões de inversão para o sistema lavanda brasileira + CO₂ foram determinadas nas proximidades de 135 bar e 250 bar. Este fenômeno deve ser avaliado em termos do efeito da densidade do CO₂ e da pressão de vapor do soluto no rendimento global de extração conforme mostra a Figura 4.1(b). Para pressões superiores a 250 bar, o rendimento global aumenta com a temperatura devido ao aumento da pressão de vapor da mistura de solutos. A 200 bar o rendimento global é maior a 40 °C do que a 50 °C; nesta pressão a densidade do CO₂ é influenciada pela temperatura, neste ponto a pressão de vapor do soluto é menos importante do que o efeito da densidade do solvente. A concorrência entre estes dois fatores pressão de vapor do soluto e poder de solvatação do solvente no valor da solubilidade é chamado de retrogradação. A pressão de vapor do soluto aumenta com a temperatura enquanto que o poder de solvatação diminui a densidade do solvente. Comportamento similares são apresentados por vários sistemas de matriz vegetal + CO₂ supercrítico (Moura *et al*, 2005; Carvalho Jr *et al*, 2005; Martinez, 2005, Quispe-Condori, 2005). Os efeitos da pressão e temperatura no rendimento global são semelhantes aos efeitos desses parâmetros na solubilidade do extrato de lavanda brasileira em CO₂ supercrítico. A 40 °C o fator dominante na solubilidade do extrato de lavanda brasileira é a densidade do CO₂, pois o rendimento aumenta com a densidade. Na isoterma de 50 °C o fator que mais influência na solubilidade dos compostos é a pressão de vapor do soluto. Considerando que o extrato é formado por diferentes classes de compostos, a solubilidade destes compostos pode ser diferente para as várias condições de temperatura e pressão, isto explica o comportamento de diminuição do rendimento com o aumento da pressão de 100 bar para 200 bar e o grande aumento de rendimento com o aumento a pressão de 200 bar para 300 bar. Desta maneira, ambos os efeitos, densidade do solvente e pressão de vapor do soluto são importantes para determinação da solubilidade do extrato na isoterma de 50 °C. O maior rendimento global

foi obtido na condição de extração de 50 °C e 250 bar ($3,60 \pm 0,04\%$). Rossato (2006) estudou a aplicação da tecnologia de extração supercrítica com CO₂ para obtenção de óleo essencial de *Aloysia sellowii* (BRIQUET) MOLDENKE (Verbenaceae). O rendimento do extrato SFE foi de 0,4 % (m/m).

As desigualdades dos rendimentos globais médios dos extratos obtidos por LSPE apresentados na Tabela 4.2 indicam que a polaridade do solvente usado influenciou o valor do rendimento, sendo que este cresceu com a polaridade do solvente.

As colorações dos extratos também foram distintas de acordo com o solvente usado na extração LSPE. Foi observado que os extratos metanólicos apresentaram coloração verde mais intensa do que para os outros dois solventes. Os extratos SFE de lavanda brasileira apresentaram uma coloração verde-amarelada.

Estas diferenças instigam o estudo da composição e ação biológica dos diferentes extratos. Em termos de rendimento global o extrato etanólico apresentou mesma ordem de grandeza $3,3 \pm 0,2\%$ que o rendimento obtido na SFE a 40 °C/300 bar ($3,0. \pm 0,2\%$).

4.1.3 Análises Químicas

As porcentagens relativas em área dos compostos voláteis presentes no óleo essencial e no extrato SFE de lavanda brasileira são apresentados na Tabela 4.3. Estes dados foram obtidos utilizando CG-FID com coluna CP Sil 5.

Tabela 4.3: Porcentagem em área dos compostos voláteis presentes no óleo essencial e no extrato supercrítico de lavanda brasileira.

Compostos	IR CPSil5^a	IR CWX 20M^b	Óleo 1^c	Óleo 2^d	SFE^e
α-tujona	930	-	0,1	0,3	-
α-pineno	939	-	1,2	2,0	-
Camfeno	970	-	0,2	0,2	-
Sabineno	974	-	0,4	0,5	-
β-pineno	982	1100	10,5	12,0	0,3
Octen-3-ol	982	1429	0,2	0,2	-
Mirceno	986	1145	1,8	2,1	-
p-cimeno	1020	1250	0,2	0,2	-
Limoneno	1030	1180	1,8	2,0	-
1,8-cineol	1030	1200	0,2	0,3	-
(E)-β-ocimeno	1042	1230	0,4	0,5	-
<i>trans</i>-sabinene hidrato	1064	1440	0,2	0,2	-
Terpinoleno	1087	1270	0,2	0,2	-
Linalool	1090	-	0,8	0,9	0,3
<i>cis</i>-sabineno hidrato	1095	1522	0,4	0,4	-
<i>cis</i>-p-menth-2-en-1-ol	1116	-	0,3	0,5	-
α-camfolenal	1125	1462	0,1	0,3	-
<i>Ttrans</i>-pinocarvil	1139	1655	2,2	2,9	1,6
Nopinono	1143	-	1,1	1,5	0,4
Pinocafona	1154	1482	13,5	16,3	6,3
Pinocarvona	1158	-	0,5	0,5	0,4
Isopinocanfona	1167	1509	4,4	5,1	2,0
Terpinen-4-ol	1172	-	0,2	0,2	0,1
α-terpineol	1180	-	0,2	0,2	0,1
Mirtenal	1186	1588	0,8	1,1	0,6
Mirtenol	1194	1749	1,1	1,4	1,3
<i>Trans</i>-carveol	1211	-	0,2	0,3	0,2
Carvone	1231	-	0,2	0,2	0,4
Mirtanol	1255	-	0,1	0,1	-
Bornil acetato	1281	1531	0,4	0,5	1,1

Pinocarvil acetato	1291	1608	7,3	8,3	5,7
α-ylangene	1388	-	0,2	0,1	0,3
β-elemeno	1395	1522	0,5	0,5	0,9
β-bourboneno	1398	1531	0,4	0,5	0,7
β- cariofileno	1436	1547	6,8	4,8	9,2
α- humuleno	1469	1616	1,8	1,4	2,6
Allo-aromadendreno	1477	1643	0,5	0,4	0,3
Epi-cubebol	1485	1805	0,2	0,2	-
Germacreno D	1494	1678	4,6	3,0	8,6
Biciclogermacreno	1511	1705	2,4	1,9	3,2
Cubebol	1526	1882	0,8	0,7	0,9
δ-amorfenol	1530	-	0,6	0,7	0,3
Elemol	1576	1985	1,5	1,0	1,5
Germacreno B	1590	1762	2,4	1,8	5,1
Óxido de cariofileno	1598	1915	1,8	1,3	2,4
Espatulanol	1600	2060	1,7	1,3	2,4
Guaiol	1606	2027	8,7	6,6	16,7
Rosifoliol	1621	2163	1,9	1,5	3,2
Eudesm-3-en-7-ol	1647		1,4	1,1	2,1
Tujopsanone-3	1652		0,5	0,4	1,1
α-eudesmol	1665	2200	1,1	0,9	3,4
Bulnesol	1676	2144	4,1	3,7	6,9
Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1696	-	0,4	0,2	1,2
Total identificado			95,2	95,0	93,8

^aÍndice de retenção experimental da coluna CPSil5 polar;

^bÍndice de retenção experimental da coluna CWX 20M apolar;

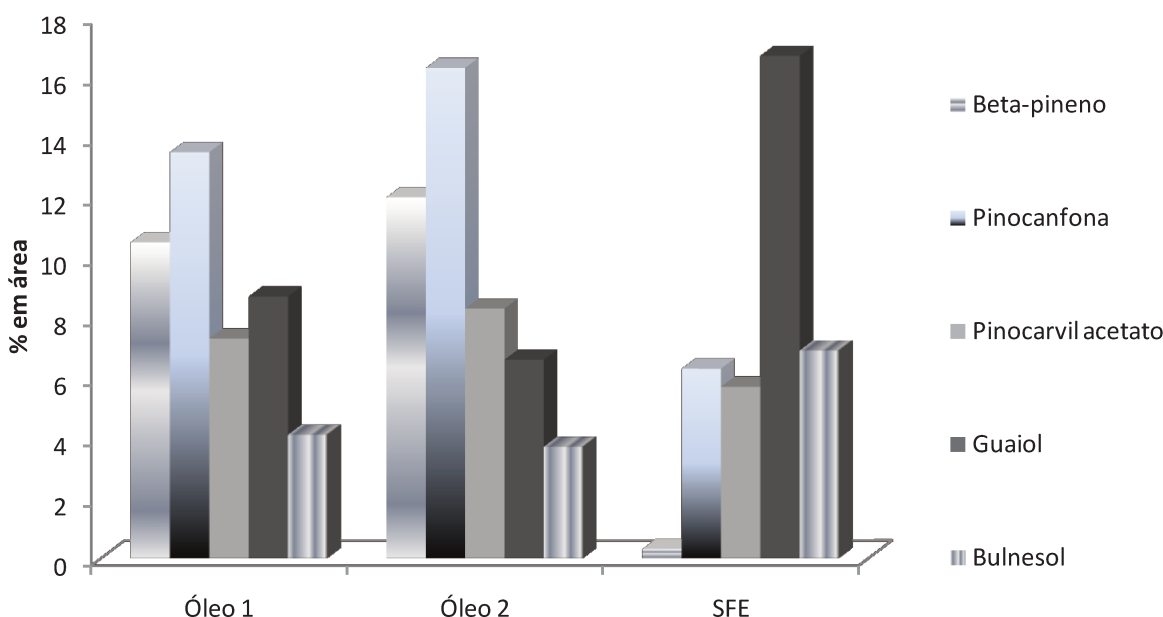
^cÓleo₁: óleo essencial da planta colhida em Novembro de 2005;

^dÓleo₂: óleo essencial da planta colhida em Maio de 2006;

^eSFE: extrato supercrítico (40 °C e 200 bar) da planta colhida em Novembro 2005.

Os resultados da composição química do óleo essencial de lavanda brasileira indicam que não existe diferença significativa na composição de acordo com o período do ano em que a planta foi colhida.

O óleo essencial das duas amostras (colhidas nos meses de novembro e maio) contém como monoterpenos majoritários três compostos: pinocanfona (13,5 - 16,3 %), β -pinene (10,5 - 12,0 %) e pinocarvil acetato (7,3 - 8,3 %). O guaiol (6,6 - 8,7 %) e o bulnesol (3,7-4,1 %) são os principais compostos da fração sesquiterpênica, representam 34 - 44,3 % de todo o óleo, conforme a Figura 4.2. Já no extrato SFE, estes compostos representam 73 % da fração volátil, o que indica que o extrato SFE apresenta maior quantidade de compostos sesquiterpênicos.



Óleo₁: óleo essencial da planta colhida em Novembro 2005;
 Óleo₂: óleo essencial da planta colhida em Maio de 2006;
 SFE: extrato supercrítico da planta colhida em Novembro 2005

Figura 4.2: Compostos presentes no óleo volátil e no extrato supercrítico de lavanda brasileira.

Stashenko *et al* (2003) avaliaram a composição de extratos de *L. alba* obtidos por diferentes técnicas de extração. Como no presente estudo, observaram grande semelhança entre a composição dos extratos SFE e LSPE, porém também verificaram que através da SFE obtém-se um extrato enriquecido em compostos menos voláteis (sesquiterpenóides).

A composição descrita neste estudo é muito diferente das composições encontradas na literatura sobre esta planta. Uma quantidade elevada de pinocanfona jamais foi reportada para esta espécie. Esta cetona monoterpênica foi mencionada somente para óleo de planta de origem brasileira (Trovati *et al*, 2003). Por outro lado, o guaiol foi identificado no extrato hexânico de outras espécies que crescem no Brasil (Da Silva *et al*, 2006), assim como o espatulenol e o bisabolol. O álcool sesquiterpênico bisabolol não foi encontrado nos óleos estudados neste trabalho. Estudos preliminares com a espécie mostram diferenças em termos de rendimento e composição. Cabras *et al* (2003) estudaram a SFE e a hidrodestilação de *Aloysia triphylla*, consta que o rendimento SFE foi de 0,2% e o rendimento do óleo essencial foi de 0,15%. Os compostos majoritários da SFE foram fitol, espatulenol, óxido de cariofileno, ar-curcumene e metil - 9,12,15-octadecatrienoato. O óleo essencial apresentou composição semelhante, sendo que os compostos majoritários foram espatulenol (23,2 %), ar-curcumene (7,7%), geranial (3,2%), E-nerolidol (3,8%) e neral (2,2%). Esta variabilidade pode ocorrer naturalmente devido à influência da temperatura, umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e ao regime de ventos a que a planta foi sujeita. Ainda, diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar óleos essenciais com composição química, características físico-químicas e odores bem distintos (Simões, 2000). Também se deve levar em consideração a variabilidade genética das plantas, que é expressa através dos quimiotipos.

Devido à quantidade elevada de pinocanfona e isopinocanfona encontrada no óleo essencial e no extrato SFE desta espécie de lavanda brasileira, pode-se comparar a composição desta planta com a composição do *Hyssopus officinalis*, planta originária do Mediterrâneo que também apresenta estes constituintes como compostos majoritários. Esta planta é muito utilizada na culinária devido ao seu leve sabor e aroma de menta, suas folhas e flores apresentam propriedades cicatrizantes, seu óleo essencial é utilizado na fabricação de elixir e na composição

de perfumes. O óleo de *Hyssopus officinalis* apresenta propriedades anti-sépticas e digestivas, anti-fúngica e fungicida. Experimentos com o óleo volátil desta planta, rico em cetonas sesquiterpênicas (pinocanfona e isopinocafona) produziram efeitos neurotóxicos e crises epiléticas em ratos (Steinmetz *et al*, 1980). Por outro lado, Letessier *et al* (2001) demonstraram em experimentos *in vivo* e *in vitro* que o óleo de *Hyssopus officinalis* e compostos individuais presentes neste óleo (l-bornil acetato, isopinocanfenol e pinocanfona) apresentam propriedades antifúngica e fungicida frente a fungos patogênicos. O óleo de *Hyssopus officinalis* inibiu completamente os fungos *Pyrenophora avenae* e *Pyricularia Oryzae*. Os compostos l-bornil acetato, isopinocanfenol e pinocanfona utilizados individualmente inibiram o crescimento de *Pyrenophora avenae* e misturas contendo isopinocanfenol inibiram completamente o crescimento fungico. Desta forma, o extrato SFE e o óleo volátil de lavanda brasileira apresentam potencial para serem utilizados tanto na agricultura ecológica com na medicina tradicional. É necessário o conhecimento preciso da composição química antes da utilização dos extratos em um contexto fitoterápico e aromaterapêutico. O óleo essencial de *Hyssopus officinalis* é vendido na França somente sob prescrição médica. O uso de plantas de forma indiscriminada pode causar sérios problemas de saúde. Segundo Schenkel (1995) algumas das mais tóxicas substâncias conhecidas são derivadas em geral de plantas, as quais são constituídas por uma diversidade de substâncias químicas que interferem nos processos fisiológicos normais, sendo então passíveis de causar efeitos nocivos, assim como terapêuticos.

Porém, tanto o óleo essencial como o extrato SFE apresentaram o mesmo perfil de composição e este fator concorda com o resultado do perfil de composição obtido para a *Aloysia sellowii*.

4.1.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos SFE e óleo essencial de lavanda brasileira

4.1.4.1 Atividade antiinflamatória dos extratos de lavanda brasileira

As atividades antiinflamatórias do óleo volátil e do extrato SFE de lavanda brasileira foram avaliadas comparativamente a atividade do NDGA. Não se observou nenhum efeito inibitório significativo sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L). Observou-se que ao invés de inibir a ação da enzima o extrato SFE e o óleo volátil de lavanda brasileira induziram a ação desta enzima, ou seja, a adição de extrato e de óleo volátil aumentou a velocidade da reação de inflamação.

De acordo com Croft *et al* (1993), aldeídos formados pela ação de lipoxigenases inibem, possivelmente, o crescimento de fungos, insetos e protozoários em plantas. Desta forma, a avaliação do efeito alelopático (efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial de uma planta sobre outra, mediante a produção de agentes aleloquímicos, que em geral são liberados no ambiente) dos extratos e do óleo essencial de lavanda brasileira torna-se interessante.

Duarte *et al* (2005) estudaram a atividade anti-cândida de plantas medicinais brasileiras, dentre elas a lavanda brasileira. Os resultados mostraram que a lavanda brasileira apresentou uma MIC (concentração inibitória mínima) superior a 2mg/mL. De acordo com o estudo, valores maiores que este para concentração indica fraco potencial antimicrobiano. Entretanto o extrato hidroalcoólico desta mesma planta apresentou atividade antimicrobiana (MIC = 0,1 mg/mL) contra o *Bacillus subtilis* CCT 2576 (Duarte *et al*, 2005).

Dellacasa *et al* (2003) estudaram a atividade antifúngica do óleo essencial de lavanda brasileira. Dentre os óleos estudados, somente aqueles que apresentaram em sua composição 30

% de terpenos oxigenados provaram ter atividade antifúngica. A lavanda brasileira não demonstrou atividade antifúngica relacionada ao *Ascosphaera apis*.

4.1.4.2 Atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira

A atividade antioxidante do óleo volátil e do extrato SFE foi comparada a dois componentes de referência (BHT e rutina), utilizando dois métodos diferentes (DPPH e ORAC). Os resultados são apresentados na Tabela 4.4 e os valores indicam uma eficiência de mesma magnitude para o óleo essencial e para o extrato SFE. O Sc_{50} para o óleo essencial não pode ser medido nas condições experimentais. O resultado $Sc_{40} = 1,8 \times 10^{-3}$ mg/L indica que sua atividade antioxidante é menos eficaz que a do extrato SFE ($Sc_{50} = 1,3 \times 10^{-3}$ mg/L). O método DPPH mostrou o mesmo comportamento observado por meio do método ORAC, onde o extrato SFE foi ligeiramente mais eficiente que o óleo essencial (225 contra 203 μ M TE/g, respectivamente). Nos dois casos a atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira foi mais fraca que a da rutina, embora a taxa de atividade varie com o método utilizado: a atividade dos extratos foi 300 vezes menor com o método DPPH ($Sc_{50} \text{ (Rutina)} = 4,0$ mg/L) e somente 3 vezes menor com o método ORAC (587 (μ M TE/g_{rutina})). A mesma ordem de grandeza foi obtida em estudos anteriores que avaliaram pelos dois métodos a atividade antioxidante do BHT (butil-hidroxi-tolueno) habitualmente utilizado como composto de referência. Foi obtido um $Sc_{50} = 8,8$ mg/L pelo método DPPH (Alitonou *et al*, 2006) e 0,16 TE (Trolox equivalente), (Ou *et al*, 2002) que corresponde a 727 μ M TE/g de acordo com o método ORAC.

Tabela 4.4: Atividade antioxidante do óleo essencial, do extrato SFE de lavanda brasileira e do composto de referência (Rutina),.

Método DPPH		Método ORAC	
Sc ₅₀ (Rutina) (mg/L)	4,0 ± 0,3	ORAC _{Rutina} (μM TE/g _{rutina})	587 ± 48
Sc ₅₀ (SFE) ^b (mg/L)	1300 ± 0,3	ORAC _(SFE) ^b (μM TE/g _{SFE})	225 ± 18
Sc ₄₀ (óleo 1) ^a (mg/L)	1800 ± 0,1	ORAC _(óleo 1) ^a (μM TE/g _{óleo 1})	203 ± 15

^a Óleo₁: óleo essencial da planta colhida em Novembro 2005;

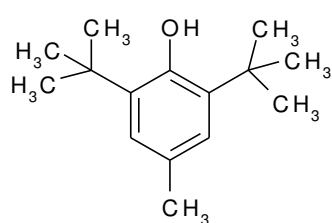
^b SFE: extrato supercrítico (40 °C e 200 bar) da planta colhida em Novembro 2005;

Sc: concentração referente a porcentagem de redução do radical DPPH

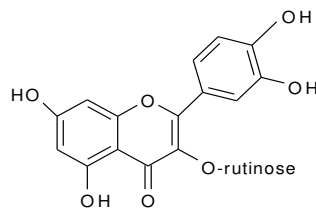
As diferenças entre os resultados dos dois métodos antioxidantes DPPH e ORAC, estão relacionadas com os mecanismos de reação envolvidos em cada método.

O método DPPH restringe-se somente à habilidade dos compostos presentes no extrato SFE e no óleo volátil de lavanda brasileira de doar hidrogênios ou de doar elétrons. Os baixos valores de AA obtidos por este método podem ter sido causados por alguns fatores como, uma primeira suposição seria a inexistência de substâncias doadoras de hidrogênio ou de elétrons nos extratos e no óleo volátil desta planta; outra suposição seria a presença de uma grande variedade de compostos nestes extratos e no óleo que interagem com o meio contendo radicais DPPH e entre si estas substâncias podem ser capazes de doar hidrogênio ou elétrons quando puras e podem ser incapazes de fazê-lo quando compõem uma mistura complexa, pois em sistemas complexos o estado de excitação das moléculas interfere diretamente na AA; e uma última suposição para a fraca AA do extrato SFE e do óleo volátil desta planta seria a presença de compostos de alta massa molecular e forma estrutura complexa, como no caso dos triterpenos e sesquiterpenos podem apresentar dificuldade de reagir com o radical DPPH devido ao impedimento estérico que este apresenta e que lhe conferi uma alta estabilidade.

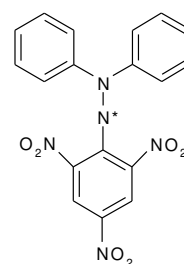
As estruturas químicas do DPPH, do BHT e da Rutina (Figura 4.3) e dos compostos majoritários presentes no extrato SFE e no óleo volátil de lavanda brasileira conforme mostra a Figura 4.4, pode-se verificar que o BHT apresenta maior atividade antioxidante frente ao radical DPPH. O mecanismo antioxidante envolvido neste método é baseado na doação de hidrogênios ou elétrons. No caso do BHT não somente as hidroxilas podem doar elétrons, os grupos metoxi também atuam fortemente nesta função e quelando metais (que são catalisadores na formação de radicais livres). Por outro lado, a rutina apresenta uma menor AA devido ao efeito do açúcar (rutinose) ligado a estrutura, que provoca uma diminuição da AA devido provavelmente ao impedimento estérico e também a modulação da capacidade de doação de elétrons. A baixa AA dos extratos frente ao método DPPH, pode ser devido a baixa capacidade de doação de elétrons por esses compostos. No caso do β -pineno, acredita-se que a baixa capacidade de doação de elétrons ocorra devida a estabilização por ressonância, mas principalmente pela questão da solubilidade, esse composto é pouco solúvel em metanol e etanol, este pode ser um motivo para a baixa AA (De Rosso *et al*, 2008).



BHT



Rutina



DPPH

Figura 4.3.: Estrutura química do DPPH e dos compostos de referência BHT e Rutina.

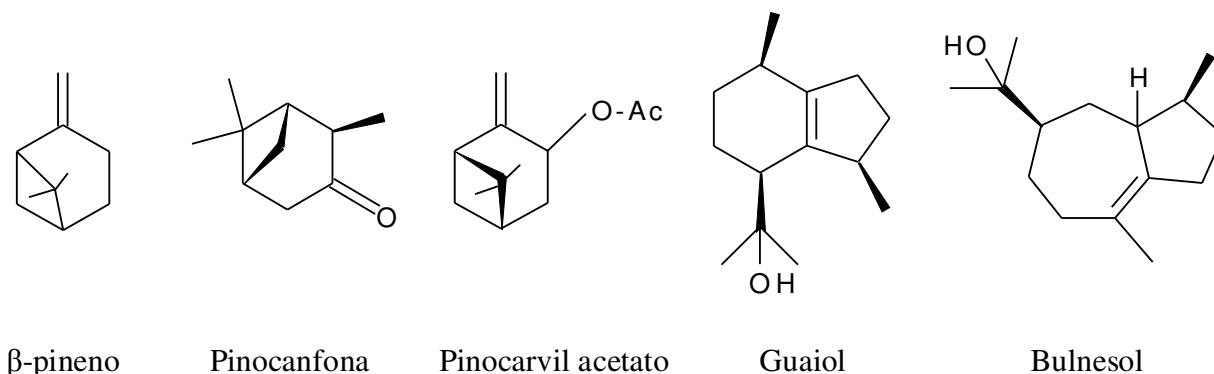


Figura 4.4: Estrutura química dos compostos majoritários presentes no óleo essencial e no extrato SFE de lavanda brasileira.

A determinação pelo método ORAC é um pouco mais complexa. Neste método a oxidação da fluoresceína é desencadeada pelo radical AAPH, que não interage diretamente com os compostos da mistura (extrato ou óleo volátil), mas com radicais formados pela oxidação da fluoresceína. Segundo Ou *et al* (2002), os resultados ORAC são muito representativos e fornecem dados valiosos para o estabelecimento de uma medida global do poder antioxidante de substâncias puras, misturas como em frutas e extratos de plantas. O método ORAC é utilizado pelos USDA (United States Department of Agriculture) para selecionar alimentos com grande poder antioxidante.

Os resultados da atividade antioxidante do extrato SFE ($225 \pm 18 \mu\text{M TE/g}_{\text{SFE}}$) e do óleo volátil ($203 \pm 15 \mu\text{M TE/g}_{\text{óleo}}$) de lavanda brasileira indicam um alto poder antioxidante pelo método ORAC. Este resultado é satisfatório pelo fato de que este método tem sido considerado confiável e tem sido muito utilizado devido a sua correlação linear com uma grande variedade de amostras que incluem frutas, extratos vegetais, plasma e fitoquímicos puros (Huang *et al*, 2002). As desvantagens deste método comparadas aos demais restringem-se ao controle da temperatura, controle da solubilidade de substâncias lipossolúveis e disponibilidade de equipamento.

A Figura 4.5 apresenta a atividade antioxidante dos extratos LPSE (metanol; etanol e hexano) e extratos SFE obtidos em diferentes condições de extração, em relação à atividade do β -caroteno (controle). Analisando-a pode-se constatar um comportamento bem diferenciado entre os extratos analisados. Os extratos metanólico e etanólico apresentaram uma atividade antioxidante variando de -5 a 62 %, como a atividade está acima de 50 % pode-se considerar que estes extratos apresentam uma atividade antioxidante significativa quando comparada ao β -caroteno. O extrato SFE obtido a 40 °C e 200 bar apresentou atividade antioxidante fraca variando de 23 a 31 %. Já os extratos obtidos a 40 °C/100 bar, 40 °C/300 bar e 50 °C/100 bar apresentaram uma atividade antioxidante inferior, atuando como pró-oxidantes, acelerando a reação de oxidação do β -caroteno com AA variando de (-1 a -29%; 4 a -13 e -7 a -51), respectivamente. A 50 °C e 300 bar o extrato apresentou AA bem mais elevada que a do β -caroteno variando de 119 a 188%.

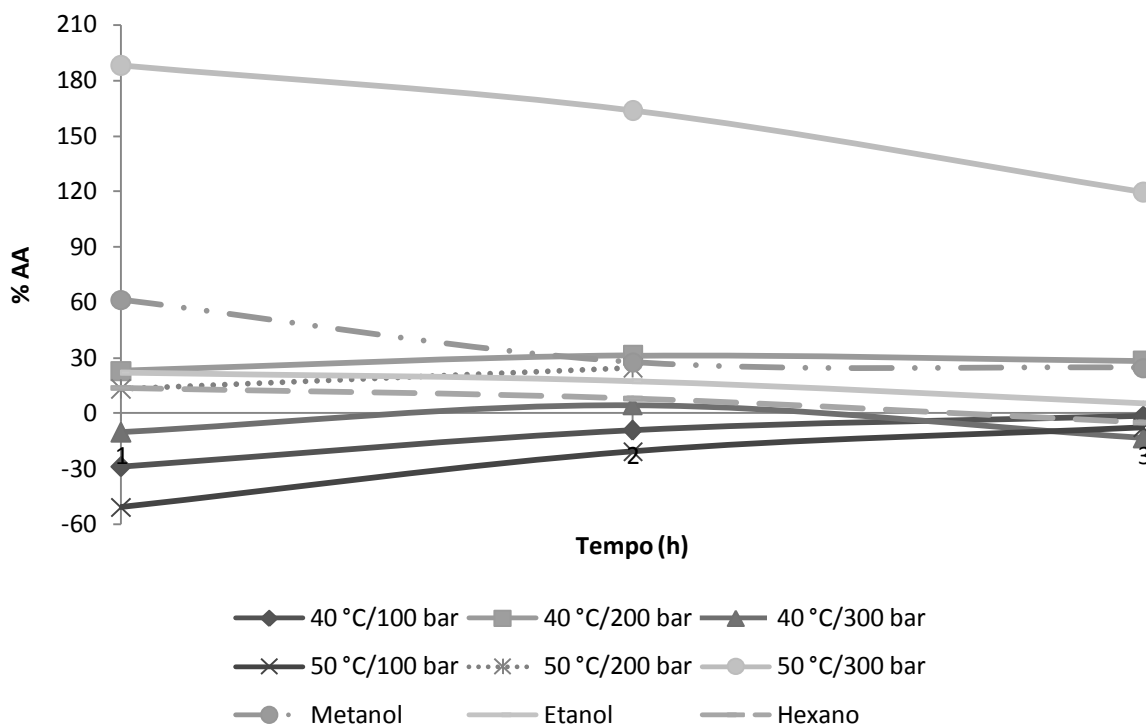


Figura 4.5: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de lavanda brasileira analisados pela reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico.

A habilidade dos antioxidantes de seqüestrar radicais livres, avaliada pelo método DPPH que não demonstrou ser eficaz para o caso da lavanda brasileira, quando comparadas às atividades da rutina e do BHT. O método ORAC também relacionado à reação com radicais livres, neste caso por uma reação iniciada pela adição de AAPH e adaptada para substâncias lipossolúveis, apresentou valores de AA apenas 3 vezes menor que a atividade dos compostos de referência, demonstrando que pelo método ORAC o extrato SFE e o óleo volátil apresentaram uma AA significativa. Finalmente, pelo método β -caroteno /ácido linolênico, que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico, os extratos apresentaram uma AA que variou de acordo com o solvente utilizado (metanol, etanol e hexano) e de acordo com a condição SFE empregada. Podemos constatar que a avaliação da habilidade de extratos de plantas atuarem como antioxidantes é um processo complexo, que depende diretamente da metodologia de análise aplicada, do tipo de extrato analisado, da composição química dos extratos.

A Figura 4.6 apresenta os resultados da reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico em função da absorbância e do tempo de reação.

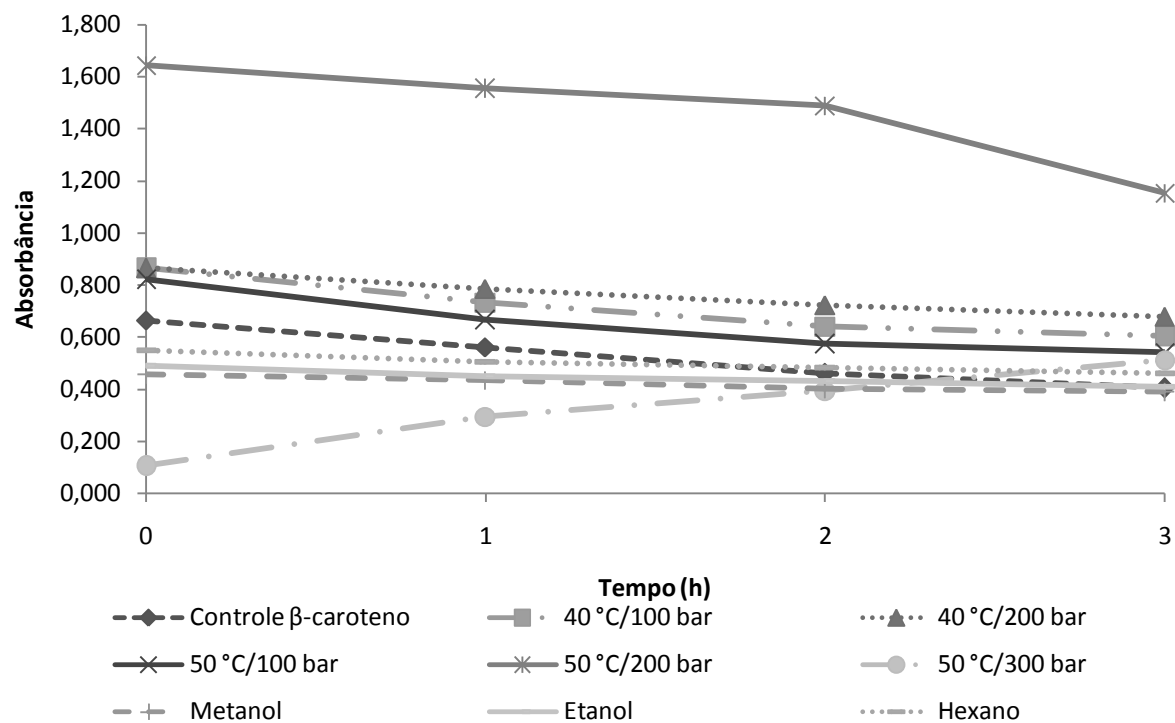


Figura 4.6: Reação acoplada β-caroteno/ácido linolênico (absorbância *versus* tempo de reação) dos extratos de lavanda brasileira.

4.2 Quebra pedra

4.2.1 Caracterização da Matéria-prima

O diâmetro médio das partículas (dp) utilizadas nos ensaios para determinação do rendimento global foi de $8,4 \times 10^{-4}$ m.

4.2.2 Rendimento Global de Extração

A Tabela 4.5 apresenta os rendimentos globais de extração obtidos através de extração supercrítica (SFE) e extração a baixa pressão (LPSE) com solventes orgânicos (metanol, etanol e hexano).

Tabela 4.5: Rendimento global de extração de quebra pedra obtido por SFE e por (LPSE).

Extração SFE		Extração LPSE			
Condições de Operação		Densidade	Rendimento	Solvente	Rendimento
T (°C)	P (bar)	CO ₂ (kg/m ³)	(% massa) ^a		(% massa) ^b
40	100	628	2,30 ± 0,01	Metanol	10,20 ± 0,04
	150	780	2,90 ± 0,09	Etanol	3,40 ± 0,04
	200	839	1,90 ± 0,01	Hexano	1,90 ± 0,04
	250	879	-	-	-
	300	909	1,60 ± 0,01	-	-
50	100	384	0,80 ± 0,01		
	150	699	3,20 ± 0,08	-	-
	200	784	2,20 ± 0,01		
	250	834	3,60 ± 0,04	-	-
	300	870	2,50 ± 0,01	-	-

^aRendimento do extrato supercrítico de quebra pedra em base úmida.

^bRendimento do extrato a baixa pressão de quebra pedra em base úmida.

Diferentes fatores afetam a eficiência o processo de extração supercrítica, sendo necessário determinar as melhores condições de extração empiricamente. Por exemplo, com o aumento do poder de solvatação do dióxido de carbono por mudança na pressão, temperatura e densidade é possível maximizar a extração dos produtos (Saengcharoenrat e Guyer, 2004). Através da investigação da influência da temperatura e pressão no rendimento global de extração de quebra pedra, verificou-se que o maior rendimento foi obtido a 50 °C e 250 bar ($3,60 \pm 0,04$).

As isotermas de rendimento global de extração da quebra pedra são apresentadas nas Figuras 4.7(a) e 4.7(b).

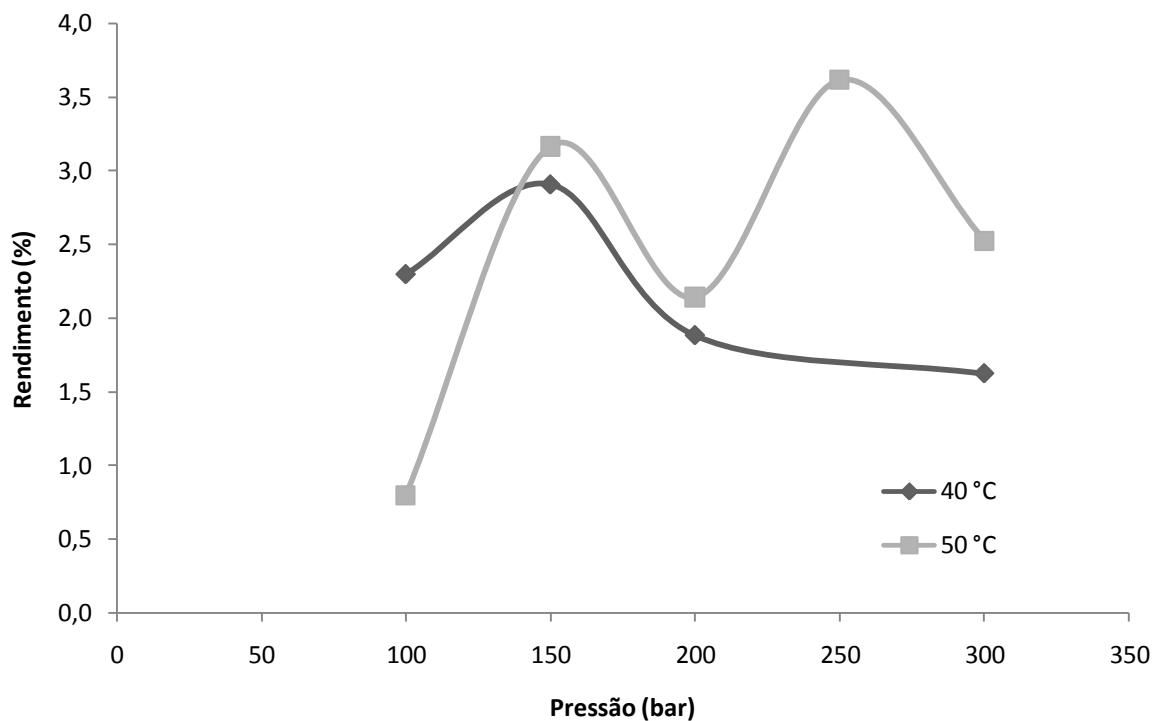


Figura 4.7(a): Isotermas de Rendimento Global do Sistema quebra pedra + CO₂.

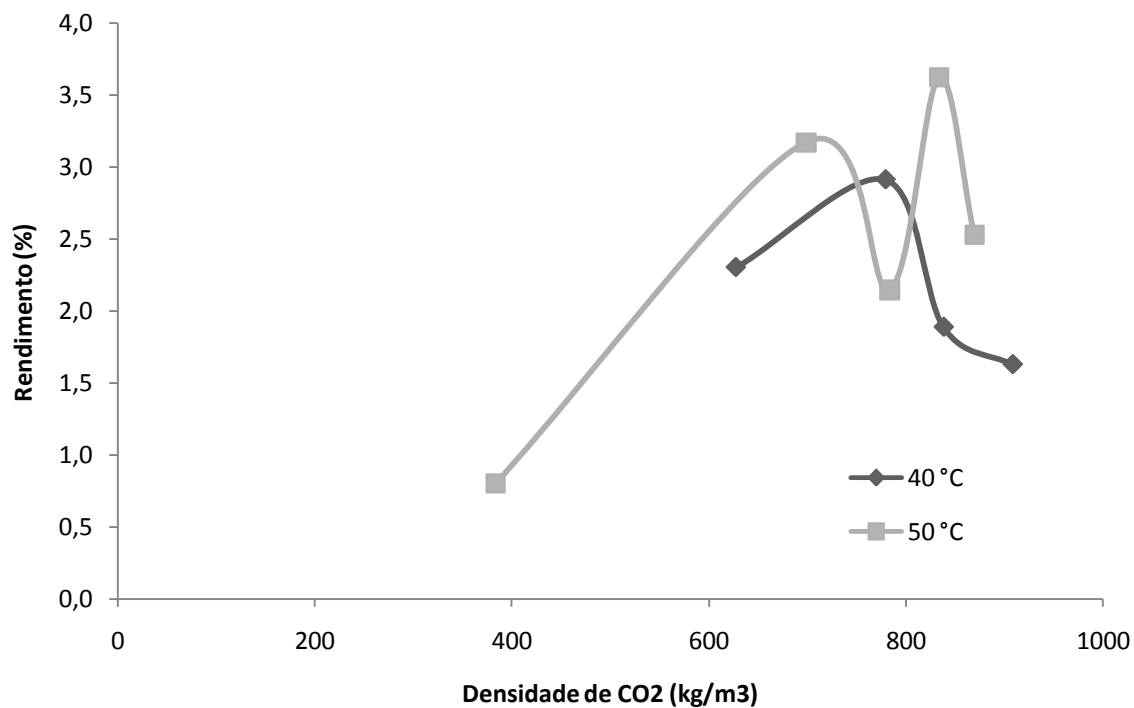


Figura 4.7(b): Isotermas de Rendimento Global do Sistema quebra pedra + CO₂.

O poder de solubilização do CO_2 no estado supercrítico depende da sua densidade, e nas regiões próximas ao ponto crítico, a densidade aumenta bruscamente com o aumento da pressão a temperatura constante e também diminui com o aumento da temperatura a pressão constante. Embora a densidade do CO_2 seja conhecida, é necessário também conhecer as interações entre quebra pedra + CO_2 e como estas variam com a densidade. As interações podem ser descritas por meio da solubilidade medida para o sistema quebra pedra + CO_2 ou através da determinação do rendimento global de extração.

Observa-se na Figura 4.7(a) que o aumento da pressão de 100 bar para 150 bar nas duas isothermas provoca um aumento no rendimento global, na densidade do solvente e consequentemente na solubilidade do extrato de quebra pedra. Nas pressões variando de 150 bar a 200 bar a influência da temperatura no rendimento foi desprezível, apesar de haver diferença na densidade do solvente conforme a Figura 4.6(b). Pode-se constatar na Figura 4.7(a) que para pressões inferiores a 100 bar, o rendimento global é maior na isoterma de 40 °C que na isoterma de 50 °C. Neste caso, prevalece o efeito da densidade do solvente sobre o efeito da pressão de vapor do soluto. Na Figura 4.7(b) nota-se que a densidade do CO_2 diminui com o aumento da temperatura e como resultado a solubilidade do extrato de quebra pedra em CO_2 também diminui. Na pressão de 135 bar as isothermas convergem e os dois efeitos de pressão de vapor do soluto e densidade do solvente tem a mesma importância sobre a solubilidade e consequentemente sobre o rendimento global. Acima desta pressão o rendimento global é maior na isoterma de 50 °C que na isoterma de 40 °C, portanto para pressões maiores que 135 bar o efeito da pressão de vapor do soluto é mais importante. Podemos verificar que os valores da densidade do solvente nas isothermas de 40 °C e 50 °C diminui a medida que aumentamos a pressão. Entretanto, observa-se que o rendimento global na isoterma de 50 °C apresenta dois pontos de máximo a 150 bar e a 250

bar, já para a isoterma de 40 °C observa-se pequenas diminuições no rendimento com o aumento da pressão.

Baixos rendimentos totais médios foram obtidos no solvente apolar hexano ($1,9 \pm 0,04\%$), enquanto que maior rendimento foi obtido com o solvente polar metanol ($10,2 \pm 0,04\%$).

As colorações dos extratos também foram distintas de acordo com o solvente usado na extração LSPE. Os extratos de quebra pedra apresentaram uma tonalidade verde-amarelada.

4.2.3 Análises Químicas

Foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada a fim de verificar a presença de óleo volátil, pigmentos, flavonóides, saponinas e triterpenos nos diferentes extratos SFE e extratos LPSE de quebra pedra, conforme descrito no Capítulo 3.

4.2.3.1 Óleo Volátil

De acordo com Wagner (1985) a presença de óleo volátil é confirmada pela presença de bandas arroxeadas quando a placa cromatográfica é tratada reveladores adequados. Houve o aparecimento das bandas, portanto, os extratos SFE obtidos a 40 °C e 50 °C nas diferentes pressões de operação, portanto os extratos obtidos com solventes orgânicos apresentam óleo volátil em sua composição.

Analisando as bandas com a revelação das placas para verificação da presença de óleos voláteis foi observado que não há diferença perceptível entre as bandas originadas do extrato SFE nas temperaturas de 40 °C e 50 °C para as diferentes pressões analisadas (Figura 4.8). Comparando as bandas das CCDs, de SFE com a de LPSE foi observado que nesta última as bandas aparecem em posições e colorações diferentes indicando uma composição diferente entre

estes extratos, como já era esperado devido às diferenças de polaridade dos solventes utilizados para extração.

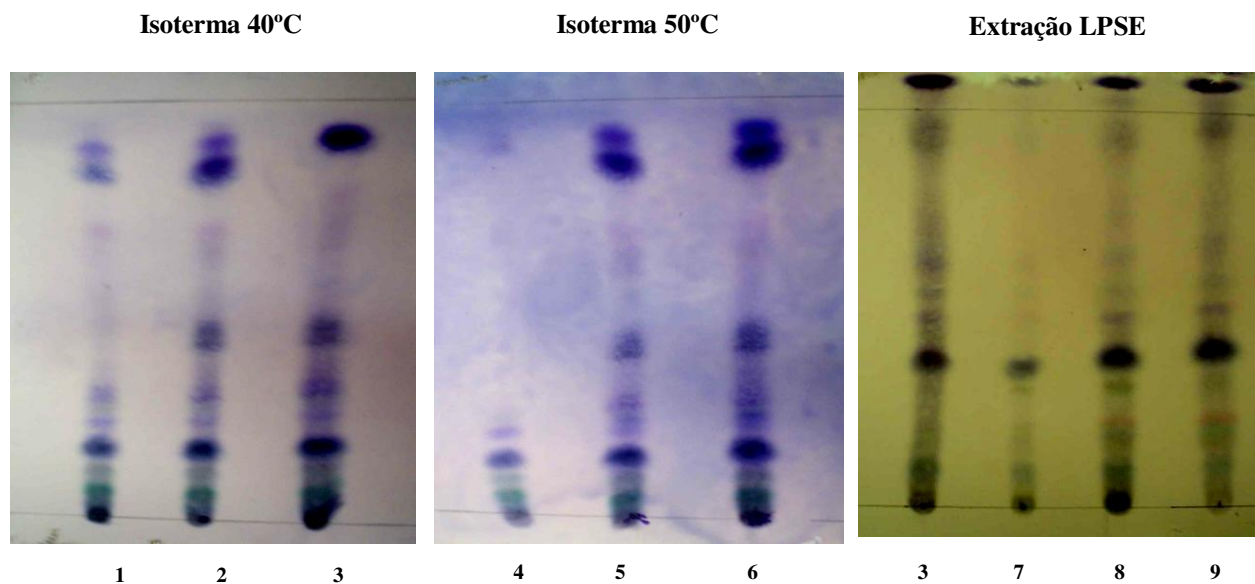


Figura 4.8: CCD para detecção de óleo volátil presente nos extratos de quebrapaedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).

Do ponto de vista químico os óleos voláteis são de misturas complexas, que se compõem, sobretudo, de terpenos. A medicina recorre frequentemente a substâncias presentes nestes óleos voláteis como, por exemplo, ao mentol, a canfora, ao eucaliptol, entre outros, devido a suas propriedades fisiológicas como, expectorante, digestivo, desinfectante, bactericida, entre outras.

4.2.3.2 Pigmentos e Flavonóides

Na Figura 4.9 as bandas na parte superior das placas indicam a presença de pigmentos em todos os extratos analisados. Nas bandas referentes aos extratos metanólico e etanólico observou-se a presença de duas bandas com mesmos R_fs (razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente), o que indica a presença de diferentes pigmentos nestes dois extratos.

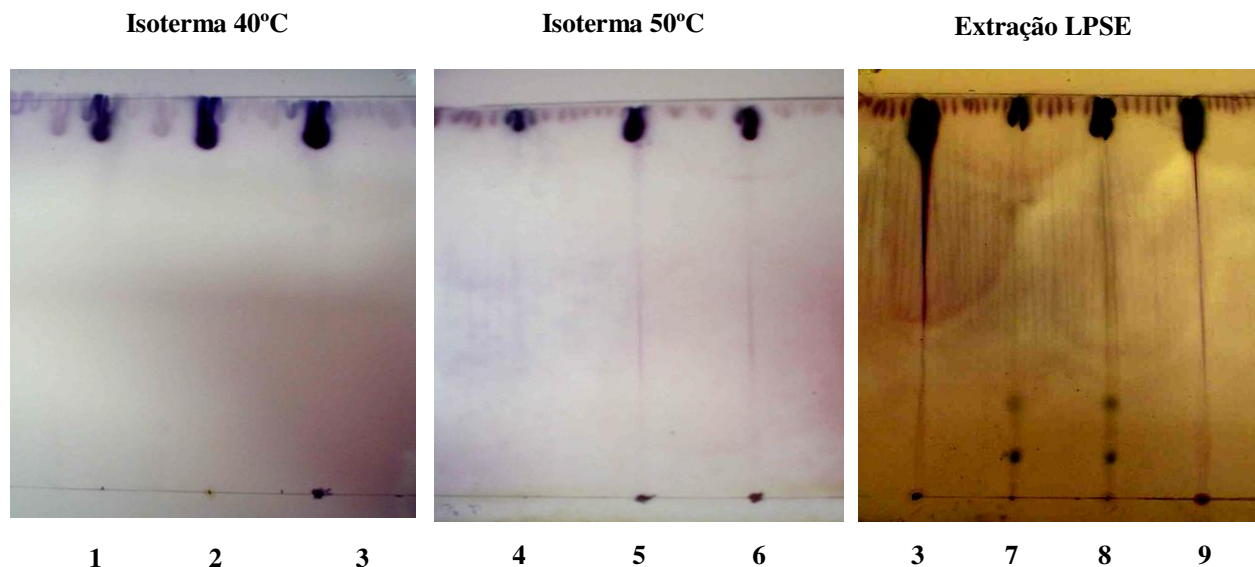


Figura 4.9: CCD para detecção de pigmentos presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).

Segundo Wagner (1985) a presença de bandas laranja-amarelo e amarelo-verde indicam a presença de flavonóides, com uso dos eluente e revelador descritos anteriormente.

As CCDs dos extratos SFE de quebra pedra apresentados na Figura 4.10 mostram as bandas alaranjadas nas pressões de 200 e 300 bar para ambas as temperaturas. Na CCD para extratos à baixa pressão de quebra pedra foi também utilizado o extrato SFE na condição 40 °C a 300 bar; para fins de comparação com os extratos LPSE. As bandas superiores laranjas fluorescente confirmaram a presença de flavonóides em todos os extratos de quebra pedra. As bandas dos extratos de solvente orgânico foram mais intensas que a do extrato supercrítico.

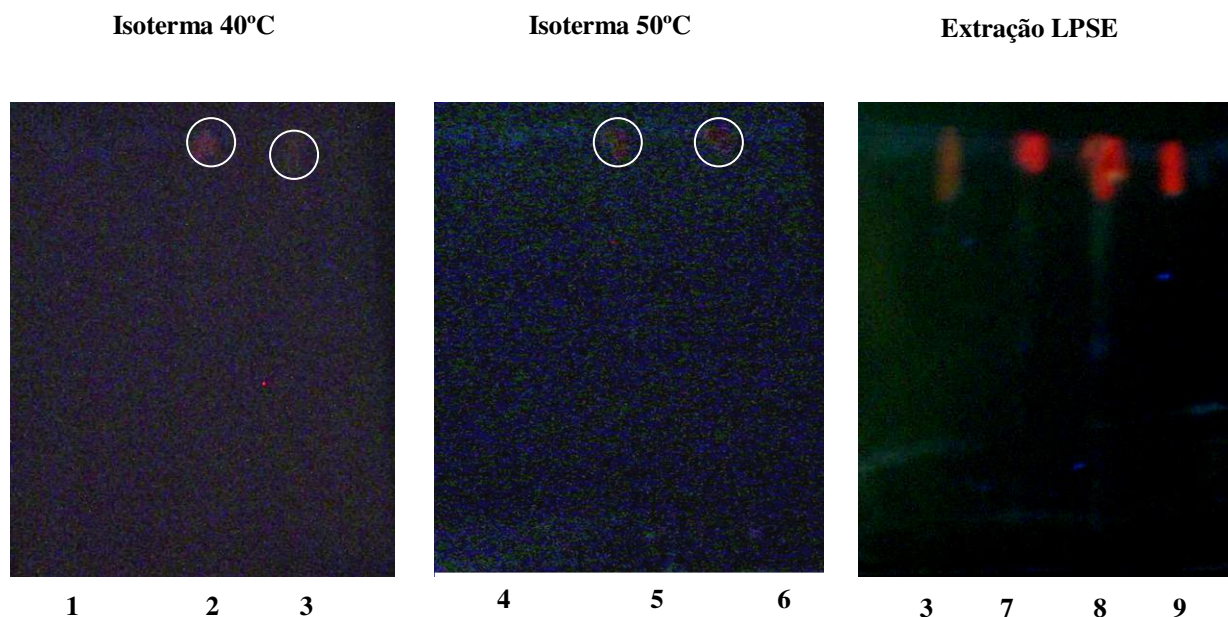


Figura 4.10: CCD para detecção de flavonóides presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).

Os flavonóides são substâncias de origem natural encontradas na maioria dos vegetais, onde desempenham o papel de bloqueadores da radiação ultravioleta, além de atuarem na pigmentação dessas espécies. No desenvolvimento de pesquisas científicas, os flavonóides são utilizados como marcadores taxonômicos, substâncias que auxiliam na identificação botânicas das plantas. Na ecologia química eles funcionam como indicativos para a polinização por insetos. Em seres humanos e animais, os favonóides apresentam efeitos potenciais como antioxidante, antiinflamatório, protetor cardíaco, analgésico, antialérgico, anticancêr, antiulcera, entre outros.

Dentre os antioxidantes encontrados no extrato de quebra pedra estão as lignanas (Shahidi, 1997), as taninas como a quercetina e os flavonóides (Simic e Karel, 1979). Segundo Khatoon *et al.* (2005), a análise fitoquímica dos extratos de quebra pedra registra a presença de glicosídeos, flavonóides, alcalóides e taninos quando extraídas com álcool, o que demonstra a natureza polar destes compostos extraídos da quebra pedra. Segundo Rajeshkumar *et al* (2002),

flavonóides naturais encontrados no extrato de quebra pedra mostraram experimentalmente atividade significativa contra cânceres.

4.2.3.3 Saponinas UV

Foi observado na Figura 4.11 que não há a presença de saponinas nos extratos SFE obtidos a 100 bar, nas temperaturas de 40 °C e 50 °C. Nas demais temperaturas e pressões foram observadas bandas amarelas e laranjas fluorescentes, ou seja, nas demais condições de SFE saponinas foram extraídas.

Na placa LPSE da Figura 4.11 foi observado que todos os extratos apresentam saponinas, mas o extrato SFE apresentou diferentes colorações para as bandas, indicando que na SFE há a extração de maior variedade de saponinas que nas extrações à baixa pressão com solvente orgânico. Wagner (1985) descreve a detecção de saponinas com a visualização de bandas amarelas ou laranjas fluorescentes quando o cromatograma é eluído e revelado adequadamente.

As saponinas, também chamadas saponosídeos, formam um grupo particular de heterosídeos derivados de triterpenos tetracíclicos, sendo muito comuns nas plantas medicinais. O nome provém do fato de formarem espuma abundante quando agitadas na água; devido a esta propriedade são excelentes emulsificantes. Do ponto de vista químico caracterizam-se por um radical glucídico (glucose, galactose) ligado a um radical aglicono. Uma propriedade característica das saponinas é proporcionar a hemólise dos glóbulos vermelhos (eritrócitos), isto é, libertam hemoglobina, o que explica o efeito tóxico de algumas saponinas. As saponinas geralmente possuem propriedades hemolíticas e purificativa (Wagner e Wolff, 1977). Segundo Khatoon *et al.* (2005), a análise fitoquímica dos extratos de quebra pedra registra a presença alcalóides, taninas e saponinas quando extraídos com água (Khatoon *et al.*, 2005).

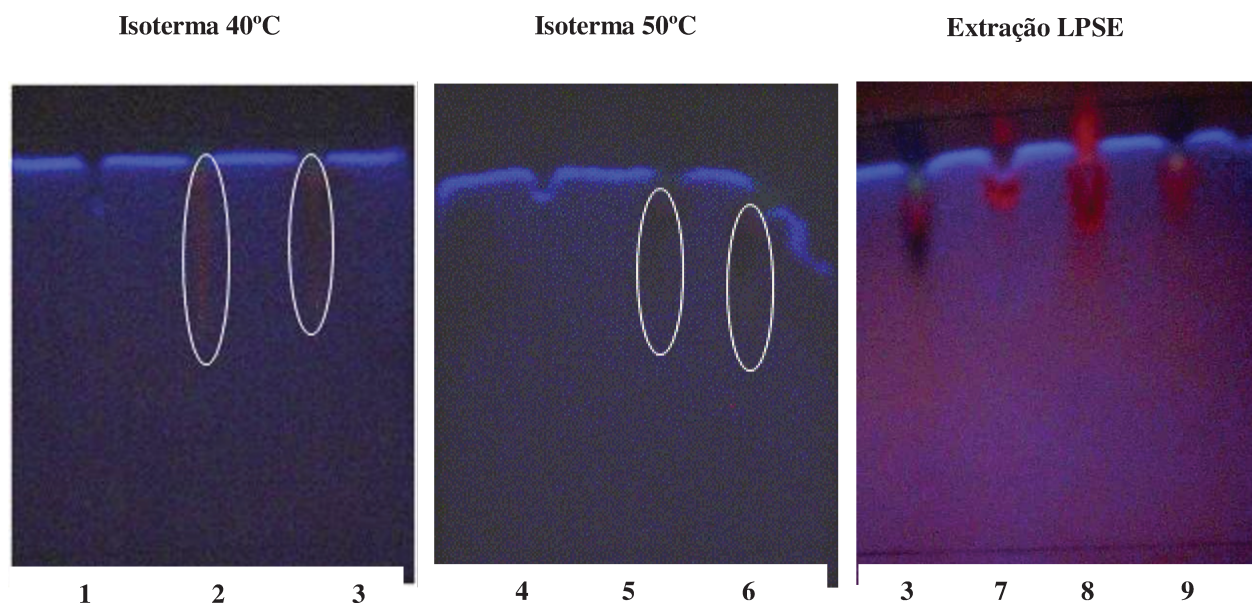


Figura 4.11: CCD para detecção de saponinas presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).

4.2.3.4 Triterpenos

Analisando as bandas para a CCD a 40 °C na Figura 4.12, observa-se a semelhança entre as bandas nas diversas pressões. O mesmo foi visto para a CCD a 50 °C. Comparando-as entre si (isotermas) observa-se, da metade para cima na placa SFE a 50 °C, bandas azuladas e arroxeadas ausentes na placa referente aos extratos LPSE. Este fato indica que na extração SFE a 50 °C são extraídos mais compostos que nas demais extrações SFE a 40 °C, e extração LPSE, fato que demonstra a seletividade do processo SFE, pela influência das condições de operação na composição dos extratos.

No cromatograma referente à LPSE nota-se que o extrato metanólico foi o que apresentou menos bandas referentes à presença de triterpenos, este fato leva a conclusão que os triterpenos presentes nos extratos SFE de quebra pedra, principalmente os extratos obtidos na temperatura de

50 °C, são compostos apolares. Nos extrato supercrítico (40 °C/300 bar) e no etanólico as bandas foram similares. O extrato hexanólico mostrou uma banda acentuada na parte superior da placa. Segundo Khatoon *et al.* (2006), a análise fitoquímica dos extratos de quebra pedra registra a presença de triterpenóides, quando extraídos com hexano.

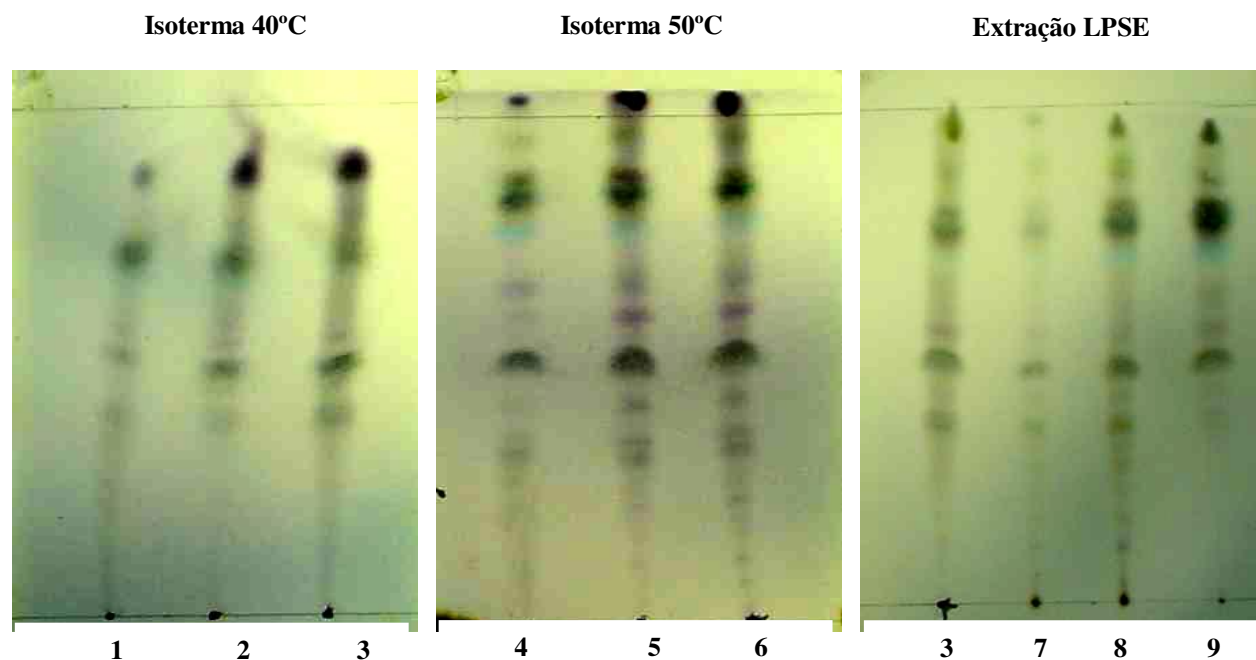


Figura 4.12: CCD para detecção de triterpenos presentes nos extratos de quebra pedra 1 (40 °C/100 bar); 2 (40 °C/200 bar); 3 (40 °C/300 bar); 4 (50 °C/100 bar); 5 (50 °C/200 bar); 6 (50 °C/300 bar) 7 (MeOH); 8 (EtOH); 9 (Hexano).

4.2.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos de quebra pedra

4.2.4.1 Atividade antiinflamatória dos extratos de quebra pedra

A atividade antiinflamatória do extrato SFE de quebra pedra foi avaliada comparativamente com a atividade do NDGA. Não se observou nenhum efeito inibitório significativo sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L). Os extratos de quebra pedra também apresentaram um efeito acelerador da reação de inflamação *in vitro*

desencadeada pela lipoxigenase. Desta forma, também é interessante o estudo do efeito alelopático deste extrato sobre fungos, insetos e protozoários em plantas.

Kassuya *et al* (2003) mostraram que o extrato hexanólico de quebra pedra possui compostos com ação antiinflamatória e Raphael e Kutton (2003) mostraram que o extrato metanólico de quebra pedra inibe lesões gástricas.

4.2.4.2 Atividade antioxidante dos extratos de quebra pedra

A atividade antioxidante (AA) do extrato de quebra pedra obtido a 40 °C e 250 bar foi comparada a dois componentes de referência (BHT e Rutina), utilizando-se o método DPPH. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6. O extrato de quebra pedra foi 188 vezes menos eficaz que a rutina, antioxidante natural, e 425 vezes menos eficaz que o BHT, antioxidante sintético. Este método avalia a habilidade do antioxidante (extrato de quebra pedra) de doar hidrogênio ou elétrons. A eficácia da capacidade antioxidante dos componentes bioativos depende de sua estrutura química, da concentração destes fitoquímicos no alimento e do meio no qual encontra-se o AA (etanólico, metanólico ou aquoso).

Apesar de a composição química ter indicado a presença de flavonóides nos extratos de quebra pedra e de saber-se das características antioxidantes referentes a estes compostos verificamos que dentre os flavonóides existem estruturas químicas distintas conforme mostram as Figuras 4.13 e Figura 4.14. Portanto, os flavonóides presentes nos extratos de quebra pedra possivelmente apresentam estruturas como a apresentada na Figura 4.13, devido a sua pouca habilidade em doar hidrogênio ou elétrons de acordo com o método de avaliação da AA DPPH. O número de hidroxilas ligadas ao anel benzenico está diretamente relacionada com AA do flavonóide.

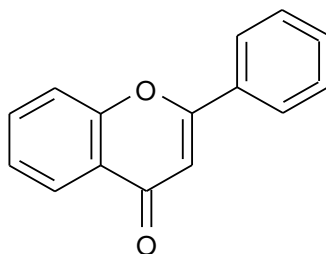


Figura 4.13: Critério estrutural de um flavonóide que não apresenta atividade antioxidante.

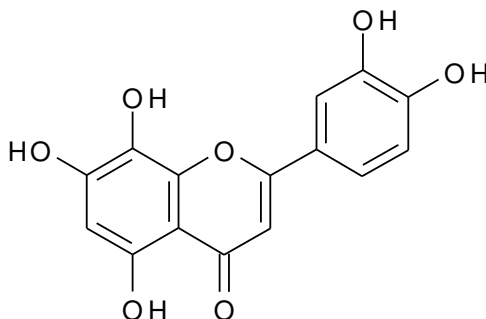


Figura 4.14: Critério estrutural de um flavonóide com alta atividade antioxidante

O teor destes compostos em vegetais é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros fatores. Sabe-se ainda que a atividade antioxidante seja influenciada pelo substrato lipídico utilizado no ensaio, o solvente e a técnica de extração empregados (Madsen e Bertelsen, 2003).

Tabela 4.6: Atividade antioxidante dos compostos de referência (Rutina e BHT) e do extrato SFE de Quebra pedra.

Método DPPH	
Sc ₅₀ (Rutina) (mg/L)	9,0 ± 0,3
Sc ₅₀ (BHT) (mg/L)	4,0 ± 0,3
Sc ₅₀ (SFE) ^a (mg/L)	1700 ± 0,4

^aSFE: extrato supercrítico da planta (40 °C e 250 bar).

A seguir são apresentados os resultados referentes à AA de diferentes extratos de quebra pedra avaliados pela reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico, conforme Figura 4.15 e Figura 4.16. Segundo Koleva *et al* (2002), a oxidação lipídica é um complexo processo em cadeia, no

qual estão envolvidos vários tipos de radicais livres de diferentes reatividades do substrato lipídico, solubilidades e mecanismos de ação. Além disso, a complexa composição dos extratos vegetais pode provocar interações sinérgicas ou antagônicas entre os compostos presentes, podendo também afetar sua partição nas fases do meio e conseqüentemente sua ação antioxidante.

A Figura 4.15 apresenta os resultados da reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico em função da absorbância e do tempo de reação.

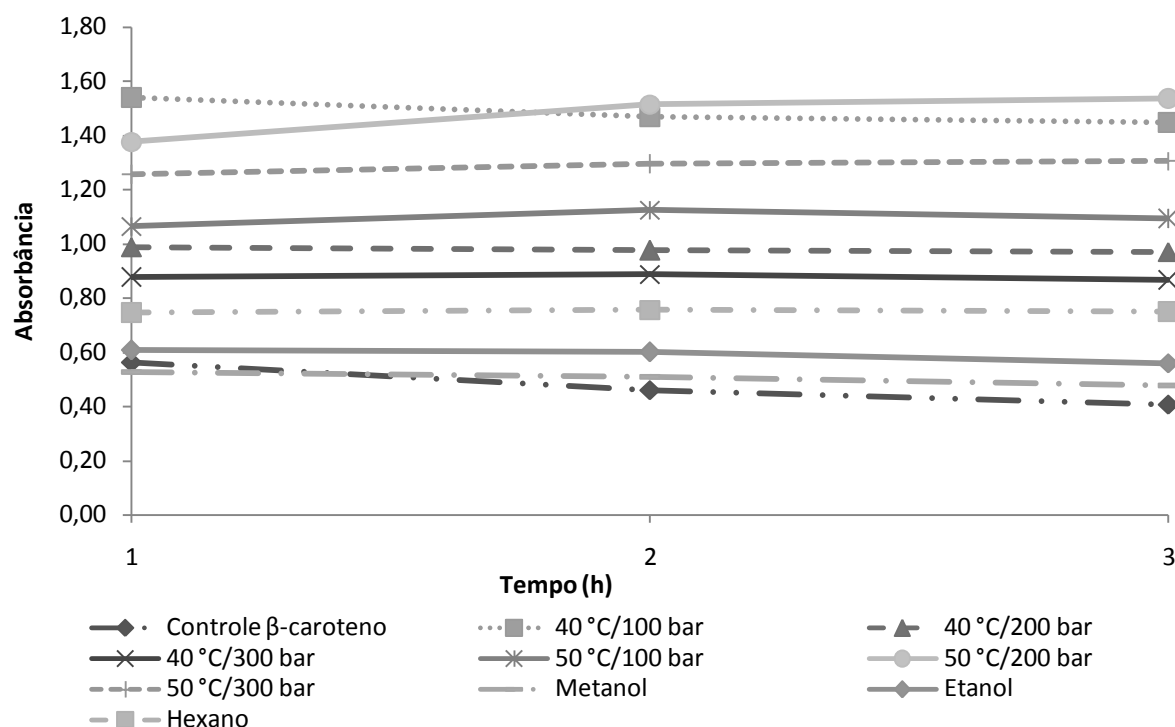


Figura 4.15: Reação acoplada β -caroteno /ácido linolênico (absorbância *versus* tempo de reação) dos extratos de quebra pedra.

Analisando os resultados da AA, avaliada pela reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico, constatou-se que a maior atividade antioxidante foi atingida com o extrato SFE obtido a 50 °C e 200 bar, que apresent AA variando entre 117 e 175%, conforme mostra a Figura 4.16. O extrato etanólico apresentou AA de 170% em uma hora de reação, 141% em duas horas de

reação e 87% em três horas de reação. O extrato hexânico apresentou comportamento semelhante em uma, duas e três horas de reação com AA de 217, 202 e 177%, respectivamente. Pode-se notar que os extratos SFE apresentam estabilidade frente à reação, pois o valor da AA se mantém constante com o passar do tempo. Por exemplo, o extrato SFE obtido a 40 °C e 200 bar apresentou valores de AA de 118 % em uma hora de reação, 103% em duas horas de reação e 100% em três horas de reação; o extrato obtido a 40 ° C e 250 bar apresentou comportamento semelhante em uma hora de reação com a AA foi de 53% em duas horas de reação 42% e em três horas de reação 37%. A estabilidade de antioxidantes frente a reações é indicativo de qualidade destas substâncias. Outro ponto de vista que pode ser levado em consideração são as diferenças de AA observadas para os extratos obtidos pelas duas técnicas de extração estudadas. Dentre os extratos LPSE estudados o extrato metanólico apresentou AA 60% em uma hora de reação; 48% em duas horas de reação e 17% em três horas de reação, os extratos metanólico e etanólico apresentaram comportamento semelhante em relação ao tempo de reação. Estes resultados indicam pouca estabilidade dos compostos antioxidantes presentes nestes extratos frente à reação que avalia a proteção que os compostos presentes no extrato conferem ao β -caroteno. Dentre os extratos SFE obtidos a 40 °C verificou-se que a AA variou de 21% para o extrato SFE, obtido a 40 °C e 300 bar em uma hora de reação a 118% de AA para o extrato obtido a 40 °C e 200 bar em uma hora de reação. Para os extratos obtidos com solventes orgânicos já era esperada a diferença em termos de atividade antioxidante, visto que extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades apresentam uma composição distinta, e conseqüentemente uma atividade antioxidante diferente. Já os extratos SFE apresentam diferenças muito sutis em termos de polaridade, a maior diferença entre estes extratos diz respeito às condições de operação pressão e temperatura que definem automaticamente a propriedade de densidade do CO₂ e que influenciam o processo em termos de fenômenos relacionados ao processo de transferência de massa entre o

soluto e o solvente. Desta forma, a análise da densidade do CO₂, nas diferentes condições de extração, com a atividade antioxidante dos extratos obtidos nestas condições é pertinente. Foi observado que os extratos obtidos nas condições de operação de 40 °C/200 bar (densidade do CO₂=839 kg/m³), apresentou uma AA constante e em torno de 100 %. Já os extratos obtidos a 40 °C/250 bar (densidade do CO₂ = 879 kg/m³) e 40 °C/300 bar (densidade do CO₂= 909 kg/m³) apresentaram as AA menos efetivas, comparadas as dos demais extratos que variaram de 21 a 66%. O extrato obtido a 50 °C e 200 bar (densidade do CO₂ = 784 kg/m³) apresentou a maior AA. Desta forma, pode-se constatar a seletividade do processo de extração supercrítica. Poucas variações na densidade do dióxido de carbono (784 kg/m³, 839 kg/m³, 879 kg/m³ e 909 kg/m³) ocasionam grandes variações no potencial antioxidante dos extratos.

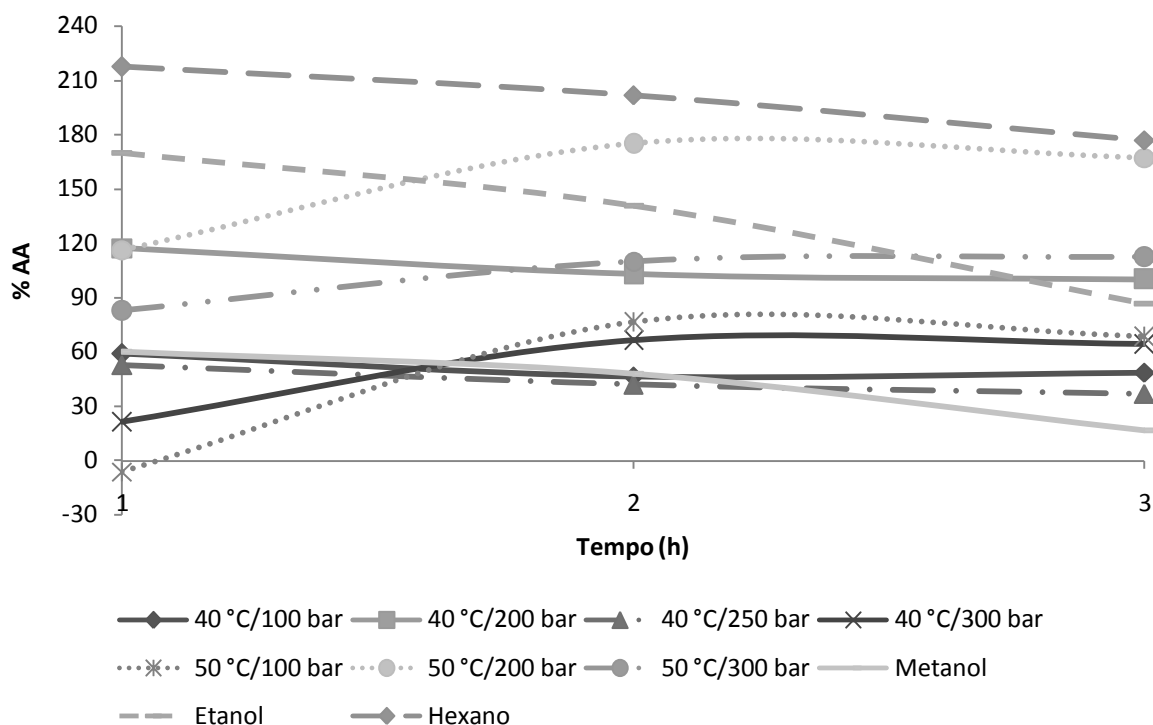


Figura 4.16: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de quebra pedra analisados pela reação acoplada β-caroteno/ácido linolênico.

A reação acoplada de β -caroteno/ácido linolênico é colorimétrica, e o responsável pela coloração amarela da solução é o β -catoreno um antioxidante natural. No tempo zero a coloração é intensa; quando o extrato tem baixo poder antioxidante o β -catoreno é consumido rapidamente com o tempo na reação de oxidação e a solução perde a cor ligeiramente. Assim, é natural que a atividade antioxidante dos extratos deve diminuir com o tempo. Podemos observar que os extratos obtidos com diferentes solventes orgânicos apresentam uma redução acentuada no grau de atividade antioxidante com o passar da reação. Os extratos supercríticos de quebra pedra, apresentaram uma boa atividade antioxidante e um perfil de estabilidade como mencionado anteriormente.

4.3 Ginseng brasileiro

4.3.1 Caracterização da Matéria-prima

A umidade média das folhas de ginseng brasileiro foi de 6,7%; a densidade aparente (d_a), a densidade real (d_r), a porosidade do leito (ϵ) e o diâmetro médio das partículas (d_p) utilizados nos ensaios para determinação do rendimento global foram: 0,863 g/cm³; 1,408 ± 0,004 g/cm³; 0,38 e 7,9 × 10⁻⁴ m, respectivamente.

4.3.2 Rendimento Global de Extração

Na Tabela 4.7 são apresentados os rendimentos de extração obtidos para diferentes condições de operação para o processo SFE, e os valores médios obtidos pelo processo de extração a baixa pressão, como descrito no Capítulo 3.

Tabela 4.7: Rendimento global de extrato de ginseng brasileiro obtido por SFE e por LPSE.

Extração SFE				Extração LPSE	
Condições de Operação		Densidade	Rendimento	Solvente	Rendimento
T (°C)	P (bar)	CO ₂ (kg/m ³)	(% peso) ^a		(% peso) ^b
30	100	727	0,50±0,02	Metanol	8,2 ± 0,8
	150	832	0,60 ± 0,01	Etanol	2,2 ± 0,7
	200	894	0,90 ± 0,01	Hexano	0,6 ± 0,1
	250	940	1,40 ± 0,07		
	300	976	1,0 ± 0,1		
40	100	628	0,60 ± 0,01		
	150	780	1,00 ± 0,03		
	200	839	1,00 ± 0,03		
	250	879	1,3 ± 0,1		
	300	909	1,10 ± 0,02		
		384	0,8 ± 0,1		
		784	1,00 ± 0,04		
		870	1,00 ± 0,04		

^aRendimento do extrato supercrítico de ginseng brasileiro em base seca.

^bRendimento do extrato a baixa pressão de ginseng brasileiro em base seca.

Para avaliar a influência do solvente na extração, o processo SFE foi comparado com o processo de extração a baixa pressão (LPSE). Os resultados demonstram que no tempo total de 2 horas de extração o extrato SFE que apresentou maior rendimento foi obtido a 30 °C e 250 bar (1,40 ± 0,07%). Os extratos LPSE apresentaram valores de 8,2 ± 0,8%, 2,2 ± 0,7% e 0,6 ± 0,1% para os extratos metanólico, etanólico e hexânico, respectivamente. O extrato hexânico

apresentou um rendimento menor que os extratos SFE, confirmando a seletividade dos compostos de acordo com a polaridade dos solventes empregados nas extrações. Comparando os rendimentos obtidos por SFE com o rendimento obtido com a utilização do solvente orgânico hexano verificou-se uma maior eficiência em relação ao rendimento quando a extração SFE foi utilizada. O extrato etanólico apresentou um rendimento de mesma ordem de grandeza que o extrato SFE. As desigualdades dos rendimentos globais indicam não somente que a polaridade do solvente usado influencia no valor global como também este cresce com a polaridade. As colorações dos extratos também foram distintas de acordo com o solvente utilizado; o extrato metanólico apresentou coloração verde mais intensa que o extrato etanólico e hexânico, colorações que podem ter sido diferenciadas devido à presença de clorofila nos extratos, conforme mostra a Figura 4.17.

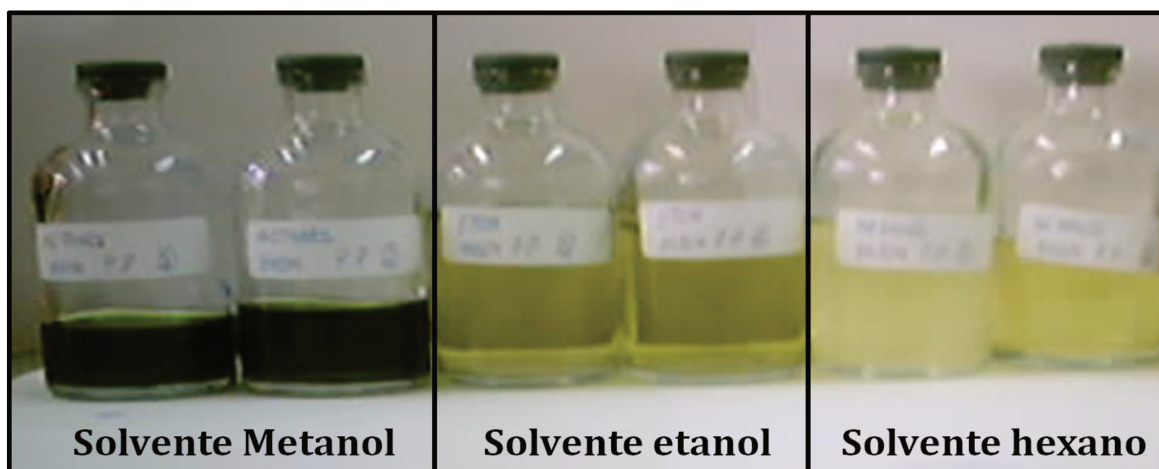


Figura 4.17: Extratos LPSE do ginseng brasileiro.

As Figuras 4.18(a) e 4.18(b) apresentam as isotermas de rendimento global do ginseng brasileiro. As pressões de inversão entre as isotermas de 30 °C e 40 °C foram determinadas nas proximidades de 225 bar e 285 bar. Em pressões superiores a 225 bar nas isotermas de 30 °C e 40 °C verificou-se que a influência da temperatura no rendimento global é desprezível (Figura

4.18(a)), apesar de haver diferença em função da densidade do solvente Figura 4.18(b). Os efeitos da pressão e da temperatura no rendimento global são semelhantes aos efeitos desses parâmetros na solubilidade do extrato de ginseng brasileiro em CO₂ supercrítico. Para o sistema ginseng brasileiro + CO₂ supercrítico os efeitos da pressão de vapor do soluto são muito importantes nas pressões que antecedem a pressão de inversão (225 bar). Pode-se observar que na isoterma de 40 °C são apresentados rendimentos globais superiores aos rendimentos obtidos nas mesmas pressões para isoterma de 30 °C. Desta forma, constata-se que a temperatura influencia fortemente a pressão de vapor da mistura de solutos nas pressões inferiores a 225 bar. Para as isotermas de 40 °C e 50 °C observou-se que as pressões de inversão foram determinadas nas proximidades de 125 bar e 200 bar. Neste caso, observou-se influência da temperatura na pressão de vapor da mistura de solutos em pressões inferiores a 125 bar, já para pressões superiores a 150 bar o rendimento global foi maior a 40 °C do que a 50 °C, portanto para pressões maiores que 150 bar não pode ser negligenciado o efeito da densidade do solvente no rendimento global de extrato, ou seja, o efeito da pressão de vapor do soluto é menos importante que o efeito da densidade de solvente.

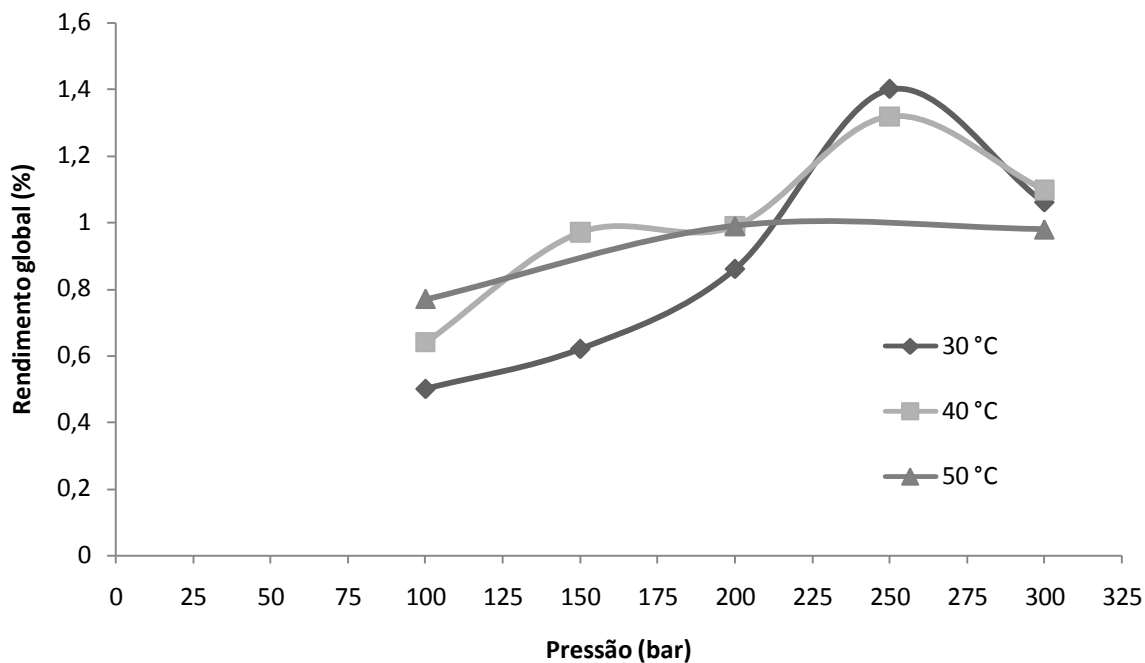


Figura 4.18(a): Isotermas de Rendimento Global do sistema ginseng brasileiro + CO₂

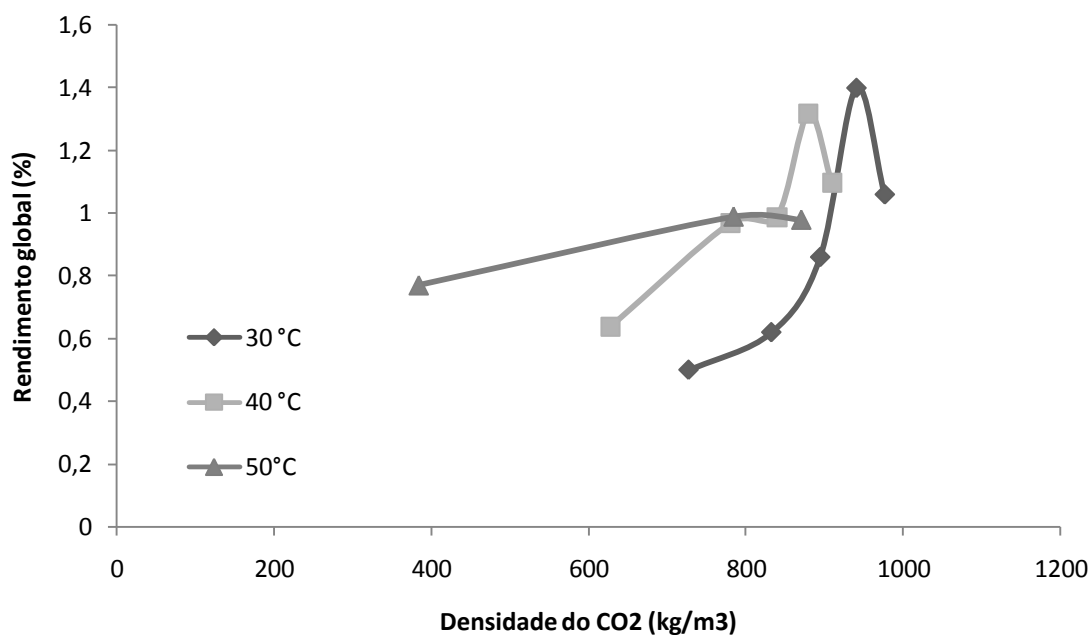


Figura 4.18(b): Isotermas de Rendimento Global do sistema ginseng brasileiro + CO₂

Pode-se verificar que a temperatura pouco influenciou no rendimento global de extração de folhas de ginseng brasileiro. Com o aumento da temperatura de extração constatou-se que o X_0

mateve-se constante e em alguns casos até diminuiu. Para pressão de 300 bar nas temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, o rendimento manteve-se constante em 1%. Na condição de 30 °C e 250 bar e 40 °C e 250 bar o X_0 variou muito pouco de 1,4 a 1,3, respectivamente. Portanto em termos de X_0 , a condição mais adequada para obtenção de extratos de folhas de ginseng brasileiro é 30 °C e 250 bar.

4.3.3 Cinética de extração

A extração de solutos a partir de matrizes vegetais com fluidos supercríticos não é uma função linear do tempo de extração. De forma geral, as curvas típicas de extração apresentam três períodos (Ferreira *et al*, 1999). Do ponto de vista industrial, a otimização do processo que emprega SFE requer o conhecimento de características termodinâmicas (solubilidade e seletividade), bem como características cinéticas (taxa de transferência de massa). Uma vez que no período de taxa de extração constante (CER) consegue-se extrair entre 50 e 90% do extrato total, a otimização do processo deveria ser focada neste período, e a modelagem poderia ser realizada considerando unicamente o fenômeno de convecção (Ferreira *et al*, 1999).

A seguir é mostrada a curva de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de extração de 250 bar, 40 °C e $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s. Na Figura 4.19 os três períodos de taxa de extração são mostrados (taxa de extração constante (CER), onde o principal mecanismo de transferência de massa é a convecção na fase fluida; taxa de extração decrescente (FER), onde a difusão na matriz vegetal e a convecção na fase fluida são importantes para a transferência de massa, e o período difusional, onde a transferência de massa é limitada pela difusão do solvente no interior das partículas).

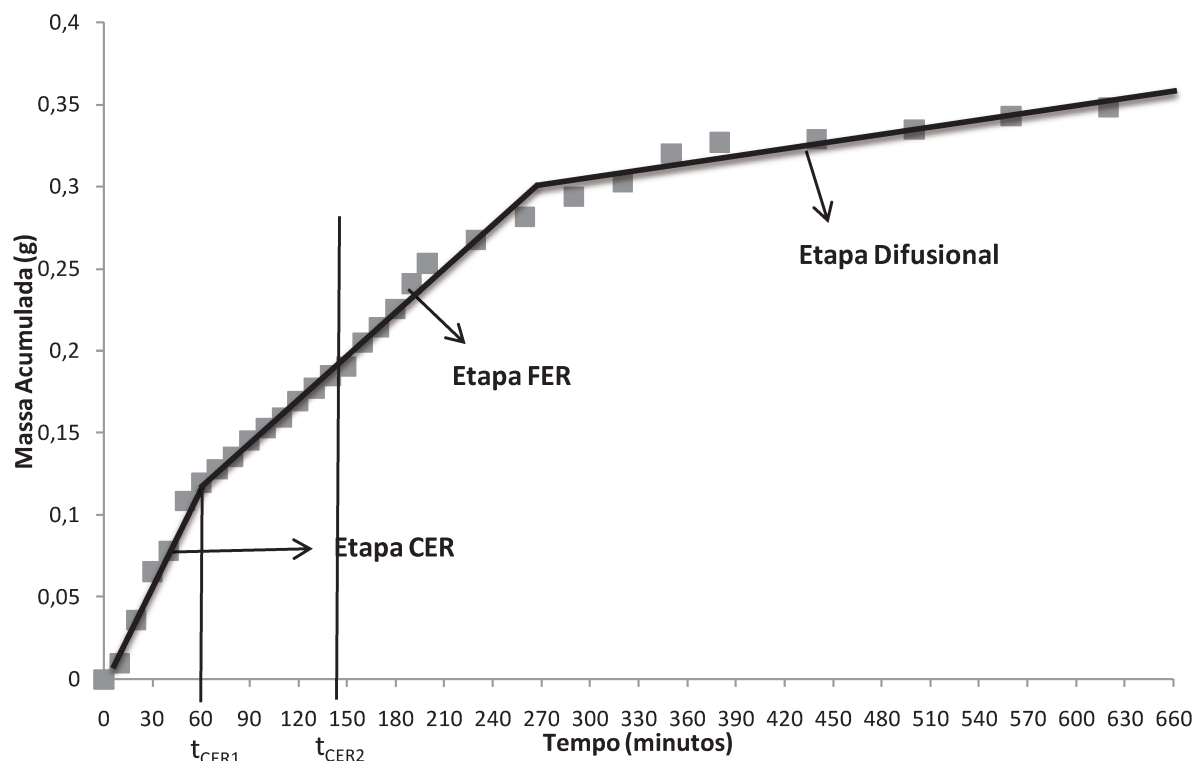


Figura 4.19: Curva de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.

Através da metodologia de Gauss-Newton para obtenção dos parâmetros de extração, através do ajuste linear e não linear de 3 retas da curva experimental de extração do ginseng brasileiro e utilizando o Software SAS Learning Edition foram determinados os seguintes parâmetros de processo: $t_{CER} = 60$ minutos; $M_{CER} = 3,43 \times 10^{-8}$ kg/s; $Y_{CER} = 0,00049$ kg_{ext}/kg CO₂; $R_{CER} = 0,4$ % $R_t = 1,13$ %. Por meio da análise dos parâmetros de extração obtidos através da curva de extração do ginseng brasileiro determinou-se que o rendimento global na etapa CER representa 34% do rendimento total, o que mostra que para otimização do processo de extração SFE do ginseng brasileiro os dois mecanismos de transferência de massa (convecção e difusão) devem ser levados em consideração. Uma vez que no período de taxa de extração constante (CER) consegue-se extrair entre 50 e 90% do extrato total, a otimização do processo deveria ser focada neste período, e a modelagem poderia ser realizada considerando unicamente o fenômeno

de convecção (Ferreira *et al*, 1999). Para o sistema ginseng brasileiro + CO₂ supercrítico a consideração de Ferreira *et al* (1999) não foi válida. Segundo a classificação de Brunner (1994), a curva de extração do ginseng brasileiro pode ser considerada do tipo II, típica da extração a partir de matrizes vegetais com baixo teor de solutos. Para otimização do processo de extração supercrítica do ginseng brasileiro adotou-se o tempo de extração de 225 minutos como tempo necessário para extrair em torno de 70% do extrato total. Esta escolha foi feita por meio da análise visual da curva de extração do ginseng brasileiro (começo da etapa difusional de extração).

Uma curva de extração do ginseng brasileiro com 10% de etanol como co-solvente foi feita com a finalidade de avaliar o comportamento da curva com o tempo de extração e de obter extratos para comparar o perfil químico dos extratos obtidos com CO₂ e com CO₂ + 10% de etanol. A Figura 4.20 apresenta a curva de extração do ginseng brasileiro obtida a 40 °C, 250 bar e 10% de etanol.

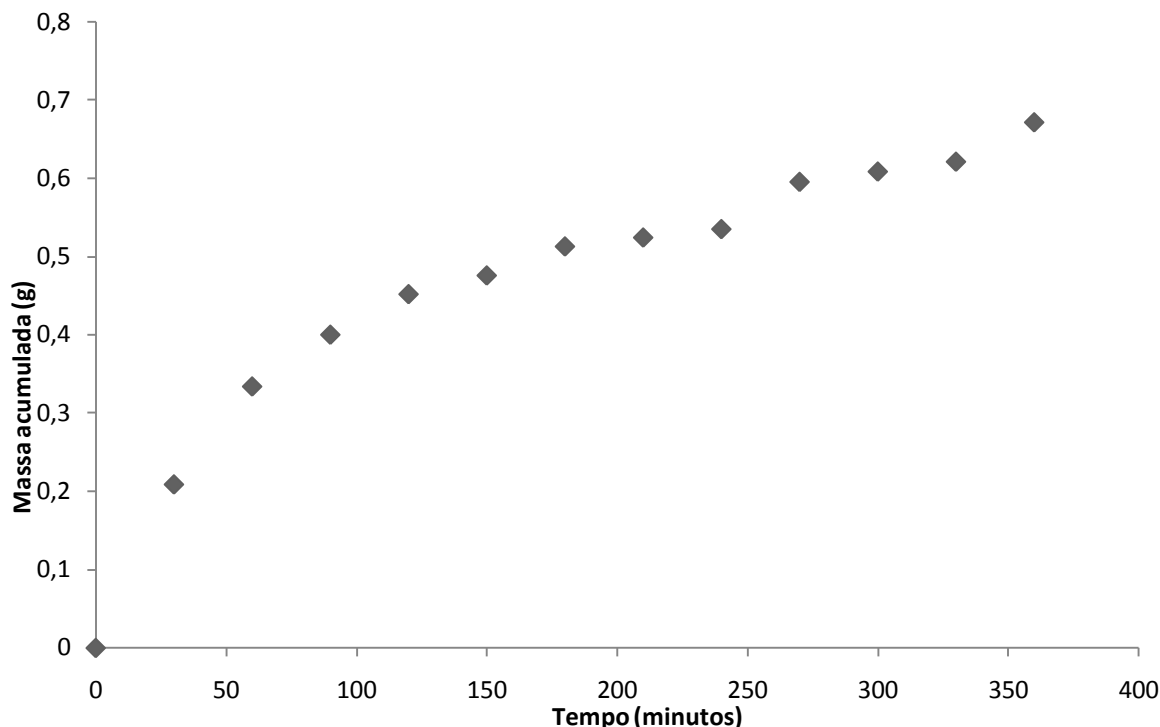


Figura 4.20: Curva de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, 10% de etanol, $2,7 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.

4.3.4 Análises Químicas

4.3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O perfil de composição dos extratos foi analisado por meio de cromatografia em camada delgada. As fases móveis foram escolhidas de modo a possibilitar uma boa separação dos compostos e o revelador foi escolhido conforme os compostos de interesse. Nesta etapa do trabalho o objetivo foi avaliar a presença de óleos voláteis (Figura 4.21(a)) e de saponinas (Figura 4.21 (b)) nos diferentes extratos de folhas de ginseng brasileiro. As Figuras 4.21(a) e 4.21(b) mostram as diferentes bandas referentes aos extratos estudados, sendo possível notar que três bandas aparecem em todos os extratos. No âmbito geral o perfil das bandas na placa cromatográfica é muito semelhante para todos os extratos. A fase móvel utilizada foi hexano e

acetato de etila, e o revelador anisaldeído para detecção de óleos voláteis. O extrato obtido através da técnica de extração supercrítica + co-solvente foi o que apresentou maior número de bandas com boa definição. Para detecção de saponinas, a fase móvel utilizada foi hexano e acetato de etila, e o revelador cloridrato de antimônio 20%. Analisando a Figura 4.21(b) podemos verificar que somente os extratos etanólico, metanólico e extrato supercrítico + co-solvente apresentaram bandas que indicam a presença de saponinas, os extratos supercríticos não apresentaram estas bandas.

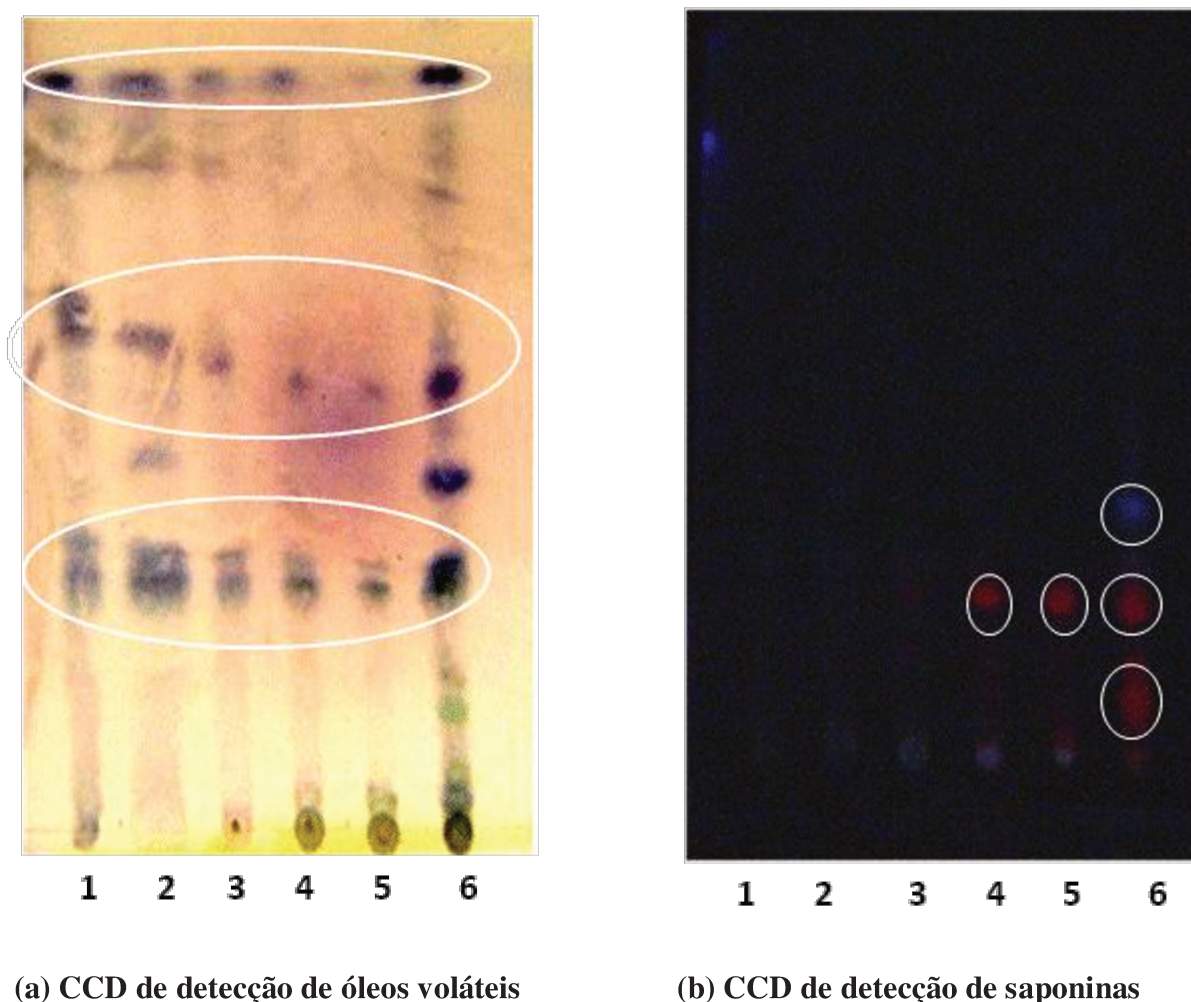


Figura 4.21: Placas cromatográficas em camada delgada (CCD) de detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercrítico (1) 30 °C/300 bar; (2) 40 °C/100 bar), extrato hexânico (3), extrato etanólico (4), extrato metanólico (5) e SFE + co-solvente (6) de ginseng brasileiro.

Com a fase móvel hexano e acetato de etila não foi detectada a presença de saponinas nos extratos SFE. Como a bibliografia cita que as raízes de ginseng brasileiro apresentam uma variedade de compostos desta classe química, e para verificar se realmente pode-se afirmar que não foram extraídas saponinas pela SFE de folhas de ginseng brasileiro, fez-se novamente a análise de determinação de saponinas no extrato SFE de folhas de ginseng brasileiro, agora utilizando outra fase móvel (clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água) e revelador anisaldeído, de acordo com Wagner (1985). A Figura 4.22 mostra a placa com o resultado. Nestas condições de análise, onde detectou-se a presença de saponinas no extrato SFE de ginseng brasileiro.

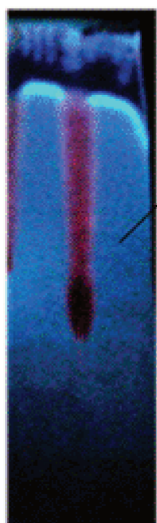


Figura 4.22: Placa cromatográfica em camada delgada (CCD) de detecção de saponinas presentes no extrato supercrítico (SFE) de ginseng brasileiro.

A fim de verificar a possível separação das bandas (compostos) referentes às saponinas fez-se a co-eluição do extrato SFE + co-solvente, com a fase móvel e o revelador respectivos, hexano:acetato de etila e cloridrato de antimônio 20%. A Figura 4.23 mostra como foi feito o fracionamento das bandas e as novas bandas referentes às frações 1, 2, 3, 4 e 5.

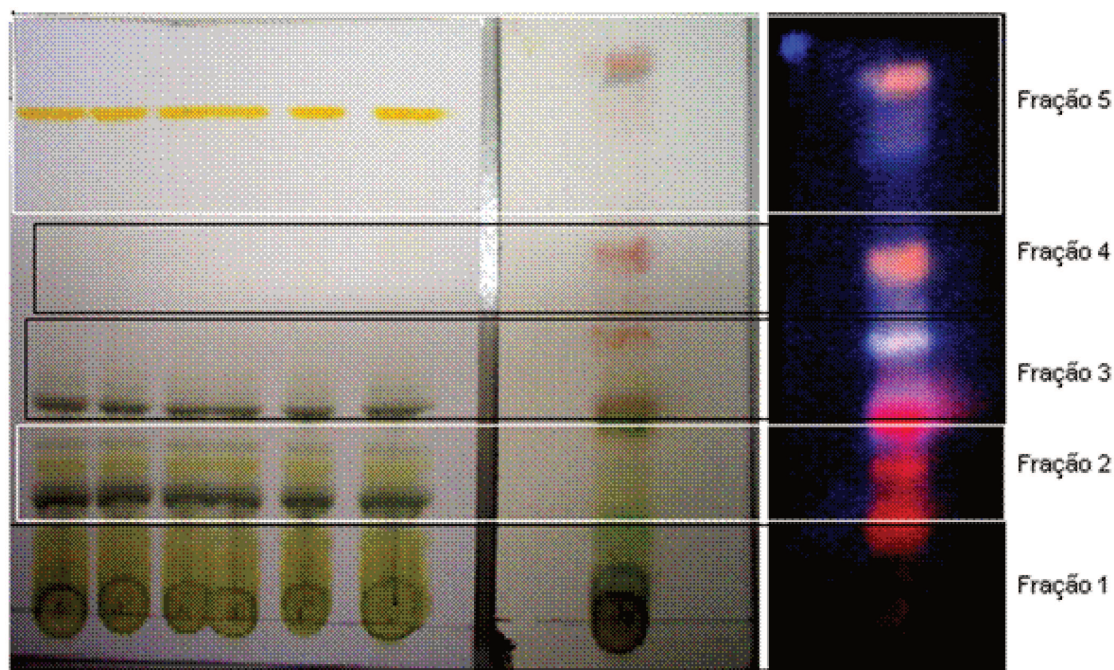


Figura 4.23(a): CCD para o fracionamento do extrato SFE + co-solvente de ginseng brasileiro.

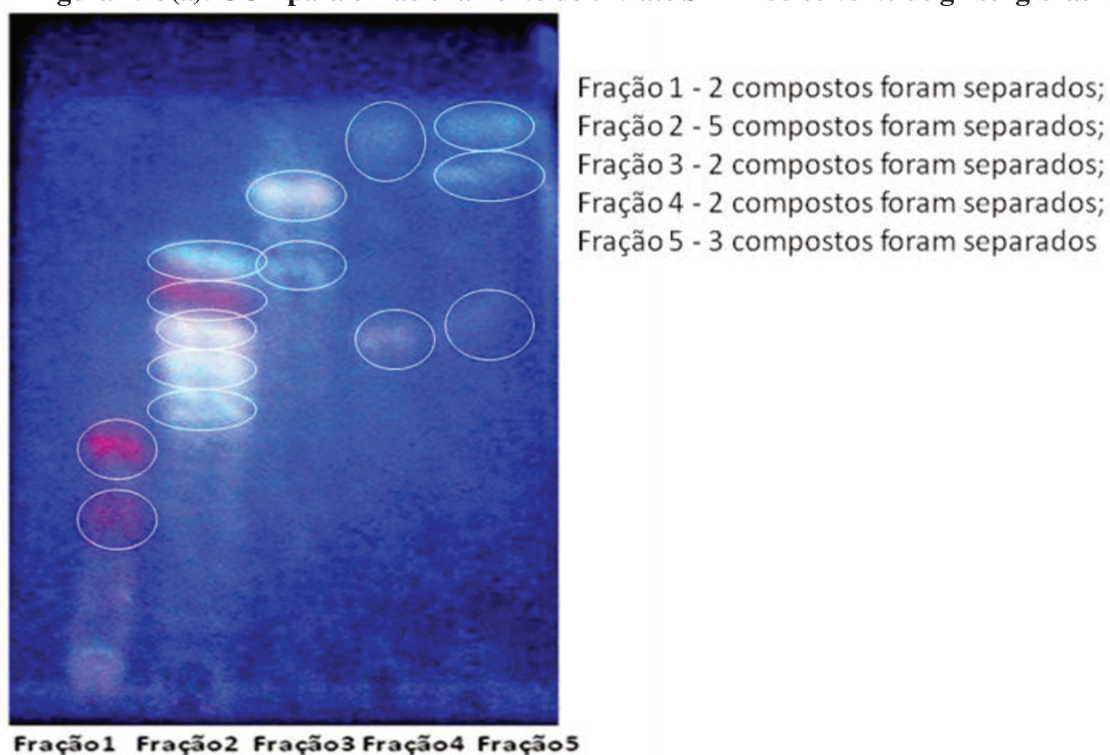


Figura 4.23(b): CCD do extrato SFE + co-solvente de ginseng brasileiro.

Através da análise da Figura 4.23(b) pode-se constatar a possibilidade de separar saponinas pelo método de cromatografia em camada delgada.

A Figura 4.24 mostra a placa cromatográfica comparativa para os padrões β -sitosterol, estigmasterol e extrato SFE (40 °C/150 bar). É possível visualizar uma banda no extrato SFE na mesma altura que as bandas referentes aos padrões β -sitosterol e estigmasterol, mostrando que possivelmente estes compostos estejam presentes no extrato analisado. Porém, não é possível afirmar qual dos padrões corresponde à banda em questão visto que estas apresentam Rfs muito próximos.



Figura 4.24: CCD para de detecção de óleos voláteis presentes no extrato (1) SFE (40 °C/150 bar) de ginseng brasileiro e comparação com os padrões comerciais (2) β -sitosterol e (3) estigmasterol em termos de coloração das bandas e Rfs.

Foi feita a comparação entre o perfil de composição das folhas e das raízes de ginseng brasileiro (Leal *et al*, 2005) quanto à presença de óleos voláteis e flavonóides. A Figura 4.25 mostra a análise do perfil de composição referente à presença de óleos voláteis. Pode-se observar que os extratos, tanto das folhas quanto das raízes apresentam número de bandas semelhantes. E em alguns casos apresentam Rfs também próximos, sugerindo uma composição química semelhante destes extratos. Os extratos metanólicos e etanólicos das folhas de ginseng brasileiro apresentaram maior quantidade de bandas que os mesmos extratos obtidos das raízes da planta nas mesmas condições de extração, o que sugere uma maior diversidade de compostos possíveis de serem extraídos das folhas com a utilização de solventes polares.

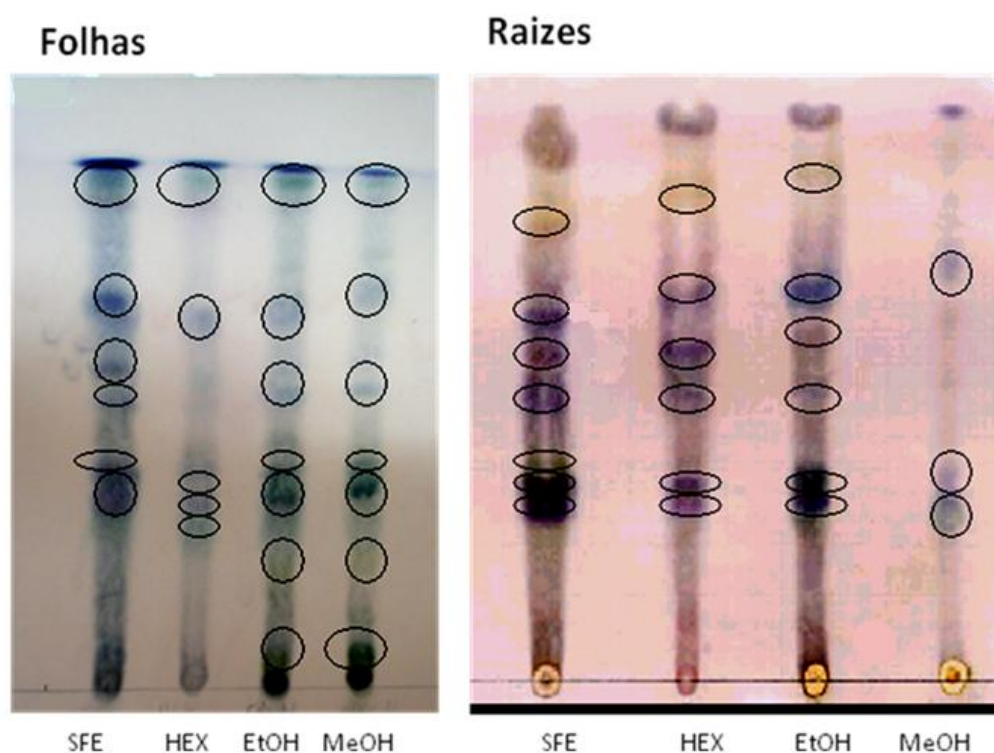


Figura 4.25: CCD para detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercrítico (40 °C/150 bar), extrato hexânico, etanólico, metanólico de folhas e de raízes de *ginseng brasileiro*.

A Figura 4.26 mostra o perfil de composição dos extratos SFE obtidos em diferentes condições de extração e dos respectivos compostos voláteis recuperados através da utilização de colunas de adsorção dos voláteis nas extrações realizadas.

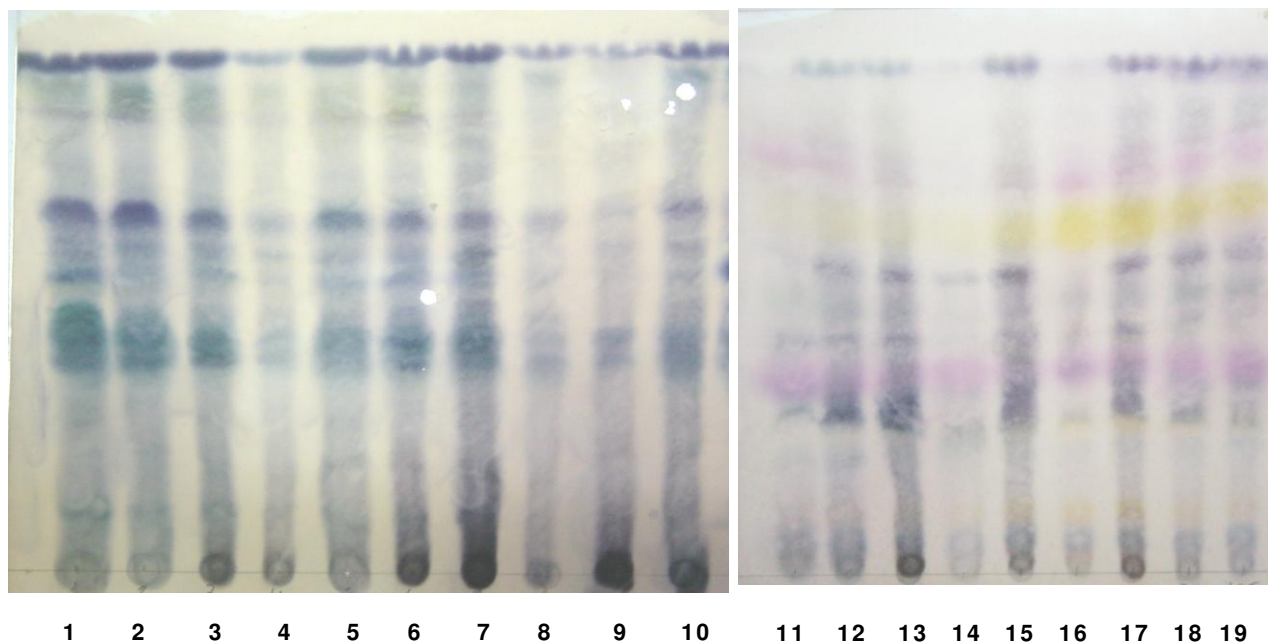


Figura 4.26: CCD para detecção de óleos voláteis presentes nos extratos supercríticos de folhas de ginseng brasileiro nas seguintes condições de operação: 1 e 11 (30°C/100 bar), 2 e 12 (30 °C/150 bar), 3 e 13 (30 °C/200 bar), 4 e 14(30 °C/250 bar), 5 e 15(30 °C/300 bar), 6 e 16(40 °C/100 bar), 7 e 17(40 °C/150 bar), 8 e 18(40 °C/200 bar), 9 e 19(40 °C/250 bar), 10(40 °C/300 bar), os extratos referentes à codificação de 11 a 19 são respectivamente a fração de voláteis retidos na coluna de adsorção.

Com o perfil de composição apresentado pode-se constatar que as diferentes condições de processo interferem pouco na composição dos extratos em termos de óleos voláteis.

De maneira geral, tanto os extratos de folhas como das raízes de ginseng brasileiro apresentam flavonóides em sua composição. Porém, as bandas referentes à presença desta classe de compostos diferem quanto à coloração e R_fs, sugerindo diferença na composição química destes extratos, conforme Figura 4.27(a), 4.27(b), 4.27(c) e 4.27(d).

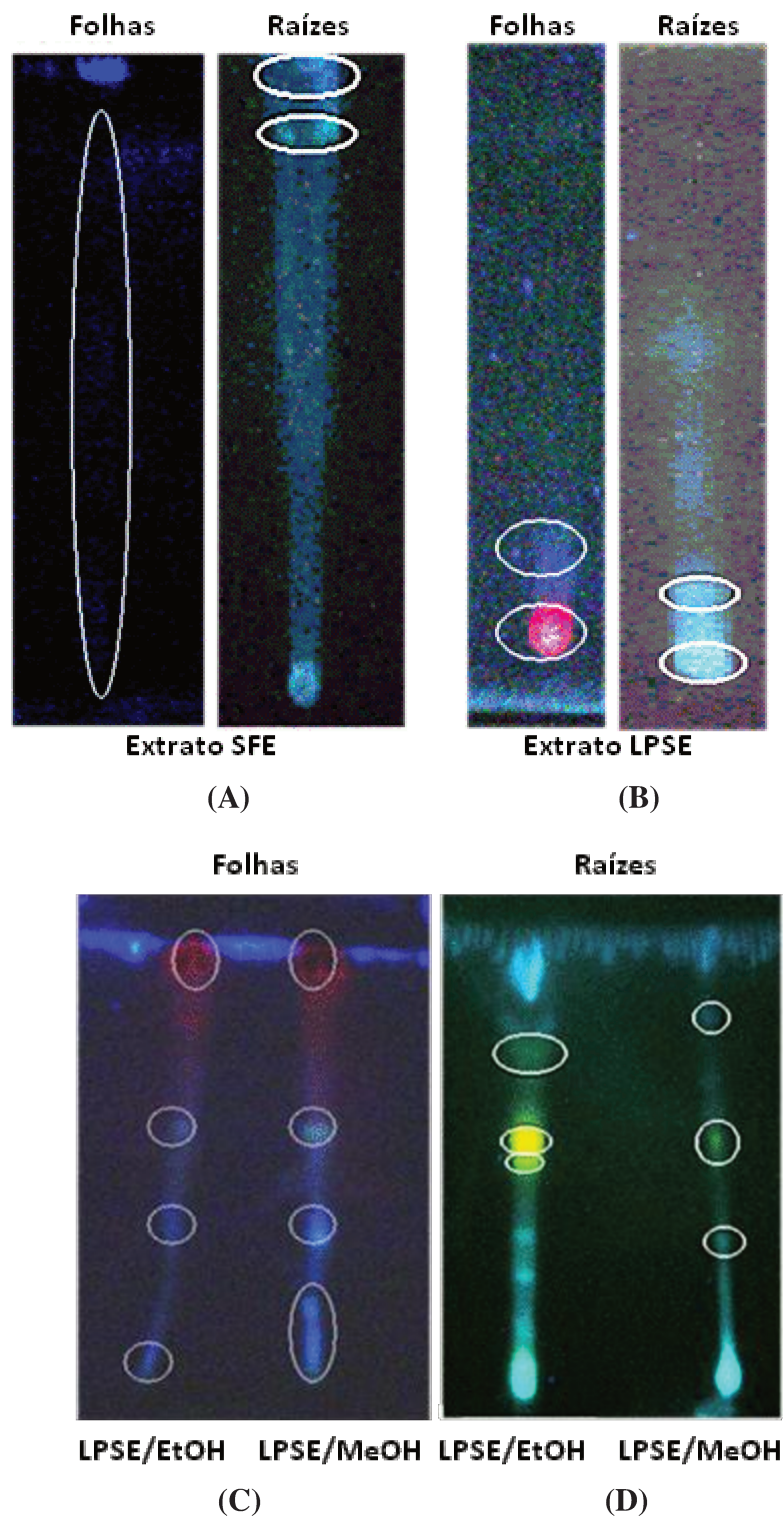


Figura 4.27: CCD para detecção de flavonóides presentes nos extratos supercrítico (40 °C/150 bar), extrato etanólico e metanólico de folhas e de raízes de ginseng brasileiro.

4.3.4.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As Figuras 4.28 e 4.29 e a Tabela 4.8 apresentam os resultados referentes à composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro obtidos em diferentes condições de operação nas temperaturas de 30 °C e 40 °C, com a pressão variando de 100 a 300 bar. As condições de análise foram descritas no item 3.5.2.

Os extratos SFE são compostos por substâncias de massa molecular elevada. A fração volátil foi recuperada em coluna de adsorção e a composição desta fração é apresentada na Tabela 4.9. Os compostos majoritários da fração pesada (fração SFE) foram: ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (0,5 – 27,1%), β -sitosterol e/ou estigmasterol (1,1 – 20,1%), fitol (6,0 – 30,8%) e hexatriacontane (0,7 – 30,6%). Os compostos referentes aos índices de retenção de 2028 e 2035 também foram majoritários (6,2 – 31,2%) e (1,4 – 29,1%), respectivamente, porém não foi possível a identificação exata destes.

Os compostos majoritários da fração retida na coluna de adsorção foram o para-dietilbenzeno (25,7 - 59,3%) e o meta-dietilbenzeno (3,4 - 27,1%). Como não existem informações na literatura sobre a composição de extratos SFE ou convencionais de folhas de ginseng brasileiro, não há informações para comparar com os resultados encontrados. Por outro lado, ao se relacionar a composição dos extratos obtidos das folhas de ginseng brasileiro com os extratos obtidos das raízes pode-se constatar que os extratos das folhas apresentam grupos de compostos como saponinas, triterpenos, ácidos e esteróis, que são citados na literatura como constituintes presentes nos extratos de raízes do ginseng brasileiro (Mazzanti *et al* 1993). Por meio das duas análises químicas realizadas com os extratos de ginseng brasileiro pode-se conferir que as técnicas de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa forneceram um perfil de composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro onde foi detectada a presença desde

compostos de baixa massa molecular até compostos com estruturas complexas de alta massa molecular (saponinas, ácidos, triterpenos, pigmentos, esteróis).

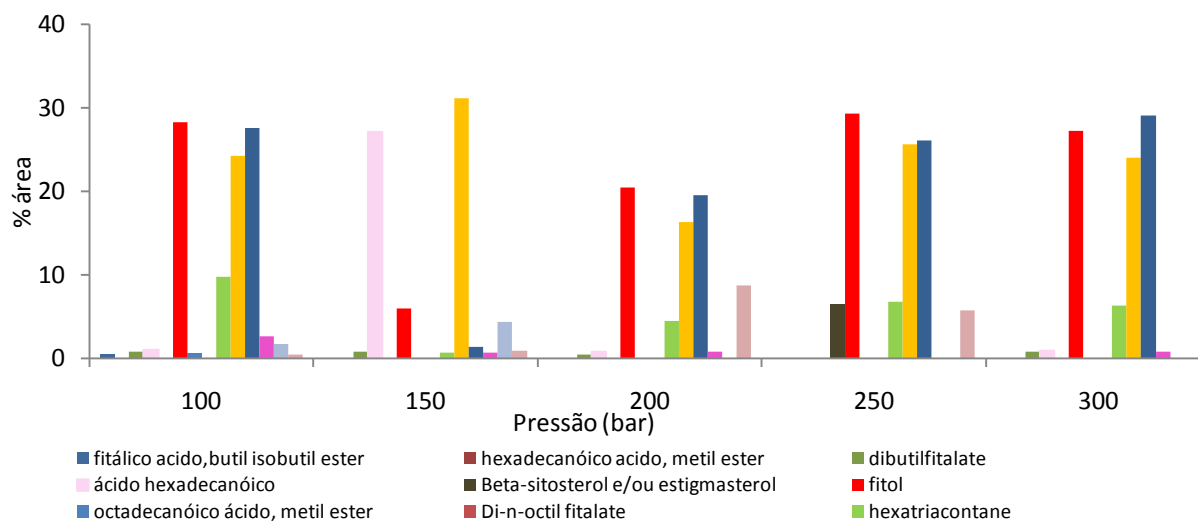


Figura 4.28: Composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro (em % área) obtidos na temperatura de 30 °C e nas pressões de 1-(100 bar); 2-(150 bar); 3-(200 bar); 3-(250 bar) e 4-(300 bar).

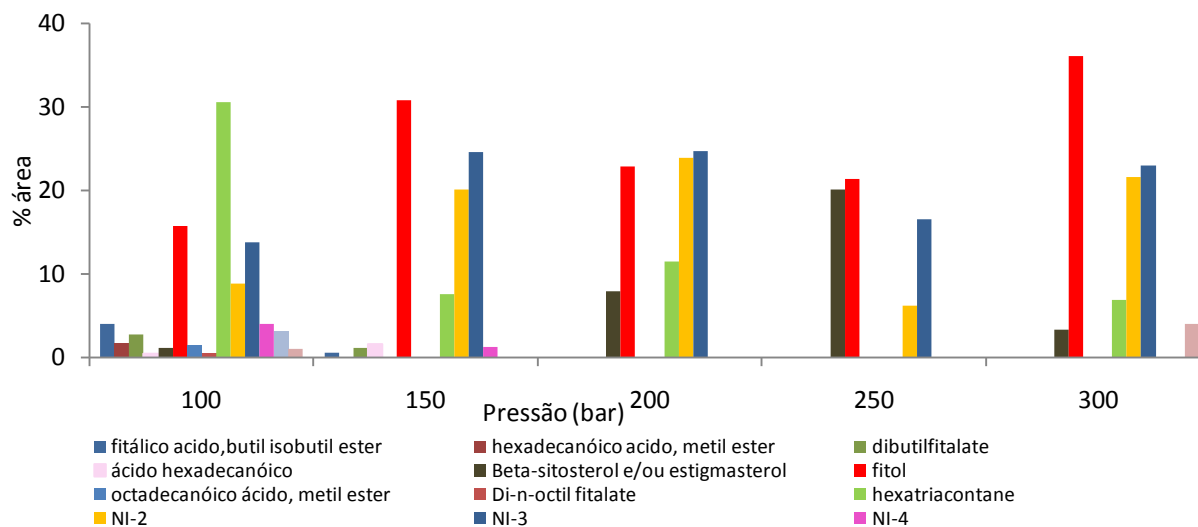


Figura 4.29: Composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro (em % área) obtidos na temperatura de 40 °C e nas pressões de 1-(100 bar); 2-(150 bar); 3-(200 bar); 3-(250 bar) e 4-(300 bar).

Tabela 4.8: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro em diferentes condições de extração (°C/bar).

Composto	IR ^a	30					40				
		100	150	200	250	300	100	150	200	250	300
fitálico ácido, butil isobutil ester	1460	0,5	-	-	-	-	4,0	0,6	-	-	-
hexadecanóico ácido, metil ester	1619	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-
dibutilfitalate	1658	0,8	0,8	0,5	-	0,8	2,8	1,1	-	-	-
ácido hexadecanóico	1666	1,0	27,1	0,8	-	0,9	0,5	1,6	-	-	-
β-sitosterol e/ou estigmasterol	1768	-	-	-	6,5	-	1,1	-	7,9	20,1	3,3
β-sitosterol e/ou estigmasterol	1772	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fitol	1859	28,3	6,0	20,5	29,3	27,2	15,8	30,8	22,9	21,4	36,1
octadecanóico ácido, metil ester	1892	0,7	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-
di-n-octil fitalate	1978	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
hexatriacontane	2009	9,8	0,7	4,5	6,8	6,3	30,6	7,6	11,5	x	6,9
n.i	2028	24,2	31,2	16,3	25,6	24,0	8,9	20,1	23,9	6,2	21,6
n.i	2035	27,6	1,4	19,5	26,1	29,1	13,8	24,6	24,7	16,6	23,0
n.i	2060	2,7	0,7	0,8	-	0,8	4,0	1,3	-	-	-
n.i	2067	1,7	4,4	-	-	-	3,2	-	-	-	-
n.i	2397	0,5	0,9	8,7	5,7	-	1,0	-	-	-	4,0
Total	-	41,1	34,6	26,3	42,6	35,2	58,4	41,8	42,3	41,4	46,4
n.i^b	-	58,9	65,4	73,7	57,4	64,8	41,6	58,2	57,7	58,6	53,6

^a Índice de retenção calculado.

^b Porcentagem de compostos não identificados.

Tabela 4.9: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro retido na coluna de adsorção em diferentes condições de extração (°C/bar).

Composto	IR ^a	30				40			
		150	200	250	300	100	150	200	300
ácido hexanóico	870	0,4	0,7	-	0,3	0,4	0,5	0,5	0,2
isobutilbenzeno	907	-	0,7	1,0	-	-	-	-	-
sec-butylbenzeno	909	0,7	-	-	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7
2-hexanóico ácido	912	1,3	4,1	0,6	1,2	1,3	1,1	1,4	-
1,4-dietilbenzeno (para-dietilbenzene)	954	57,4	24,4	27,9	25,7	26,4	56,3	55,5	59,3
1,3-dietilbenzeno (meta-dietilbenzene)	959	26,3	3,4	4,0	3,6	3,7	25,9	25,5	27,1
p-etoxystirene	986	3,7	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4
canfora	1046	0,4	0,4	-	0,3	0,3	-	0,2	-
benzociclohexano	1056	0,3	0,4	-	0,2	0,2	0,3	0,2	-
etilbenzaldeído	1062	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
1,3,5- trimetil-2-propil-benzene	1083	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4
cumin álcool	1144	1,0	1,4	0,8	1,2	1,0	1,2	0,8	0,7
timol	1153	0,6	0,8	0,4	0,7	0,6	0,6	0,5	0,4
m-etilacetofenone	1162	2,1	2,8	1,6	2,4	2,2	2,3	1,6	1,6
acetofenone	1181	1,2	1,6	0,9	1,4	1,3	1,3	0,9	1,0
curcumeno	1256	0,8	0,9	0,4	0,6	0,6	0,6	0,9	0,6
beta- sesquifelandreno	1322	-	-	-	-	-	-	0,1	-
epóxido de cariofileno	1383	0,3	0,3	0,3	-	-	-	0,4	0,3
5-7-dimetiloctahidrocoumarin	1395	-	-	-	-	-	-	0,8	0,5
fitálico ácido, isobutil octil ester	1460	-	-	-	-	-	-	0,4	0,3
exadecanóico acido, metil ester	1619	-	-	-	-	-	-	0,6	0,3
fitol	1859	0,3	0,9	-	0,9	-	0,6	0,2	-
hexatriacontane	2009	-	0,4	-	0,3	-	-	-	-
n.i	2028	0,2	1,1	-	1,0	-	0,4	0,1	-
n.i	2035	0,3	1,1	-	1,0	-	0,4	0,2	-
Total	-	97,8	44,7	39,2	40,8	40,3	92,8	92,5	93,7
n.i^b	-	2,2	55,3	60,8	59,2	59,7	7,2	7,5	6,3

^a Índice de retenção calculado; ^b Porcentagem de compostos não identificados.

Com a finalidade de avaliar a influência do tempo de extração na composição do extrato SFE de ginseng brasileiro, foi feita a análise dos extratos coletados em diferentes estágios da curva de extração conforme mostra a Tabela 4.10. Os extratos foram obtidos na condição de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas de matéria-prima.

Analisando os resultados, percebe-se um comportamento global semelhante no perfil de composição dos extratos obtidos nas diferentes frações coletadas ao longo da extração. As Figuras 4.30(a) e 4.30(b) apresentamos compostos identificados e os compostos majoritários presentes no extrato de ginseng brasileiro em função do tempo de extração. Não houve variação no perfil de composição dos extratos nos diferentes tempos de extração, ocorrendo apenas à diminuição da quantidade e o esgotamento de alguns compostos com o passar do tempo. Os compostos majoritários fitol e hexatriacontane após 150 minutos de extração apresentaram % em área relativamente constante até 620 minutos de extração.

Tabela 4.10: Composição do extrato SFE (% em área) do ginseng brasileiro coletados em diferentes tempos da curva de extração.

Composto	IR ^a	Tempo (minutos)														
		20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	260	320	380	500	620
n.i	700	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i	710	0,15	0,09	0,10	0,38	0,24	0,70	0,72	0,82	0,87	1,03	0,30	0,34	0,34	0,80	0,57
n.i	762	0,23	0,17	0,15	0,77	0,44	1,39	1,38	1,64	1,72	1,66	0,58	0,66	0,96	1,30	1,10
n.i	871	0,24	0,21	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-hexanóico ácido	912	2,33	2,44	1,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etilbenzaldeído	106	0,50	0,94	1,77	0,69	0,73	0,79	0,89	-	-	-	0,61	-	-	-	-
Cumin álcool	114	0,23	0,58	1,13	0,67	0,70	0,90	0,88	-	-	-	0,47	-	-	-	-
curcumene	125	0,10	0,10	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i	152	0,48	0,30	0,34	1,16	0,71	2,12	2,14	2,44	2,47	3,21	0,87	0,97	1,06	0,64	1,61
n.i	166	1,72	2,05	3,03	-	2,37	3,64	3,80	3,14	2,66	2,43	1,74	0,73	0,56	0,80	0,91
β-sitosterol e/ou	176	0,42	0,21	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-sitosterol e/ou	177	0,08	0,06	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fitol	185	27,7	21,5	24,4	14,3	15,5	25,5	27,0	27,3	26,6	26,4	26,8	25,9	24,1	26,1	29,3
hexatriacontane	200	6,83	5,53	6,39	4,78	6,16	11,1	13,6	14,1	14,5	15,3	15,6	16,1	15,0	16,0	16,9
n.i	202	0,86	-	-	0,60	1,51	0,93	0,97	1,10	0,91	1,00	1,00	1,05	1,17	-	1,14
n.i	202	-	-	-	8,43	9,81	14,2	15,9	16,1	15,7	15,3	15,7	15,6	14,5	14,8	17,6
n.i	203	16,7	15,4	15,8	13,5	18,8	22,3	25,2	26,1	25,6	24,7	29,2	29,2	27,5	23,7	26,8
n.i	204	26,7	22,5	24,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i	205	1,82	3,64	1,83	0,68	3,27	1,14	1,30	1,29	1,47	1,37	1,90	1,91	1,72	1,17	1,06
n.i	206	0,66	-	1,14	-	3,15	-	-	-	-	-	0,68	0,60	0,62	-	-
n.i	211	0,63	-	-	-	11,9	2,60	0,61	1,45	2,29	1,37	0,63	1,03	0,00	2,30	0,63
n.i	211	1,15	6,37	1,53	20,5	-	3,65	1,49	2,05	2,52	1,83	-	2,27	8,64	7,87	0,86
n.i	228	0,17	1,75	2,01	8,96	3,01	-	0,66	-	-	-	0,29	0,82	0,86	-	-
n.i	238	-	0,56	0,14	2,23	2,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i	239	0,71	3,57	0,93	13,8	7,39	2,64	-	-	-	-	-	0,34	1,09	-	-
Total identificados	-	38,2	31,4	35,4	20,5	23,2	38,4	42,5	41,5	41,2	41,8	43,6	42,1	39,2	42,3	46,3

^a Índice de retenção calculado; ^{n.i} Composto não identificado;

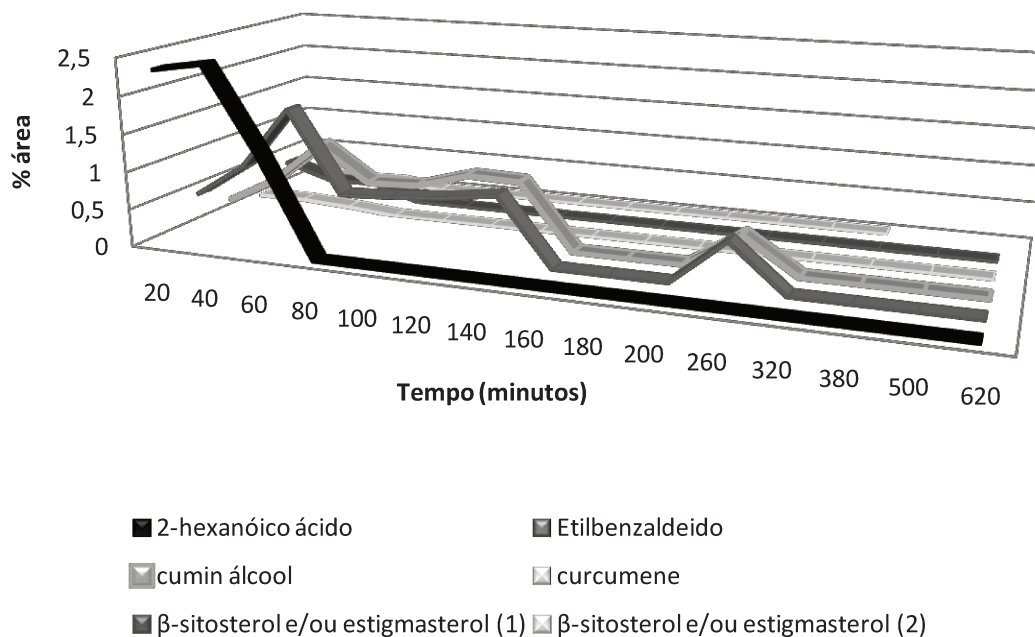


Figura 4.30(a): Compostos identificados no extrato de ginseng brasileiro em função do tempo de extração.

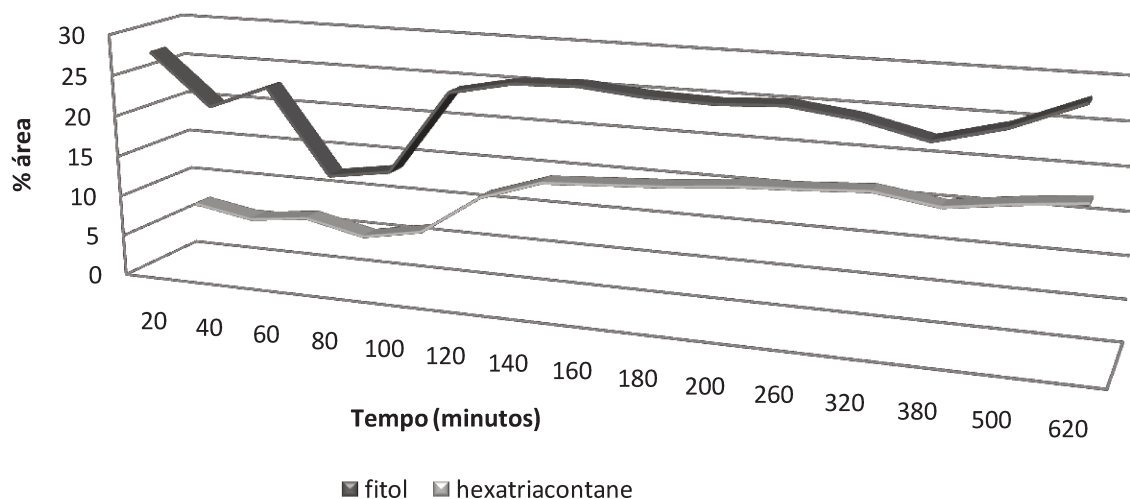
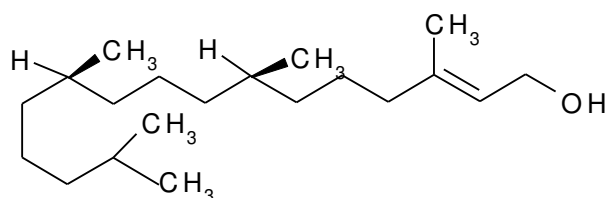


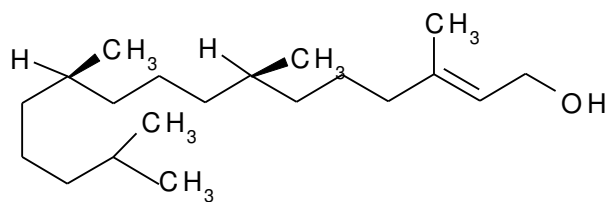
Figura 4.30(b): Compostos majoritário identificados no extrato de ginseng brasileiro em função do tempo de extração.

A Figura 4.30(b) apresenta a porcentagem em área de fitol em função do tempo, presente no extrato de ginseng brasileiro. O fitol é um composto que integrante da clorofila e corresponde quimicamente a um álcool alifático ramificado de cadeia longa ($C_{20}H_{40}O$), ligado à molécula por

uma ligação éster conforme mostra a Figura 4.31(a). De acordo com Lanfer-Marquez (2003), o fitol pode ser librado da molécula de clorofila por ação enzimática ou através de processamento dos vegetais, o fitol na forma livre quando ingerido pode ser convertido em ácido fitânico, um ácido graxo ainda pouco conhecido, mas de importantes efeitos biológicos Figura 4.31(b).



Fitol (a)



Ácido fitânico (b)

Figura 4.31: Estrutura química do fitol (a) e do ácido fitânico (b).

De acordo com Schluter et al, 2002 e Lemotte et al, 1996, o fitol pode ser responsável por efeitos biológicos importantes, tais como atividade termogênica em mamíferos e atividade inibidora sobre efeitos teratogênicos do retinol, recentemente descobertos

4.3.4 Avaliação das Atividades Biológicas dos extratos de ginseng brasileiro

4.3.4.1 Atividade antiinflamatória dos extratos de ginseng brasileiro

A atividade antiinflamatória do extrato SFE de ginseng brasileiro foi avaliada comparativamente com a atividade do NDGA. Nenhum efeito inibitório significativo sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L) foi observado.

4.3.4.2 Atividade antioxidante dos extratos de ginseng brasileiro

Determinou-se a atividade antioxidante do extrato SFE de ginseng brasileiro pelo método DPPH e comparou-se aos resultados obtidos para os compostos de referência (BHT e Rutina), conforme a Tabela 4.11. A habilidade de doar hidrogênio do extrato de ginseng brasileiro foi inferior a Sc_{50} para as concentrações testadas, portanto, a fim de quantificar esta atividade determinou-se a capacidade anti-radical livre destes extratos em $Sc_{25} = 100$ mg/L. Para os compostos de referência procedeu-se da mesma forma para possibilitar a comparação dos resultados., comparando a habilidade dos compostos de referência (Sc_{25} (Rutina) = 4 mg/L e o Sc_{25} (BHT) = 0,6 mg/L) de doar hidrogênio (capacidade anti-radical livre) com a habilidade do extrato de ginseng brasileiro podemos dizer que o extrato é 25 vezes menos eficaz que o antioxidante natural rutina e 166 vezes menos eficaz que o antioxidante sintético BHT.

Tabela 4.11: Atividade antioxidante do extrato SFE de ginseng brasileiro e dos compostos de referência (Rutina e BHT).

Método DPPH	
SC ₂₅ (Rutina) (mg/L)	4 ± 0,3
SC ₂₅ (BHT) (mg/L)	0,6 ± 0,3
SC ₂₅ (SFE) ^a (mg/L)	100 ± 0,1

^a SFE: extrato supercrítico da planta (40 °C e 200 bar)

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o ranço oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução.

A Figura 4.32 apresenta os resultados da reação acoplada β-caroteno/ácido linolênico em função da absorbância e do tempo de reação.

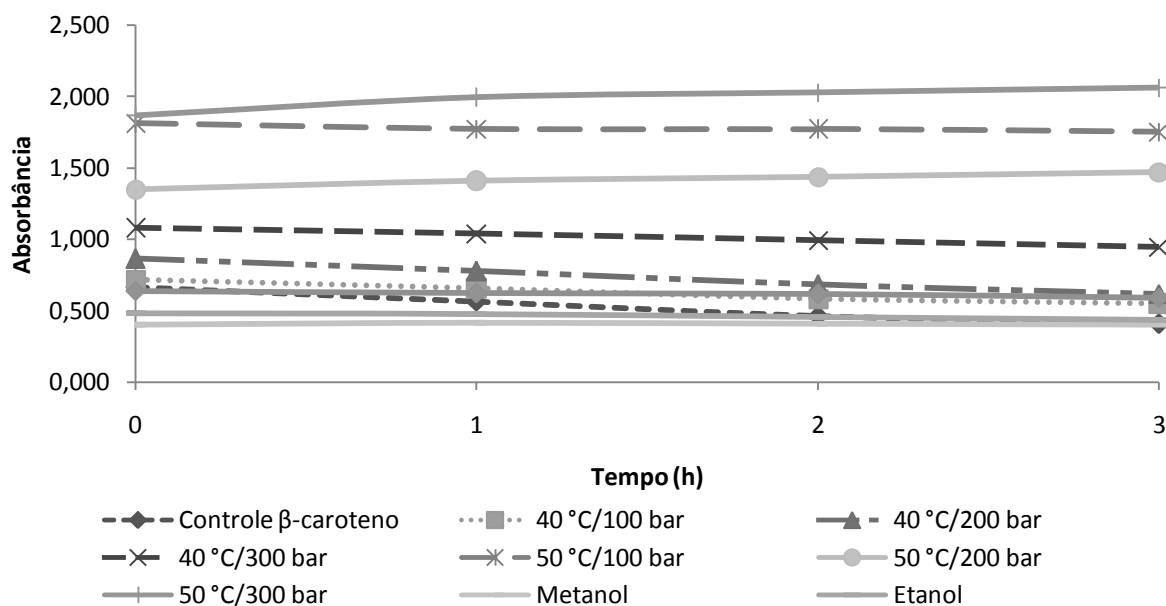


Figura 4.32: Reação acoplada β-caroteno /ácido linolênico (absorbância *versus* tempo de reação) dos extratos de ginseng brasileiro.

Analisando os resultados da atividade antioxidante obtida com o método da reação acoplada do β -caroteno/ácido linolênico (Figura 4.33) pode-se verificar que todos os extratos apresentaram uma atividade antioxidante positiva comparada à do β -caroteno. Os extratos LPSE apresentaram uma AA variando de 43 a 117%, este resultado indica que o uso de solventes polares para obtenção de extratos de ginseng brasileiro promove a extração de compostos polares com atividade antioxidante. Os extratos SFE obtidos a 40 °C e 100 bar e 40 °C e 200 bar apresentaram fraca AA variando de -2 a 39%. Os extratos obtidos a 40 °C e (150 e 300 bar) e 50 °C e 100 bar foram os extratos SFE que apresentaram inibição ao processo de oxidação variando de 59 a 79%. Pode-se verificar que com o passar do tempo, os extrato obtidos a 40 °C e 150 bar, 40 °C e 300 bar e 50 °C e 200 bar diminuem suavemente sua capacidade de atuar com antioxidante da reação. Analisando a densidade do CO₂ nestas condições que são 780 kg/m³, 909 kg/m³, 384 kg/m³ e 784 kg/m³, respectivamente verificou-se novamente que as diferenças nas condições operacionais geram diferenças de composição dos extratos, mostrando a seletividade do processo SFE. Os extratos que apresentaram maiores AA por este método foram obtidos a 50 °C nas pressões de 200 e 300 bar. Valores de AA maiores que 100% foram obtidos para estes extratos, o que indica reações de formação de complexos que impedem a degradação, portanto o descoloramento da solução. O extrato obtido a 50 °C e 200 bar apresenta uma AA constante com o tempo, o que pode ser observado na Figura 4.32, com a absorbância medida nos intervalos de uma hora, duas horas três horas de reação manteve-se constante. Como não se conhece o mecanismo que esta ocorrendo durante esta reação, devido a natureza complexa da composição dos extratos vegetais, não é possível afirmar nada do ponto de vista químico, fica somente a observação de que pelo método da reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico, os diferentes extratos de ginseng brasileira apresentam potencial como antioxidante.

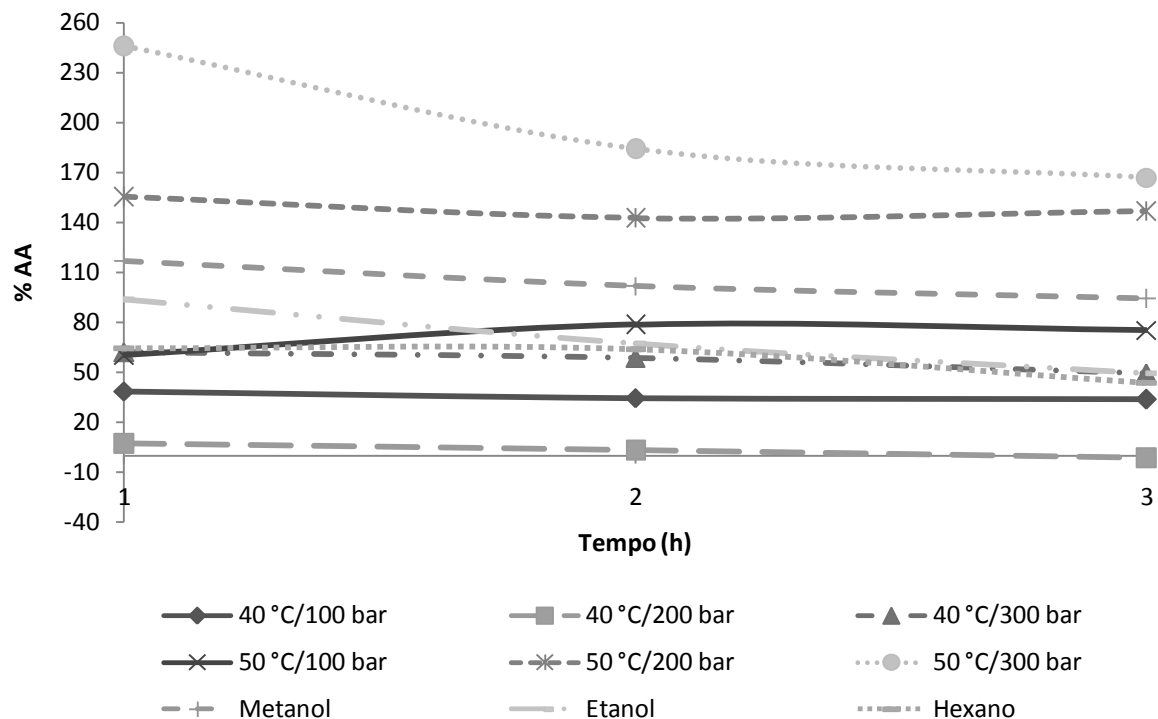


Figura 4.33: Comparação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de ginseng brasileiro analisados pela reação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico.

Um fator que pode interferir na AA dos extratos é a presença de compostos de alta massa molecular de difícil identificação. A quebra da cadeia reacional da oxidação lipídica pelos antioxidantes não ocorre segundo um mecanismo simples, e certos aspectos, relativos às interações entre os constituintes de meios complexos, não estão completamente esclarecidos. O emprego de antioxidantes em formulações é muitas vezes empírico, de tal modo que a garantia de sua eficácia nem sempre existe. Podemos observar que os extratos obtidos com solventes orgânicos apresentaram uma redução no grau de atividade antioxidante com o passar do tempo. Os extratos supercríticos apresentaram um perfil de estabilidade em relação à atividade antioxidante que é um atributo de qualidade dos antioxidantes naturais.

Capítulo 5 – Conclusões

5.1 Lavanda brasileira

- ✓ O rendimento global de extração (X_0) de lavanda brasileira obtido por SFE variou de $2,0 \pm 0,1\%$ a $4,0 \pm 0,2\%$ (b.u), de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), sendo que a condição de extração que favoreceu o maior rendimento foi de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 300 bar;
- ✓ O rendimento do óleo volátil de lavanda brasileira obtido por hidrodestilação foi de $1,2 \pm 0,1\%$;
- ✓ Os rendimentos dos extratos obtidos por extração a baixa pressão foram: $9,4 \pm 0,1\%$ (metanol), $3,3 \pm 0,2\%$ (etanol) e $0,8 \pm 0,2\%$ (hexano);
- ✓ Para o sistema lavanda brasileira + CO_2 foi possível determinar duas pressões de inversão do rendimento a 125 bar e 250 bar, aproximadamente;
- ✓ Os monoterpenos majoritários presentes no óleo volátil de lavanda brasileira foram pinocanfona (13,5 - 16,3%), β -pineno (10,5 - 12%) e pinocarvil acetato (7,3 - 8,3%);
- ✓ O monoterpeno majoritário presente no extrato SFE de lavanda brasileira foi a pinocanfona (6,3%). O guaiol (6,6 - 8,7%) e o bulnesol (3,7 - 4,1%) representaram 34 - 44% da fração sesquiterpênica do óleo essencial de lavanda brasileira. No extrato SFE esta fração sesquiterpênica representou 73 % da composição total;

- ✓ O óleo volátil e o extrato SFE de lavanda brasileira não apresentaram efeito inibitório (atividade antiinflamatória) sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L);
- ✓ Pelo método DPPH, o óleo essencial e o extrato SFE de lavanda brasileira apresentaram fraca AA, comparada à atividade dos compostos de referência (BHT e rutina);
- ✓ O óleo volátil ($203 \pm 15 \mu\text{M TE/g}_{\text{óleo}}$) e o extrato SFE ($225 \pm 18 \mu\text{M TE/g}_{\text{SFE}}$) apresentaram poder antioxidante pelo método ORAC comparáveis ao do composto de referência rutina;
- ✓ Pelo método do β -caroteno/ácido linolênico a atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira variou de acordo com o solvente utilizado (metanol, etanol e hexano) e de acordo com a condição SFE empregada. A atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira obtidos com solventes orgânicos variou de -5 a 62%, o extrato obtido a 50 °C e 300 bar apresentou a maior AA entre 119 e 188%, os demais extratos não apresentaram AA pelo método do β -caroteno/ácido linolênico.
- ✓ O extrato SFE e o óleo volátil de lavanda brasileira apresentam potencial para serem utilizados tanto na agricultura ecológica com na medicina tradicional.

5.2 Quebra pedra

- ✓ O rendimento global de extração (X_0) da quebra pedra obtido por SFE variou de $0,8 \pm 0,01\%$ a $3,6 \pm 0,04\%$ (b.u), de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), aendo que a condição de extração que favoreceu o maior rendimento foi de 50 °C e 250 bar;
- ✓ Os rendimentos dos extratos obtidos por LPSE foram: $10,2 \pm 0,04\%$ (metanol), $3,4 \pm 0,04\%$ (etanol) e $1,9 \pm 0,04\%$ (hexano);
- ✓ Para o sistema quebra pedra + CO₂ foi possível determinar a pressão de inversão do rendimento global em torno de 135 bar;
- ✓ Através da cromatografia em camada delgada foi confirmada a presença de óleo volátil, pigmentos, flavonóides e triterpenos nos extratos SFE obtidos nas condições de temperatura e pressão de 40 °C e 100 bar, 40 °C e 200 bar, 40 °C e 300 bar, 50 °C e 100 bar, 50 °C e 200 bar e 50 °C e 300 bar, e nos extratos LSPE. Não foi detectada a presença de saponinas nos extratos SFE obtidos a 40 °C e 100 bar, 50 °C e 100 bar. Foi confirmada a presença de saponinas nos extratos obtidos nas condições de 40 °C e 200 bar, 40 °C e 300 bar, 50 °C e 200 bar e 50 °C e 300 bar, e nos extratos LPSE;
- ✓ O extrato SFE de quebra pedra não apresentou efeito inibitório (atividade antiinflamatória) sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L);
- ✓ Pelo método DPPH de AA, o extrato SFE de quebra pedra apresentou fraca atividade antioxidante comparada à atividade dos compostos de referência (BHT e rutina);

- ✓ Pelo método do β -caroteno/ácido linolênico a atividade antioxidante variou com o solvente utilizado (metanol, etanol e hexano) e de acordo com as condições de temperatura e pressão empregadas na SFE. De maneira geral, os extratos SFE de quebra pedra apresentaram AA superiores a do controle β -caroteno pelo método da reação acoplada β -caroteno/ácido linolênico. A atividade antioxidante dos extratos de quebra pedra obtidos com solventes orgânicos variou de 17 a 217%; o extrato SFE obtido a 40 °C e 200 bar apresentou AA em torno de 100% em uma, duas e três horas de reação; os demais extratos SFE (40 °C e 250 bar e 40 °C e 300 bar) apresentaram AA variando de 21 a 66%; os extratos de quebra pedra podem ser considerados antioxidantes naturais com boa estabilidade e efeito prolongado.
- ✓ A extração supercrítica ofereceu bom rendimento de extrato e preservou as propriedades antioxidantes dos extratos de quebra pedra pelo o controle da pressão e da temperatura de extração.

5.3 Ginseng brasileiro

- ✓ O rendimento global de extração (X_0) do ginseng brasileiro obtido por SFE variou de $0,50 \pm 0,02 \%$ a $1,40 \pm 0,07 \%$ (b.s) de acordo com as condições de extração (pressão e temperatura), sendo que a condição de extração que favoreceu o maior rendimento foi de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 bar;
- ✓ Os rendimentos dos extratos obtidos por LPSE foram: $8,2 \pm 0,8\%$ (metanol), $2,2 \pm 0,7\%$ (etanol) e $0,6 \pm 0,1\%$ (hexano);
- ✓ Para o sistema ginseng brasileiro + CO_2 foi possível determinar as pressões de inversão do rendimento global em torno de 225 bar e 285 bar;
- ✓ Por meio das duas análises químicas realizadas com os extratos de ginseng brasileiro foi possível verificar que as técnicas de CCD e CG nos forneceram um perfil de composição dos extratos SFE de ginseng brasileiro onde foi detectada a presença desde compostos de baixo peso molecular até compostos com estruturas complexas de alto peso molecular (saponinas, ácidos, triterpenos e esteróis). Através da CCD foi confirmada a presença de óleo volátil nos extratos SFE, nos extratos LPSE (metanólico, etanólico e hexânico) e no extrato SFE + co-solvente. Com o perfil de composição apresentado para os extratos obtidos nas diferentes condições SFE constatou-se que as diferentes condições de processo interferem pouco na composição dos extratos em termos de óleos voláteis. A presença de saponinas foi detectada no extrato SFE a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 bar, nos extratos LPSE (metanólico e etanólico) e no extrato SFE + co-solvente. O extrato obtido a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150

bar apresentou bandas com Rfs semelhantes aos dos padrões β -sitosterol e estigmasterol. Como estes padrões apresentam bandas com Rfs muito próximos foi impossível afirmar se ambos os padrões ou se somente apenas um deles estava presente no extrato SFE analisado;

- ✓ Comparando os cromatogramas em camada delgada referentes aos extratos SFE das folhas e das raízes de ginseng brasileiro verificou-se, que em termos de óleos voláteis, tanto as folhas quanto as raízes da planta apresentam bandas com Rfs próximos, sugerindo uma composição química semelhante entre os extratos das folhas e das raízes;
- ✓ Os extratos LPSE obtidos das folhas de ginseng brasileiro apresentaram maior variedade de bandas que os extratos LPSE das raízes, fator que sugere uma maior diversidade de compostos extraíveis com solventes polares das folhas da planta;
- ✓ Foi detectada a presença de flavonóides nos extratos SFE das folhas e das raízes de ginseng brasileiro, porém as bandas apresentaram diferentes colorações e diferentes Rfs, indicando a diferença entre os flavonóides detectados nos extratos obtidos das diferentes partes da planta;
- ✓ Os compostos majoritários identificados no extrato SFE de ginseng brasileiro foram ácido hexadecanóico (0,5 a 27,1%), β -sitosterol e/ou estigmasterol (1,1 - 20,1%) fitol (6,0 - 30,8 %) e hexatriacontane (0,7 a 30,6%). Os compostos com índice de retenção de 2028 e 2035 também foram majoritários, mas não foram possíveis suas identificações;
- ✓ Os compostos majoritários da fração retida na coluna de adsorção foram o para-dietilbenzeno (25,7 - 59,3%) e o meta-dietilbenzeno (3,4 - 27,1%);

- ✓ Os extratos SFE obtidos a 30 °C/250 bar, 40°C/150bar, 40°C/200bar, 40°C/250bar e 40°C/300bar apresentaram em sua composição química o β -sitosterol e/ou estigmasterol, compostos que, de acordo com a bibliografia, fazem parte da composição química das raízes de ginseng brasileiro;
- ✓ O extrato SFE de ginseng brasileiro não apresentou efeito inibitório (atividade antiinflamatória) sobre a lipoxigenase de soja nas concentrações estudadas (4-10 g/L);
- ✓ Pelo método DPPH de AA, os extratos SFE de ginseng brasileiro apresentaram AA significativa, 25 vezes menos eficaz que a AA desempenhada pela rutina antioxidante natural;
- ✓ Pelo método do β -caroteno/ácido linolênico, maior atividade antioxidante foi observada para os extratos metanólico e etanólico, variando de 49 a 110%. Os extratos SFE que apresentaram maior potencial antioxidante foram obtidos a 50 °C e 200 bar e 50 °C e 300 bar, sendo que a porcentagem de inibição à oxidação destes extratos variou entre 143 e 246 %, mantendo-se estável com o tempo.

5.4 Conclusão geral

O emprego de antioxidantes em formulações é muitas vezes empírico de tal modo que a garantia de sua eficácia nem sempre existe. Por meio das metodologias de determinação da atividade antioxidante de extratos de plantas utilizadas neste estudo, constatou-se que os extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro apresentam significativo potencial antioxidante quando avaliadas pelo método da reação acoplada do β -caroteno e ácido linolênico. Pelo método DPPH todos os extratos apresentaram uma atividade antioxidante fraca. Dentre os métodos utilizados o método DPPH é o mais simples de ser executado, por outro lado, o radical utilizado para avaliação da AA não está relacionado com nenhum sistema oxidante presente em seres vivos, ou seja, este método não é representativo quando comparado com reações de oxidação *in vivo*. Para o extrato SFE e óleo volátil de lavanda brasileira verificou-se uma boa atividade antioxidante pelo método ORAC, este resultado vem de encontro aos estudos atuais que tem considerado este método como adequado para representar o poder antioxidante total de extratos naturais. Outro ponto estudado neste trabalho diz respeito à natureza dos solventes utilizados na obtenção dos diferentes extratos das plantas. Concluiu-se que os extratos obtidos com solventes orgânicos apresentam um grau de redução de sua atividade antioxidante com o tempo, já os extratos supercríticos destas plantas apresentaram um perfil de estabilidade em relação à AA o que é um atributo de qualidade dos antioxidantes naturais, e que mostra que a extração supercrítica de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro é adequada para obtenção de extrato (compostos) com propriedades antioxidantes.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

A

Aboutabl, E., Nassar, M.I., Elsakhawy, F. M., Maklad, Y. A., Osman, A. F., El-Khrisy, E. A. M. Phytochemical and pharmacological studies on *Sideritir taurica* Stephan ex wild, **Journal Ethnopharmacology**, 82, p.177-184, 2002.

Adams, R. P. Identification of Essential oils by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, USA: Allured Publishing Corporation, 2001.

Agnaniet, H., Menut, C., Bessière, J.M. Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XLIX: Chemical composition of essential oils of the leaf and rhizome of *Aframomum giganteum* K. Schum from Gabon. **Flavour Fragrance Journal**, 19, p.205-209, 2004.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. , Mason, T. J. Potencial for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.11, n.3-4, p.261-265, 2004.

Allgayer, H., Eisenburg, J., Paumgartner, G. Soybean lipoxygenase inhibition: Studies with the sulphasalazine metabolites N-acetylaminosalicylic acid, 5-aminosalicylic acid and sulphapyridine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 26, 4, p.449-451, 1984.

Alice, C. B., Siqueira, N. C. S., Mentz, I. A., Silva, G. A. A. B., José, K. F. D. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. Ed. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 1995.

Alves, D. L., Silva, C. R. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002.

Alves, T. M. A; Silva, A. F; Brandão, M; Grandi, T. S. M; Smânia, E. F. A; Smânia Jr., A, Zani, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;95(3), p.367-73, 2000.

Anagnostopoulou, M. A. et al .Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v.94, n.1, p.19-25, 2006.

Anderson, J. M., Silatro, S. R., Klauer, S. F., Franceschi, V. R. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, 62, p.45-52, 1989.

Angus, S., Armstrong, B., Reuck, K. M. International Thermodynamic Tables of the Fluid State. v. 3. Carbon Dioxide. Pergamon Press, 1976.

ASAE – American Society of Agricultural Engineers – Method Of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials By Sieving. *American Society of Agricultural Engineers Standard*, p.447-448, 1993.

Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v.89, n.1, p.27-36, 2005.

Auroma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs. *Food and Chemical Toxicology*, 34(5), p. 449-4456, 1996.

B

- Backleh, M., Leupold, G., Parlar, H. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(5), p.1297-1301, 2003.
- Bailac, P. N., Dellacasa, A. D., Duschatzky, C. B., Firpo, N., Ponzi, M. I. Composition of the essential oil *Aloysia gratissima* from San Luis, Argentina. *Anales de la asociacion Química Argentina*, 87(3-4), p.149-153, 1999.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), p.191-203, 2006.
- Ballas, S. K. Hydration of sickle erythrocytes using a herbal extract (*Pfaffia paniculata*) *in vitro*. *Brasilian Journal Haematol*, 111, p.359-362, 2000.
- Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P. R., Gruzdiene. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research Technology*, 214, p.143-147, 2002.
- Bassols, G., Gurni, A. Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular latino americana. *Dominguezia*, 13(1), p.7-24, 1996.
- Bassalo, J. M. Filardo. Nascimento da Física. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 20(1), p.56-74, 1998.
- Bauer, L; Brasil, A; Silva, G. A de. Sobre o óleo essencial de *Lippia lycioides* Steud.(Verbenaceae). *Tribuna Farmacêutica*, 37(2), p. 151-159, 1969.
- Bendini, A; Toschit, G; Lercker, G. Antioxidant Activity of oregano (*Origanum vulgare* L). *Italian Journal of Food Science*, 14(1), p.17-24, 2002.
- Benzie, I. F. F; Strain, J. J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology*, 299, p.15-27, 1999.
- Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A., Esquivel, M. M. Produção de extratos para indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, v.73, p.14-21, 2002.

Braga, M. E. M., Leal, P.F., Carvalho, J. E., Meireles, M. A. A. Comparison of Yield Composition, and Antioxidante Activity of Tumeric (*Curcuma longa* L) Extracts Obtained Using various techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p.6604-6611, 2003.

Brunner, G. Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Applications to Separation Processes. 1a. ed. Darmstadt. Alemanha: Steinkopff, v.4, 1994.

Brunner, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), p.21-33, 2005.

Bunker, T.W., Koetje, D. S., Stephenson, L. C., Creelman, R. A., Mullet, J. E., Grimes, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Dordrecht, 7, p. 1319-1331, 1995.

C

Callame, J. P., Steiner, R. CO₂ Extraction in the flavour an perfumary industry. *Chemistry an Industry*. v.19, p. 395-402, 1982.

Canela, A. P. R. F; Rosa, P. T. V; Marques, M. O. M; Meireles, M. A. A. Supercritical fluid extraction of fatty acids and carotenoids from the microalgae *Spirulina máxima*. *Industrial & Engineerin Chemistry Research*, 41, p.3012-3018, 2002.

Cao, G. H; Prior, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymology*, 299, p.50-62, 1999.

Carvalho Jr, R. N.; Moura, L. S.; Rosa, P. T. V.; Meireles, M. A. A. Supercritical fluid extraction from Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.35, n.3, p.197-204, 2005.

Carvalho Jr, R. Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. Campinas, 2004. (Tese de Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos (UNICAMP).

Castera, A. Production of Low-Fat and Low-Cholesterol Foodstuffs or Biological Products by Supercritical CO₂ Extraction. Process and Application in Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials. Rizvi, S. S. H (Ed.) Blackie Academic & Professional, New York, Capítulo 15, 1994.

Castro, L. O., Chemale, V. M. Plantas Medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo. Guaíba: Agropecuária, p.196, 1995.

Chafer, A.; Fornari, T.; Berna, A.; Stateva, R.; P. Solubility of quercitin in supercritical CO₂+ ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modelling. *Journal of Supercritical Fluids* 32, p. 89-96, 2004.

Charpentier, B. A.; Sevenants, M. R. Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications. 1ed., Washington: American Chemical Society, p. 253, 1988.

Chiu, K.-L.; Cheng, Y.-C.; Chen, J.-H.; Chang, C.; J.; Yang, P.-W.; Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. *Journal of Supercritical Fluids* 24, p. 77-87, 2002.

Cleghorn, C.L., Skeaff, C. M., Mann, J., Chisholm, A. Plant sterol-enriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of a fat-reduced diet. *Europe Journal Clinica Nutrition*, 57, p.170-176, 2003.

Comissão de Homeopatia e Fitoterapia do Sindufarm-SP. *Lista de Plantas Sindufarm*. São Paulo: Sindufarm, p.9-13, 1995.

Contran, R. S., Kumar, V., Robbins, S.T., Robbins. Patologia estrutural e funcional, 6 edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

Cortez, D. A. G., Truiti, M. C. T., Cortez, L. E. R. Ginseng Brasileiro: Revisão Bibliográfica. Arq. *Ciência Saúde da Unipar*, 2(3), 1998.

Crank, J. *The Mathematical of Diffusion*. Clarendon Press, Oxford, p.85, 1975.

Croft, K. P. C., Jüttner, F., Slusarenko, A. J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101, p.13-24, 1993.

D

Da Silva, C. C., Vandresen, F., De Oliveira, C. M. A., Kato, L., Tanaka, C. M. A., Ferreira, H. D. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, p. 593-595, 2006.

Darr, J. A; Poliakoff, M. New Directions in inorganic and Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids. *Chemistry Review*, 99(2), p.495, 1999.

De Figueiredo, R. O., Stefanini, M. B., Ming, L. C., Marques, M. O. M., Facanali, R. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton leaves cultivated in Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *Acta Horticulturae*. p.131-134, 2004.

De Riscala, E. C., Talenti, E. C. J., Retamar, J. A. Essential oil of *Aloysia lycioides*. Essenze, ***Derivati Agrumari***, 43(3), p.291-298, 1973.

Del Valle, J; M; De La Fuente, J. C; Damian, A. C. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. ***Journal of Food Engineering***, 67, p.35-57, 2005.

Dellacasa, A. D., Bailac, P. N., Ponzi, M.I. In vitro activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. ***Journal Essential Oil Research***, 15, p.282-285, 2003.

Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., Delarmelina, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. ***Journal of Ethnopharmacology***, 97(2), p.305-311, 2005.

Duschatzky, C. B., Martinez, A. N., Almeida, N. V., Bonivardo, L. S. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina Plants against the root-knot nematode. ***Journal Essential Oil Research***, 16, p.626-628, 2004.

E

Espinosa, S. N. Procesamiento Supercritico de Productos Naturales Modelado, Análisis y Optimización. Bahia Blanca - Argentina, 2001. Tesis Doctoral en Ingenieria Quimica – Universidad Nacional Del Sur.

Evelson, P; Travacio, M; Repetto, M. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, p. 261-266, 2001.

F

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

Ferreira; S. R. S; Nikolov, Z. L; Doraiswamy, L. K; Meireles, M. A. A; Petenate, A. J. Supercritical Fluid Extractio of Black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. ***Journal of Supercritical Fluids***, 14(3), p.235-245, 1999.

Foo, L. Y. Amarrinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. ***Phytochemistry***, 39(1), p.217-224, 1995.

França, L. F., Reber, G., Meireles, M. A. A., Machado, N. T., Brunner, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from bacuri (*Mauritia flexuosa*), a fruit from Amazon region. ***Journal of Supercritical Fluid***, 14, p.247-256, 1999.

França, L. F., Meireles, M. A. A. Modeling the Extraction of carotene and lipids from pressed Palm Oil (*Elaes guineesis*) Fibres using Supercritical CO₂. ***Journal of Supercritical Fluids***, 18, p.35-47, 2000.

Franco, A. L. P., Oliveira, T. B., Ferri, P. H., Bara, M. T. F., Paula, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (Açafrão). ***Revista Eletrônica de Farmácia***, 2, p.208-220, 2007.

Freitas, C. S., Baggio, C. H., Da Silva-Santos, J. E., Rieck, L., Santos, C. A. M., Junior, C. C; Ming, L. C., Cortez, D. A. G., Marques, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of na aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. ***Life Science***, 74, p.1167-1179, 2004.

Fukumoto, L. R.; Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. ***Journal Agricultural Food Chemistry***, 48(8), p.3597-3604, 2000.

G

Garcia Leme, J. Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 19, 5, p.146-150, 1979.

Garcia, C. C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatsky, C., Damonte, E. B. Virucidal Activity of Essential oils from Aromatic Plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*, (17), p.1073-1075, 2003.

Garcia Leme, J. Métodos experimentais no estudo de resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 19(5), p.146-150, 1979.

Gillis, C. N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link. *Biochemical Pharmacology*, 53, p.1-8, 1997.

Goli, A. H; Berzagar, M; Sahara, M. A. Antioxidante activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, p.521-525, 2005.

Gordon, M. H. Te mechanism of antioxidant action in vitro. In: Hudson, B. J. F. Food antioxidants. London: Elsevier applied Science, 1990.

Goto, M., Sato, M., Hirose, T. Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26, p.401-407, 1993.

Grigonis, D; Venskutonis, P. R; Sivik, B; Sandahl, M; Eskilsson, C. S. Comparasion of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet Grass (*Hierchloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 33(3), P.223-233, 2005.

H

Hamilton, R. J. The chemistry of rancidity in foods. In: Hamilton, R. J., Allen, J. C. Rancidity in foods. 3thed. London: Blackie Academic & Professional, p.121, 1994.

Hammerschmidt, P. A., Pratt, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *Journal of Food Science*, 43, p.556-559, 1987.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*, v.98, n.1, p.136-148, 2006.

Hildebrand, D. F. Lipoxygenases. *Physiologia Plantarum*, 76, p.249-253, 1989.

Hu, Q., Huh, Y., Xu, J. Free radical-scavenging activity of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, v.91, n.1, p.85-90, 2005.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. Development and validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, p. 1815-1821, 2002.

I

Ibañez, E; Palacios, J; Señoransñorans, F. J; Santa-Maria, G; Reglero, G. Isolation and separation of tocopherols from olive by products with supercritical fluids. *Journal American Oil Chemical Society*, 77(2), p.187-190, 2000.

J

Jacobs, M. B. The Chemical Analysis of Food and Food Products, 3rd Ed. Robert Krieger Publishing: New York, 1973.

Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D.; Madhavi, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: Madhavi, D. L.; Deshpande, S. S.; Salunkhe, D. K. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 1996.

Joulain, D., König, W. A. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. EBVerlag, Hamburg, Alemanha, 1998.

Jung, C. H. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT- Food Science and Technology*, 36(3), p. 266-274, 2006.

Jung, C. H., Scog, H. M., Choi, I. W., Cho, H. Y. Antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves. *Food Chemistry*, p.6, 2004.

K

Kassuya, C. A. L., Silvestre, A., Menezes –de-Lima Jr, O., Marotta, D. M., Rehder, V. L. G., Calixto, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. ***European Journal of Pharmacology***, 546, p. 182-188, 2006.

Kassuya, C. A. L.; Silvestre, A. A.; Rehder, V. L. G.; Calixto, J. B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extrat and lignans from *Phyllantys amarus* in models of persistent inflammatory and neurophathic pain. ***European Journal Pharmacology***, 478, p. 145-153, 2003.

Khatoon, S.; Rai, V.; Rawat, A. K. S.; Mehrotra, S. Comparative pharmacognostic studies of tree *Phyllanthus* species. ***Journal of Ethnopharmacology***, 104. P.79-86, 2006.

Kiemer, A. K.; Hartung, T.; Huber, C.; Vollmar, A. M. *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kB pathway. ***Journal of Hepatology***, 38, p. 289-297, 2003.

Kim, D. H., Moom, Y. S., Lee, D. H., Jung, J.S., Suh, H. W., Song, D.K. The Inhibitory effects of ginseng saponins on the Stress-Induced Interleukin-6 level in Lice. ***Neuroscience Letter***, 13-16(5), p.353, 2003.

Kiriamiti, H. K., Rascol, E., Marty, A., Condorget, J. S. Extraction rates of oil from high oleic sunflower seeds with supercritical carbon dioxide. ***Chemical Engineering and Processing***, 41(8), p. 711-718, 2001.

Kirschbaum, B. Total urine anioxidant capacity. ***Clinica Chimica Acta***, 305, p.167-173, 2001.

König, W. A., Joulain, D., Hochmuth, D. H. Terpenoids and related constituents of essential oils, Mass Finder 3, www.massfinder.com, 2004.

Kumaran, A.; Kurunakaran, R. J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of live *Phyllanthus* species from India. ***LTW***, 40, p. 344-352, 2007.

L

Lack, E., Seidlitz, H. Commercial Scale Decaffeination of coffee and tea using Supercritical CO₂ in Extraction of Natural Products using Near-Critical Solvents, King, M. B and Bott, T.R (Eds.) Blackie Academic e Professional, New York, Capítulo 5, 1993.

Lanças, F. M. Fluidos Supercríticos: Desenvolvimento de instrumentação para fluidos supercríticos – uma experiência brasileira bem sucedida. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Ano 3, (16), p.12-15, 2000.

Leal, P. F.; Braga, M. E. M.; Sato, D. N.; Carvalho, J. E.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2520-2525, 2003.

Leal, P. F., Kfourri, M. B., Alexandre, F. C., Meireles, M. A. A. Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos de raízes de ginseng brasileiro: seleção da fase da fase móvel, detecção de flavonóides e óleos voláteis. Simpósio Latino Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SLACA, 2005(a).

Leal, P. F.; Kfourri, M. B.; Alexandre, F. C.; Queiroga, C. L.; Jr. Montanari, Í.; Meireles M. A. A. Supercritical Fluid Extraction from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* and *Pfaffia paniculata*): Global yields and antioxidant activity, 7th International Symposium on supercritical Fluid, 2005 (b).

Letessier, M. P., Svoboda, K. P., Walters, D. R. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyssop* (*Hyssopus officinalis*). *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), p.673, 2001.

Li, Q., Zhang, Z., Shong, C., Liu, W., Zhou, Q. Solubility of solid solutes in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents. *Fluid Phase Equilibria*, 207(1-2), p.183-192, 2003.

Lim, Y. Y., Murtijaya, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT*, 40, p. 1664-1669. 2007.

Ling, W. H., Jones, P. J. H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Science*, 57, p.195-206, 1995.

Lissi, E; Salimhanna, M; Pascual, C; Decastillo, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (trap) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, p.153-158, 1995.

Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestre, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2. ed. Nova Odessa: São Paulo, Editora Plantarum, 1991.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. de Abreu. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA.**: São Paulo, Brasil. p. 45-46, p. 215-216, p. 486, 2002.

Luengthanaphol, S., Mongkholkhajornsilp, D., Douglas, S., Douglas, P. L., Pengsopa, L., Pongamphai, S. Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments. **Journal of Food Engineering**, 63(3), p.247-253, 2004.

M

- MacRae, W. D., Towers, G. H. N. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23, p. 1207-1220, 1984.
- Martinez, J.; Monteiro, A. R.; Rosa, P. T. V.; Marques, M. O. M.; Meireles, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42(5), p.1057-1063, 2003.
- Martinez-Tome, M. et al. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, 64(9), p.1412-1419, 2001.
- Martins, E. R., Castro, D. M., Castellani, D. C., Dias, J. E. . Plantas medicinais. Viçosa: Editora da UFV, 2000.
- Matsuzaki, P.; Akisue, G.; Oloris, S. C. S.; Górniak, S. L.; Dagli, M. L. Z. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. *Life Science*, 74, p. 573-579, 2003.
- Mattea, F.; Cardarelli, D. A.; Daghero, J. D. Mattea, M. A. Natural antioxidants obtained with supercritical CO₂. *In: V Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos*, 2004, Florianópolis. Caderno de Resumos do V EBFS, 2004.
- Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H., Huang, S. J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT-Food Science and Technology*, 38(6), p.589-597, 2005(b).
- Mau, J. L., Tsai, S. Y., Tseng, Y. H., Huang, S. J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *Food Chemistry*, 93(4), p.641-649, 2005(a).
- Maul, A. A. Fluidos supercriticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. *Revista Brasileira Ciência & Desenvolvimento*, Ano 2, (11), p.42-46, 1999.
- Mazumder, A., Mahato, A., Mazumder, R. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. *Natural Product Research*, 20(4), P. 323-326, 2006.
- McHung, M. A; Krukoni, V. J. “Supercritical Fluid Extraction. Principles and practice”. Boston. Butterworths. Boston. USA. 1986.

Mchugh, M. A., Yogan, T. J. Three-phase solid-liquid-gas equilibria for three carbon dioxide-hydrocarbon solid system, two ethane-hydrocarbon solid systems, and two ethylene-hydrocarbon solid systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 29, p.112-115, 1984.

Meireles, M. A. A. Supercritical extraction from solid process design data (2001-2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7, P.321-330, 2003.

Mellors, A., Tappel, A. L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *Journal Biological Chemistry* 241(19), p.4353-4356, 1966.

Moura, L. S. Obtenção de Extrato de Funcho (*Foeniculum vulgare*): determinação das isothermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos, e do equilíbrio de fases. Campinas, 2004. (Tese de Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos (UNICAMP).

Moura, L. S., Carvalho Jr, R. N., Stefanini, M. B., Ming, L. C., Meireles, M. A. A. Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*): global yields, composition and kinetic data. *Journal of Supercritical Fluid*, 35, p.212-219, 2005.

N

Nakai, S., Takagi, N., Miichi, H., Hayashi, S., Nishimoto, N., Takemoto, T., Kizu, H. Pfaffosides and nortripernoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, 23(8), p.1703-1705, 1984.

Navarro, A. De las Heras, B., Villar, A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foatens* CLEM. **Biological Pharmacology**, 24, p.470-473, 2001.

Nessa, F., Ismail, Z., Mohamed, N., Haris, M. R. H. M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of purê flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. **Food Chemistry**, 88(2), p.243-252, 2004.

Neto, A. N., Costa, J. M. L. C., Belati, C. C., Vinhólis, A. H. C., Possebom, L. S., Da Silva Filho, A. A., Cunha, W. R., Carvalho, J. C. T., Bastos, J. K., Silva, M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, 96, p. 87-91, 2005.

Nishimoto, N., Nakai, S., Takagi, N., Hayashi, S., Takemoto, T., Odashima, S., Kizu, H., Wada, Y. Pfaffosides and Nortriterpenoid Saponins from *Pfaffia-paniculata*. **Phytochemistry**, (23), p. 139-142, 1984.

Notka, F.; Meier, G. R; Wagner, R.; Inhibition of wild-type immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. **Antiviral Research**, 58, p. 175-186, 2003.

O

Ogata, T., Higuchi, H., Mochida, S., Matsumoto, H., Kato, A., Endo, T., Kaji, A., Kaji, H. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *AIDS Res. Hum Retroviruses*, 8, p.1937-1944, 1992.

Oliveira, F de. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze – o ginseng-brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1, p.86-92, 1986.

Omulokoli, E., Khan, B., Chhabra, S.C. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, p.133-137, 1997.

Ordoñez, J. A., Rodriguez. M. I. C.,Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillon, G. D. G. F., Peralez, L. H., Cortecero, M. D. S. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artemed,1, p.33-49, 2005.

Ott, M., Thyagarajan, S. P Gupta, S. Regulation of Hepatitis B virus enhancer activity by *Phyllanthus niruri* is involved in its antiviral effects. *Gastroenterology*, 108(4), 1997.

Ott, M., Thyagarajan, S. P., Gupta, S. *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. *European Journal of Clinical Investigation*, 27, p.908-915, 1997.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M, Flanagan, J. A., Deemer, E. K., Prior, R. L., Huang, D. Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, p.2772-2777, 2002.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior R. L. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, p.4619-4626, 2001.

Owen, R. W; Giacosa, A; Hull, W. E; Haubner, R; Spiegelhalder, B. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10), p.1235-1247, 2000.

P

Park, T. K., Holland, M. A., Laskkey, J. G., Polacco, J. C. Germination – associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. ***Plant Science***, 96, p.109-117, 1994.

Pasquel, A.; Meireles, M. A. A.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J. Extraction of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol, and CO₂ + water + ethanol. ***Brazilian Journal of Chemical Engineering***, (17), p. 271-279, 2000.

Pereira, C. G., Meireles, M. A. A. Manufacturing cost of essential oil obtained by supercritical fluid extraction. ***In Proceedings of the 8th Conference on Supercritical Fluids and their Applications***, Ischia, Italia, 2006.

Pereira, C. G., Meireles, M. A. A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia Triphylla* [L'herit] Britton) and mango (*Mangifera Indica* L.) leaves. ***Journal of Supercritical Fluids***, 30, p.150-173, 2007.

Perrut, M. Supercritical fluid application: industrial development and economic issues. ***Industrial & Engineering Chemistry Research***, 39, p.4531-4535, 2000.

Perrut, M.; Clavier, J. Y. Supercritical Fluid Formulation: Process and Scale-up. ***Industrial & Engineering Chemical Research***, (42), p.6375-6383, 2003.

Pesek, C. A., Wilson, L. A. Hammond, E. G., Spice quality: effect of cryogenic and ambient grinding on volatile, ***Journal Food of Science***, 50(3), p.599-601, 1985.

Peter, S. Supercritical Fractionation of Lipids in Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents, King, M. B and Bott, T.R (Eds.) Blackie Academic e Professional, New York, Capítulo 4, 1993.

Q

Qian-Cutrone, J., Huang, S., Trimble, J., Li, H., Lin, P. F., Alam, M., Klohr, S. E., Kadow, K. F. Niruriside a new HIV revirre binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **Journal Natural Prodroducts**, 59, p.196-199, 1996.

Qiao, C. X., Den, R., Kudo, K., Yamada, K. Takemoto, K., Wati, H., Kamba, S. Ginseng enhances contextual car conditioning and neurogenesis in rats. **Neuroscience Research**, 51, p.31-38, 2005.

Queiroga, C. L. *Pfaffia paniculata* Kuntze (Amaranthaceae). Plantas em Destaque, **Revista Racine**, 78, p.56-62, 2004.

Quispe-Condori, S. Q. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas da extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisina annua*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*. Campinas, 2005. (Tese de Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos (UNICAMP).

R

- Rai, V.; Khatoon, S.; Bisht, S. S.; Mehrotra, S. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* **Schum. and Thonn. Chemosphere.** 61, p. 1644-1650. 2005.
- Rajeshkumar N. V., Joy K. L., Kuttan G., Ramsewak R. S., Nair M. G. e Kuttan R. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, p. 17-22, 2002.
- Ramalho, V. C., Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, 29(4), p.755-760, 2006.
- Raphael, K. R.; Kuttan, R. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 87, p.193-197, 2003.
- Rates, S. M. K., Gosmann, G. Gênero *Pfaffia*: Aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12(2), p. 85-93, 2002.
- Reverchon, E. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, 10(1), p.1-37, 1997.
- Reverchon, E., Kaziunas, A., Marrone, C. Supercritical CO₂ extraction of hiprose seed oil: experiments and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, (55), p.2195-2201, 2000.
- Ribeiro, M. A.; Bernardo-Gil, M. G.; Esquivel, M. M. *Melissa officinalis*. L: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids**, 21(1), p.51-60, 2001.
- Ricciardi, G. A. L., Torres, A., Agrelo de Nassiff, A., Ricciardi, A., Van Baren, C., Bandoni, A. Examen de los aceites esenciales de especies de Aloysia (Verbenaceae) del nordeste. Corrientes: UNNE. Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas, 1999.
- Ricciardi, G. A. L., Van Baren, C. M., Di Leo Lira, P., Ricciardi, A. I. A., Lorenzo, D., Dellacassa, E., Bandoni, A. L. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour Fragrance Journal**, 21(4), p.698-703, 2006.
- Rice-Evans, C. A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: Procedures and limitations. **Free Radical Research**, 33, p. 59-66, 2000.
- Robbers, J. E.; Tyler, V. E. Tyler's herbs of choice: the therapeutic use of phytochemicals. New York: Haworth Herbal, p. 287, 1999.

Rodrigues, V. M., Rosa, P. T. V., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics and Composition Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, p. 1518-1523, 2003.

Rodrigues, V. M., Sousa Chiavione-Filho, O., Marques, M. O. M., Meireles, M. A. A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure plus solvent. *Journal of Supercritical Fluid*, 22(1), p.21-36, 2002.

Rosa, P. T. V., Meireles, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, 8, p.229-234, 2001.

Rossato, M. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (BRIQUET) MOLDENKE (VERBENACEAE) do Sul do Brasil. *Química Nova*, 29(2), p.200-202, 2006.

Rouet-Mayer, M., Bureau J., Laurieri, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. *Plant Physiology*, 98, p.971-978, 1992.

S

Saengcharoenrat, C.; Guyer, D. E. Effects of supercritical carbon dioxide conditions on onion oil desorption. *Journal of Food Engineering*, 63, p. 33-37, 2004.

Safayhi, H., Mack, T., Sabiaeraj, J., Anazodo, M. I. Subramanian LR, Ammon HPT. Boswellic acids: novel, specific, non-redox inhibitors of 5-lipoxygenase. *Journal Pharmacology Exper Ther*, 261(3), p.1143-1146, 1992.

Sánchez-Lamar., Fiore, M., Cundari, E., Ricordy, R., Cozzi, R., De Salvia, R. Phyllanthus orbicularis aqueous extrac: cytotoxic, genotoxic and antimutagenic effects in the CHO cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161, p. 231-239, 1999.

Sant'ana, H. B. Desenvolvimento de uma Metodologia para Determinação da Solubilidade de Óleos essenciais em Dioxido de carbono pressurizado. Campinas, 1996. Dissertação em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Schluter, A., Barbera, M. J., Iglesias, R., Giralt, M., Villaroya, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochemical Journal*, 362, p.61-69, 2002.

Señorans, F. J; Ruiz, A; Ibañez, E; Tabera, J; Reglero, G. Liquid chromatogramphicmass spectrometric analysis of supercritical fluid extracts of rosmary plant. *Journal Chromatography*, 870, p.491-499, 2000.

Santos, A. R. S., Filho, V. C., Yunes, R. A., Calixto, J. B. Analysis of the Mechanisms Underling the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. *General Pharmacology*, 26(7), p.1499-1506, 1995.

Shahidi, F. Natural Antioxidants: Chemistry, Health effects, and Applications. AOCS Press: Champaign, Illinois, p. 1-4, 1997.

Shaidi, F., Naczsk, M. Food fenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995.

Shiobara, Y., Inoue, S. S., Nishiguchi, Y., Kato, K., Takemoto, T., Nishimoto, N., Oliveira, F de., Akisue, M. K., Hashimoto, G. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pluvulenta*. *Phytochemistry*, 31, p.1737-1740, 1992.

Silva, F. A. M; Borges, M. F. M; Ferreira, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quimica Nova*, 22(1), p.94-103, 1999.

Silva, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less). Florianópolis, 2004. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico (UFSC).

Simic, M. G.; Karel, M. Autoxidation in Food and Biological Systems. Plenum Press: New York, USA, p.261-262, 1980.

Simões, C. M. O., Mentz, E. O., Irgang, B. E., Stehmann, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRG, p.173, 1988.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. O., Gosmann, G.; Mello, J. C. O., Mentz, A. L.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, p.21, 2000.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed. Revista, Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002.

Simonetti, P; Pietta, P; Testolin, G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, p.1152-1155, 1997.

Siqueira, J. C. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* (*Amaranthaceae*). **Acta Biológica Leopoldensia**, 10, p. 269-278, 1988.

Sircar, J. C., Schwender, C. F., Johnson, E. A. Soybean lipoxygenase inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Prostaglandins**, 25(3), p.393-396, 1983.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hräs, A. R., Simonic, M., Knez, Z. Phenols, Proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.89, p. 191-198, 2005.

Smith, L. B., Downs, R.J. Amarantáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**, parte I, Fascículo: As plantas amaras, p. 40-42, 1972.

Soler, E., Dellacasa, E., Moyna, P. Composition of *Aloysia gratissima* flower essential oil. **Planta Medica**, 6, p.488-490, 1986(a).

Soler, E., Dellacasa, E., Moyna, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, 25(6), p.1343-45, 1986(b).

Sovová, H. Mathematical model for Supercritical Fluid extraction PF natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, 33(1), p.35-52, 2005.

Sovová, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-I. modeling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, 49(3), p.409-414, 1994.

Sripanidklchai, B.; Tattawasaart, U.; Laupatarakasem, P.; Vinitketkumneun, U.; Sripanidkulchai, K.; Furihata, C.; Matsushima, T. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Phyllanthus amarus*. **Phytomedicine**, 9, p. 26-32, 2002.

Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martínez, J. R. Comparación de La composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundários volátiles de plantas de la familia verbenaceae. **Revista da Acadêmia Colombiana de Ciência**, 27, 105, p.579-597, 2003.

Steinmetz, M. D., Tognetti, P., Mourgue, M., Jouglard, J., Millet, Y. Toxicity of certain commercial essential oils: oil of *hyssop* and oil of sage. **Plantes Médicinales et Phytothérapie** 14(1), p:34-45, 1980.

Stephenson, L. C., Bunker, T. W., Dubbs, W. E., Grimes, H. D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. **Plant Physiology**, 116, p.923-933, 1998.

Syamsundar, K. V., Singh, B., Yhakur, R. S., Hussain, A., Kiso, Y., Hikino, H. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herb. **Journal of Ethnopharmacology**, 14, p.41-44, 1985.

T

Takemoto, T., Nishimoto, N., Nakai, S., Takagi, N., Hayashi, S., Odashima, S., Wada, Y. Pfaffic acid a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. ***Tetrahedron Letters***, 24(10), p.1057-1060, 1983.

Tan, C., Liou, D. Modeling of Desorption at Supercritical Conditions. ***Aiche Journal***, 35, p.1029-1031, 1989.

Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruit at different maturity stages. ***Food Chemistry***, 98(4), p.599-608, 2006.

Teske, M., Trentini, A. M. M. M. Herbarium. ***Compêndio de Fitoterapia***, Fundação Herbarium Laboratório Botânico LTDA, Curitiba, PR, p.137, 1995.

Thyagarajan, S. P., Subramaniam, S., Thirunalasundari, Venkateswaran, T. P. S., Blumberg, B. S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. ***Lancet***, 2, p.764-766, 1988.

Thyagarajan, S. P., Subramaniam, S., Thirunalasundari, T., Venkateswaran, P. S., Blumberg, B. S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. ***Lancet***, p.764-766, 1988.

Torre, J., Lorenzo, M. P., Martinez-Alcazar, M. P., Barbas, C. Simple high-performance liquid chromatography method for α -tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves. New data on α -tocopherol content. ***Journal of Chromatography A***, v.919, n.2, p.305-311, 2001.

Toursarkissian, M. Plantas medicinales de la Argentina. Ed. Hemisferio Sur SA, Bs. As.;1980.

Trovati, G., Sanchez, E. A., Galhiane, M. S., Chierice, G. O. ***In Proceeding of the II Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais***, 122. Campinas 2003.

V

Valle, J. M., Roglinski, T., Zetzel, C.; Brunner, G. Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. *Food Research International*, 38(2), p.203-213, 2005.

Van de Berg, R; Haenen, G. R. M. M; Van de Berg, H. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurement of mixtures. *Food Chemistry*, 66, p.511-517, 1999.

Vasconcellos, C. M. C. Extração Supercrítica dos Óleos Voláteis de *Achyrocline Satureioides* (Macela) e *Vetiveria zizanioides* (Vetiver): Determinação da Cinética de Extração e Estimativa de Custos de Manufatura. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos (UNICAMP).

Vazquez da Silva, M., Barbosa, D. High-Pressure Phase Equilibrium Data for Aromatic Components of Wine: carbon dioxide/ n-butanal System. *Industrial & Engineering Chemistry Research* (39), 4427-4430, 2000.

Velasco, R. J; Villada, H. S; Carrera, J. E. Aplicaciones de los Fluidos Supercriticos em la Agroindustria. *Informacion Tecnologica*, 18(1), p.53-65, 2007.

Venkateswaran, P. S., Millman, I., Blumberg, B. S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in vivo studies. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 84, 274-278, 1987.

Vieira, A. A., Oliveira, M. G. A., Jose, I. C., Piovesan, N. D., Rezende, S. T., Moreira, M. A., Barros, E. G. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 13(1), p.5-12, 2001.

Villasenõr, L. M., Angelada, J., Canlas, A. P., Echegoyen, D. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytoterapy Research*, 16, p.417-421, 2002.

Vinayagamoorthy, T. Antibacterial activity of some medicinal plants of Sri Lanka Ceylo. *Journal of Science Biological*, 15, p.50-59, 1982.

W

Wagner, H., Wolff, P. New natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity. ***Proceedings in Life Sciences***, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.1, 1977.

Wang, S. Y., Zheng, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. ***Journal of Agriculture and Food Chemistry***, 49, p.4977-4982, 2001.

Wu, J. Y., Wong, K., HO, K. O., Zhou, L. G. Enhancement of saponin production in Panax ginseng cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. ***Enzyme and Microbial Technology***, 36, p.133-138, 2005.

Wagner H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. Plant Drug Analysis. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 1985.

Y

Yépez, B; Espinosa, S; Lopez, S; Bolanos, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria*, 194, p.879-884, 2002.

Yildirim A., Mavi, A., Kara, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, p.4083-4089, 2001.

Yoda, S. K. Estudo da cinética da extração dos glicosídeos da *Stevia rebaudiana* bertonii com mistura CO₂ + água. Campinas, 2001. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

Yoda, S. K., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. Supercritical Fluid Extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni Using CO₂ an CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*, 57, p. 125-134, 2003.

Young, I. S. Measurement of total antioxidant capacity. *Clinica Chimica Acta*, 54, p.339, 2001.

Z

Zancan, K. C., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinal Roscoe*) oleoresin with CO₂ and co-solvents: study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 24(1), p.57-76, 2002.

Zetzl, C., Brunner, G., Meireles, M. A. A. Standardised Low-cost batch SFE-Units for University Education and Comparative Research. *Proceedings of the 6th International Symposium n Supercritical Fluids*, Versailles – França, 2003.

Zygadlo, J. A., Lamarque, A. L., Guzman, C. A. Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, (7), p.593-595, 1995.

Capítulo 7 – Anexos

7.1. Cromatogramas lavanda brasileira

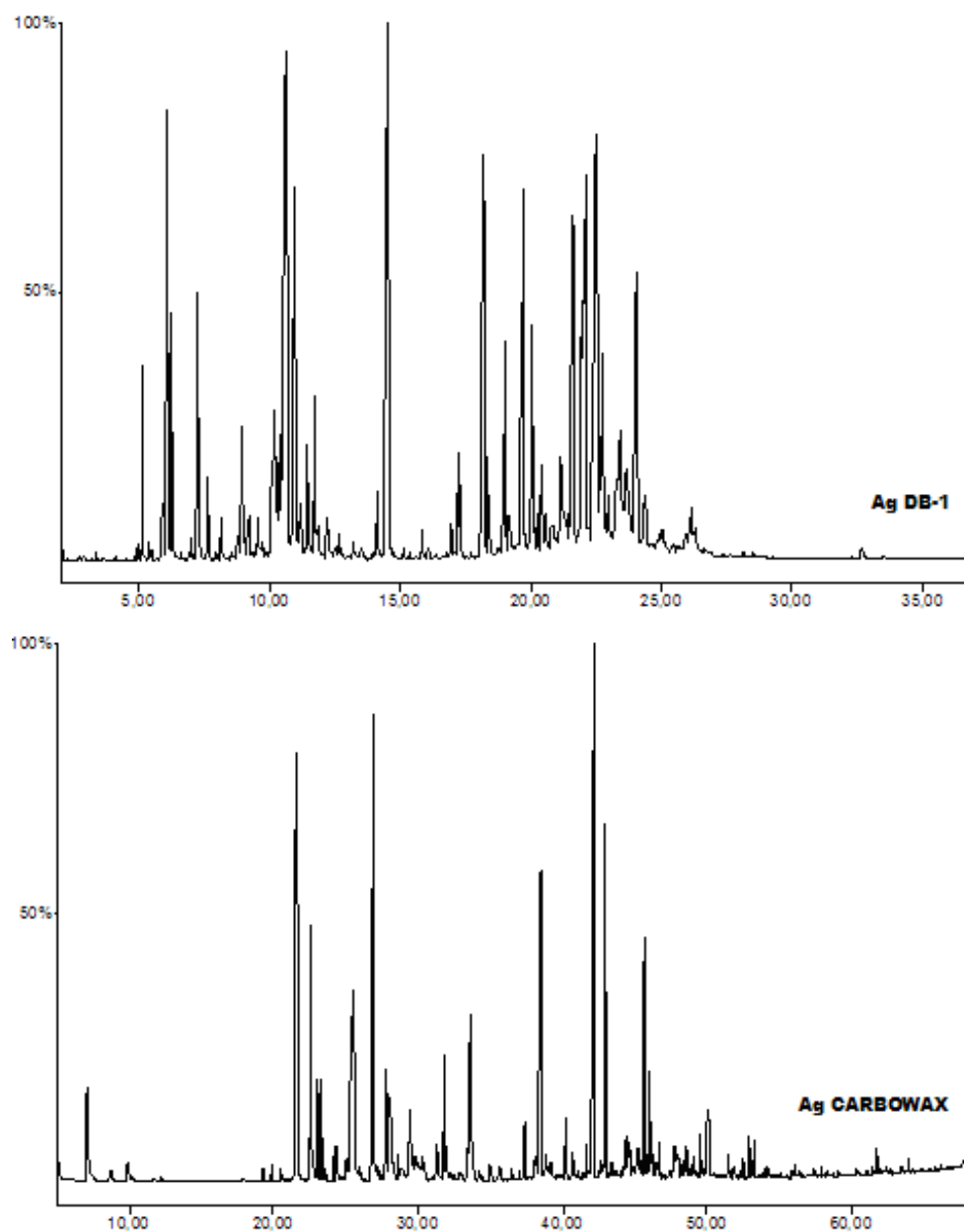
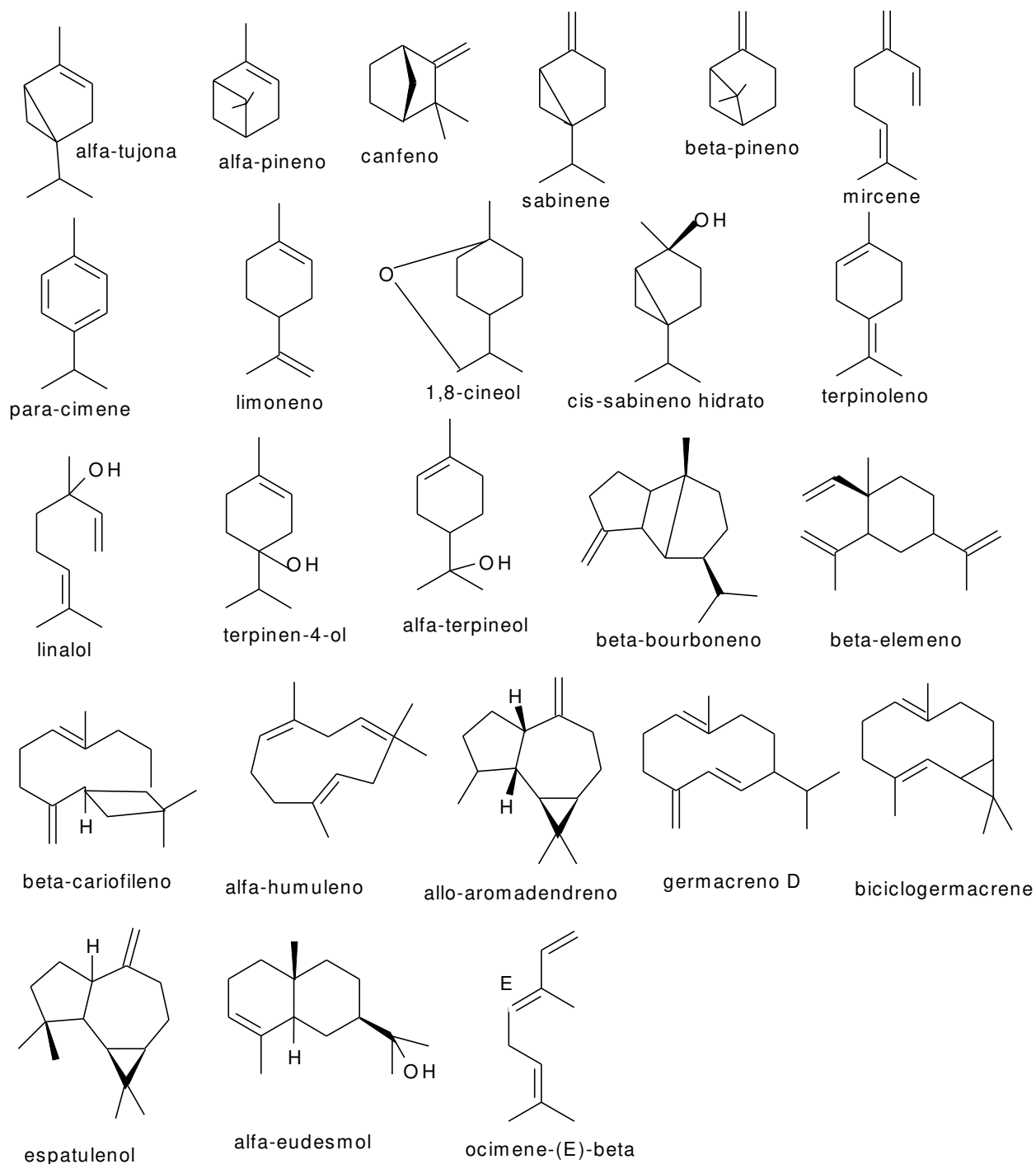
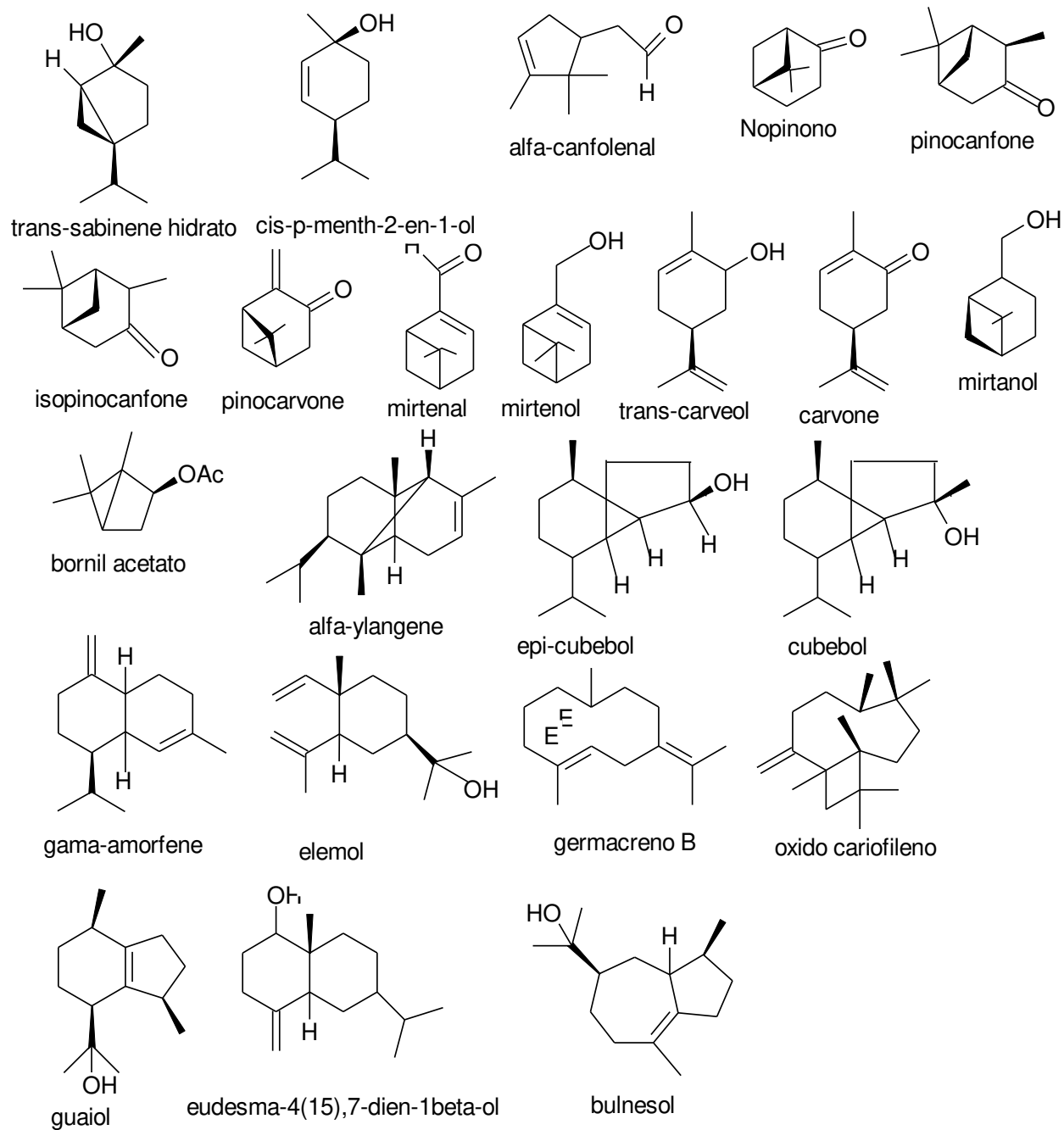


Figura 7.1.: Cromatogramas do óleo essencial de lavanda brasileira obtidos com a utilização da coluna polar DB-1 e da coluna apolar Carbowax.

7.1.1. Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial e no extrato SFE de lavanda brasileira (Adams, 2001).





7.2. Atividade antiinflamatória

Preparo da solução tampão:

- 6,8 g (0,1M) de $\text{H}_2\text{PO}_4\text{K}$
- Solução molar de NaOH: 8g de NaOH em 250 mL de água deionizada

Preparo das soluções para determinação da solubilidade:

- Os extratos foram diluídos em etanol nas concentrações de 2, 4 e 10 g/L;
- O substrato foi preparado com 30 g de ácido linoléico diluído em 100 mL de solução tampão.
-

Tabela 7.2.1: Solubilidade da Lavanda brasileira (óleo volátil)

Concentração (g/L)	Comprimento de onda	
	210 nm	234 nm
10	1,11	0,52
4	0,38	0,15
2	0,22	0,08

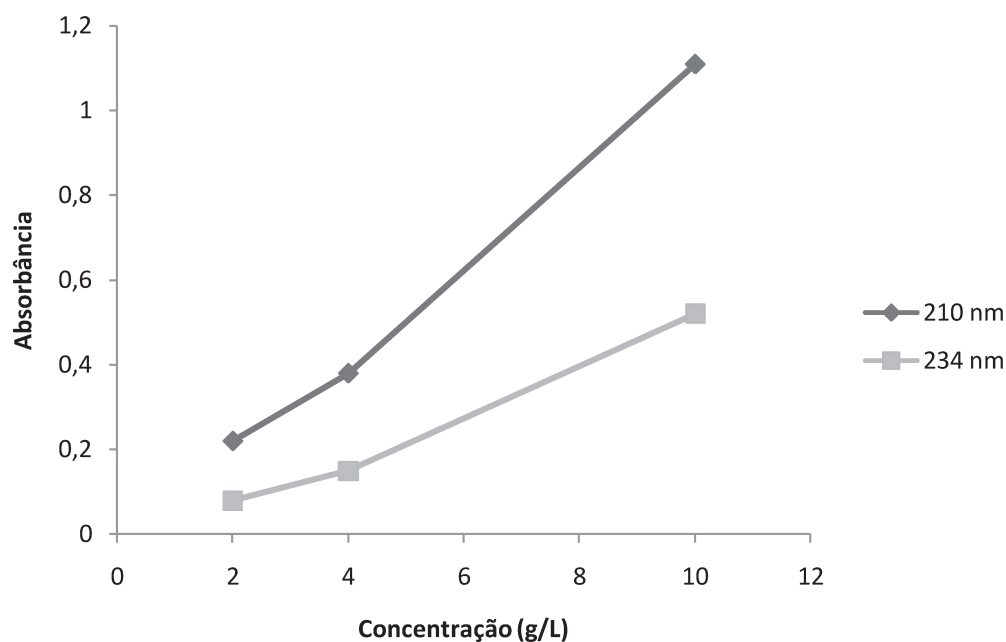
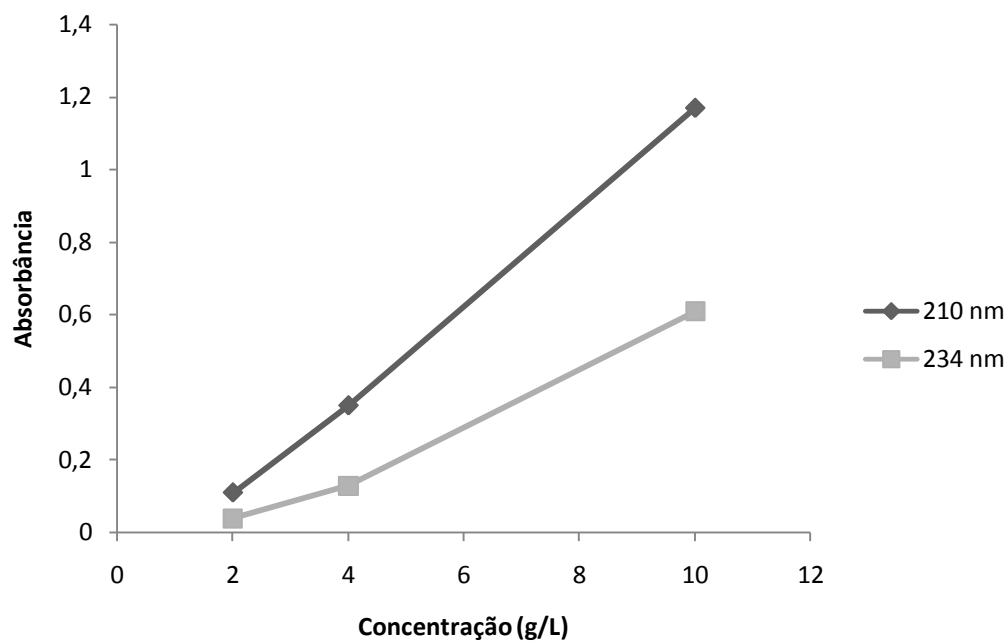


Figura 7.2.: Solubilidade do óleo volátil de lavanda brasileira nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.

Tabela 7.2.2. Solubilidade da Lavanda brasileira (extrato SFE)

Concentração (g/L)	Comprimento de onda	
	210 nm	234 nm
10	1,17	0,61
4	0,35	0,13
2	0,11	0,04

**Figura 7.3: Solubilidade do extrato SFE de lavanda brasileira nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.****Tabela 7.2.3. Solubilidade da Quebra pedra (extrato SFE)**

Concentração (g/L)	Comprimento de onda	
	210 nm	234 nm
10	1,15	0,57
4	0,44	0,13
2	0,20	0,05

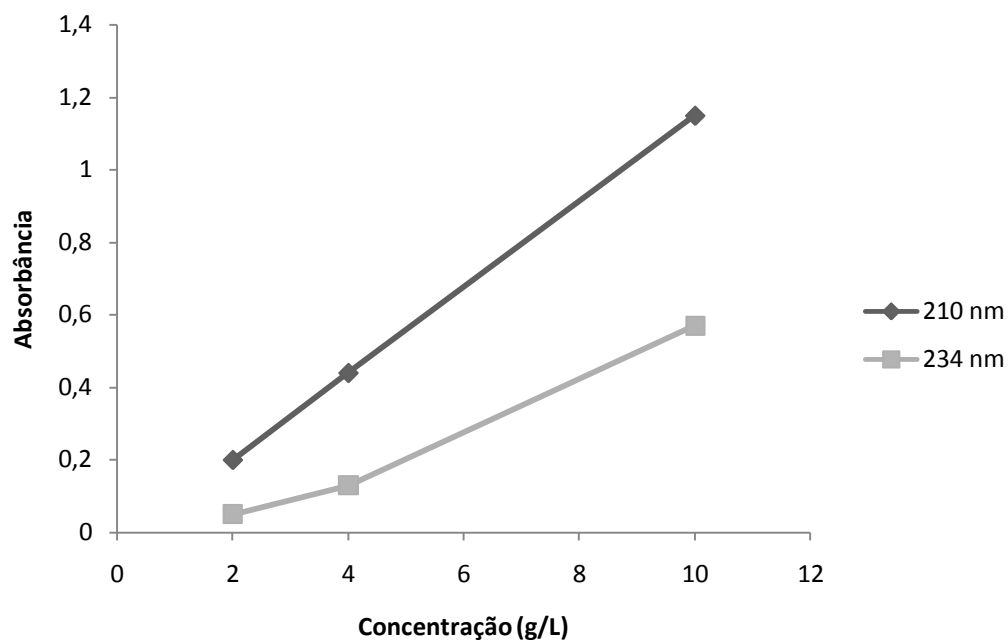


Figura 7.4: Solubilidade do extrato SFE de quebra pedra nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.

Tabela 7.2.4. Solubilidade do Ginseng brasileiro (extrato SFE)

Concentração (g/L)	Comprimento de onda	
	210 nm	234 nm
10	1,23	0,47
4	0,56	0,12
2	0,29	0,04

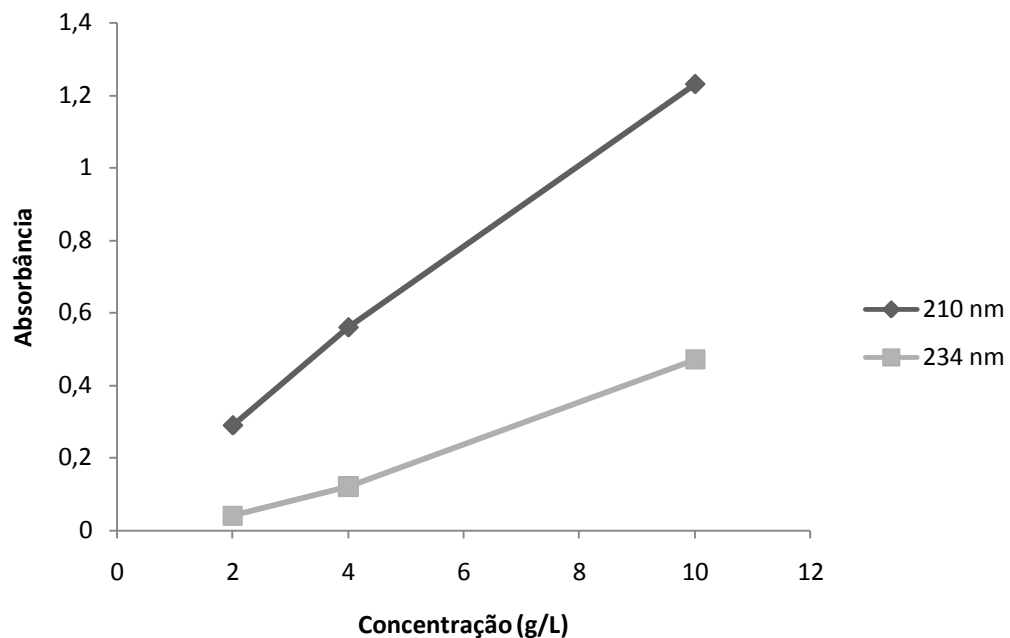


Figura 7.5: Solubilidade do extrato SFE de ginseng brasileiro nos comprimentos de onda de 210 e 234 nm.

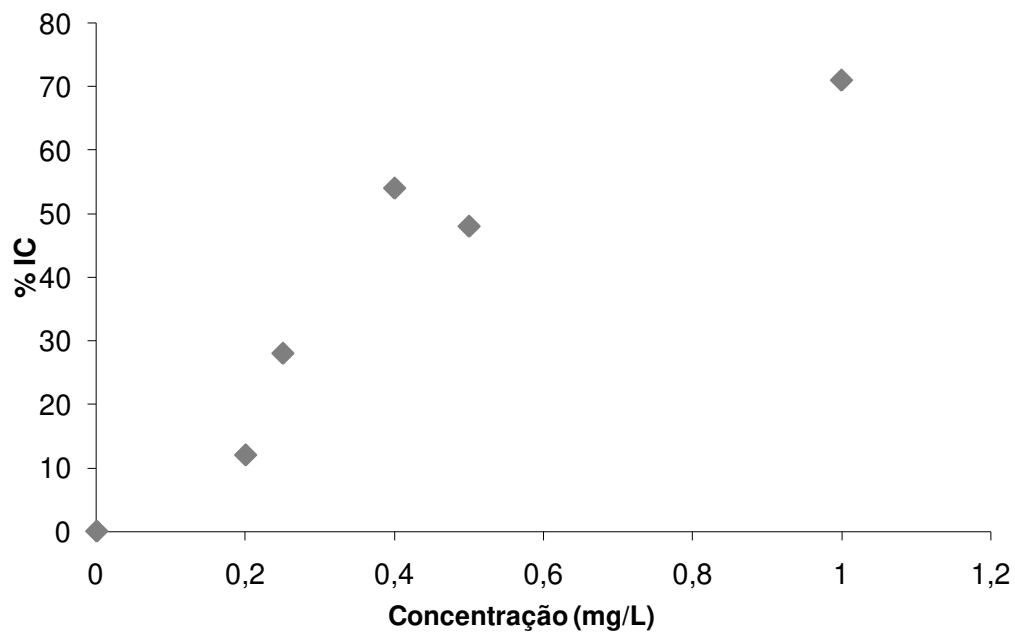


Figura 7.6: Cinética da lipoxigenase de soja em relação ao composto de referência NDGA.

7.2.2. Resultados da atividade antiinflamatória do extrato SFE de ginseng brasileiro, do óleo essencial e do extrato SFE de lavanda brasileira e do extrato SFE de quebra pedra.

Primeira	Referênci a	Lavanda brasileira/HD 10 g/L	Lavanda brasileira /SFE 4 g/L	Ginseng brasileiro 4 g/L
	0,494	0,827	0,596	0,644
	0,672	1,007	0,817	0,866
k(ref)	0,010	x	x	x
k(x)	x	0,010	0,012	0,012
%	x	x	-23,852	-24,076
Segunda	Referênci a	Lavanda brasileira/HD 0 g/L	Lavanda brasileira /SFE 4 g/L	Ginseng brasileiro 4 g/L
	0,558	0,934	0,652	0,722
	0,720	1,079	0,815	0,926
k(ref)	0,009	x	x	x
k(x)	x	0,008	0,009	0,011
%	x	10,640	x	-25,215
Terceira	Referênci a	Lavanda brasileira/HD 10 g/L	Lavanda brasileira /SFE 4 g/L	Ginseng brasileiro 10 g/L
	0,304	0,613	0,436	1,152
	0,429	0,731	0,574	1,330
k(ref)	0,007	x	x	x
k(x)	x	0,007	0,008	0,010
%	x		-10,040	-41,275
Média	x	0,008	x	x
Média k(x)	x	x	0,010	0,011
Média %		10,640	-16,94601214	-30,18876679

Primeira	Referência	<i>Quebra pedra 4g/L</i>
	0,4665	0,8005
	0,638	0,9869
k(ref)	0,010	x
k(x)	x	0,010
% IC	x	x
Segunda	Referência	<i>Quebra pedra 4g/L</i>
	0,4762	0,7135
	0,6739	0,9308
k(ref)	0,011	x
k(x)	x	0,012
% IC	x	-9,914
Terceira	Referência	<i>Quebra pedra 4g/L</i>
	0,3645	0,6287
	0,5634	0,8474
k(ref)	0,011	x
k(x)	x	0,012
% IC		-9,558
Média k(ref)	0,011	x
Média k(x)	x	0,012
Média % IC	x	-9,736093753
Quarta	Referência	<i>Quebra pedra 10g/L</i>
	0,4659	1,3308
	0,6481	1,5273
k(ref)	0,010	x

7.3. Atividade antioxidante pelo método DPPH

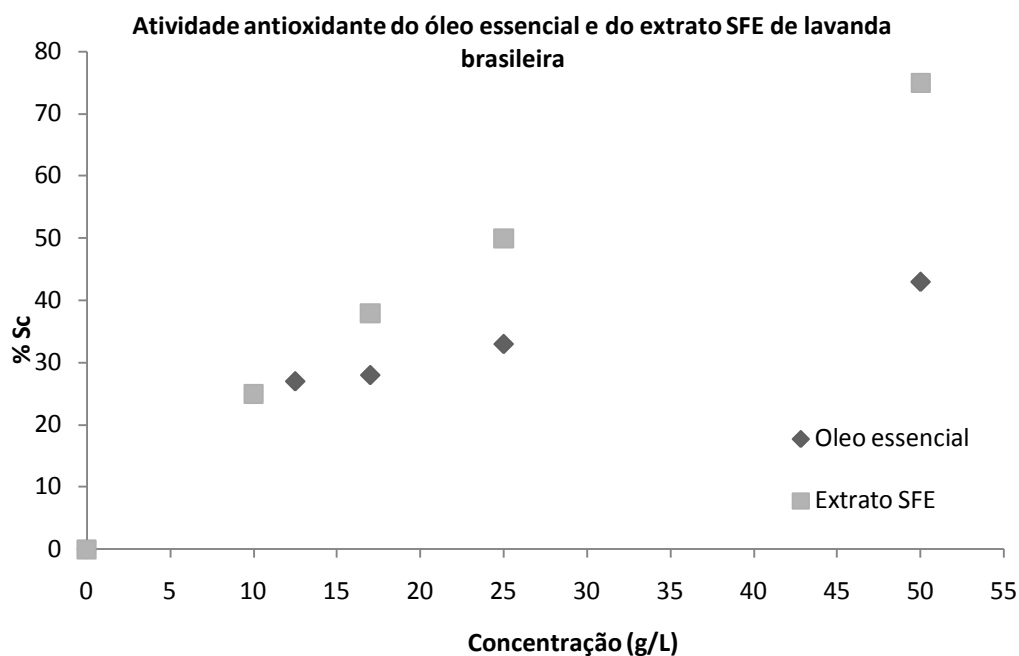


Figura 7.7: Atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato SFE de lavanda brasileira

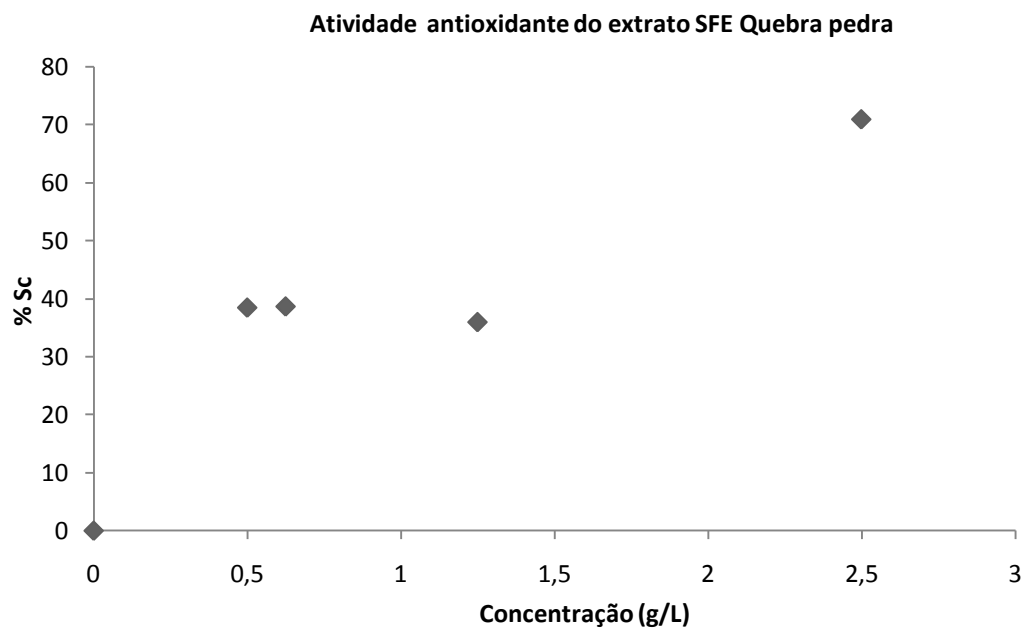


Figura 7.8: Atividade antioxidante do extrato SFE de quebra pedra.

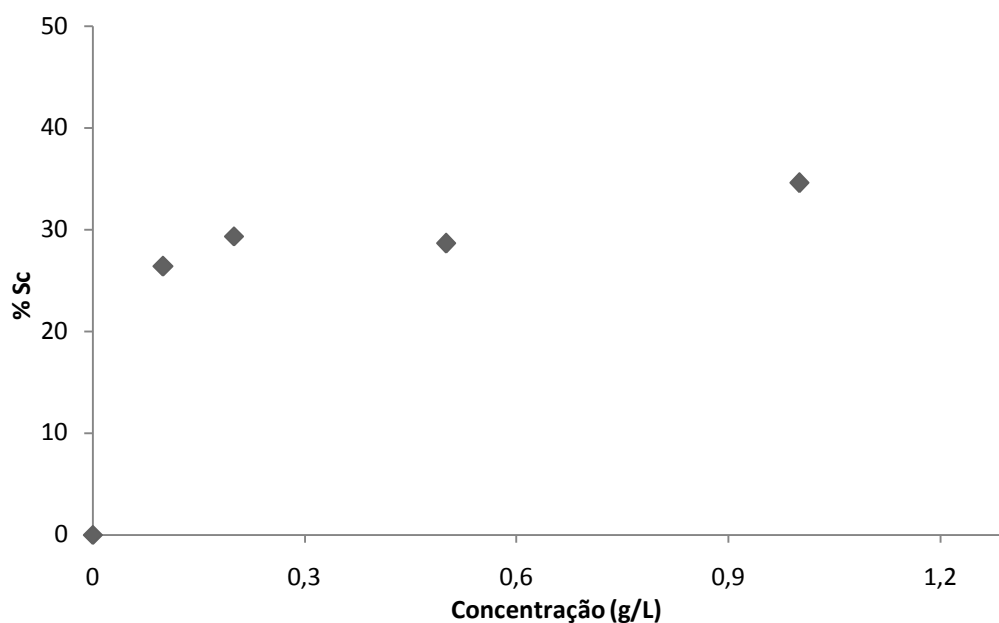


Figura 7.9: Atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato SFE de ginseng brasileiro.

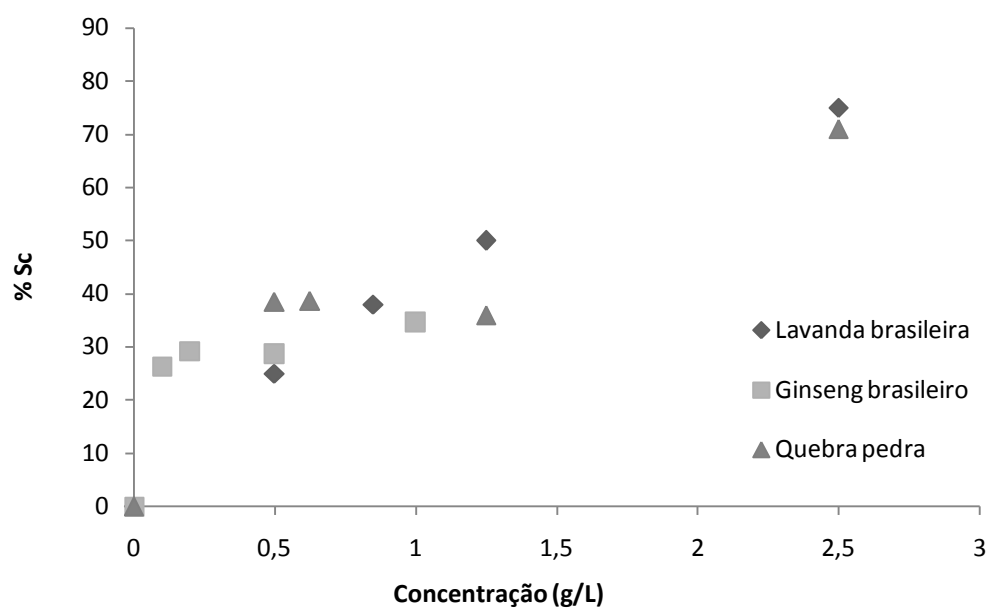


Figura 7.10: Gráfico da comparação entre as atividades antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro.

7.4. Resultados da atividade antioxidante dos extratos de lavanda brasileira, quebra pedra e ginseng brasileiro pelo método da reação acoplada do β -caroteno/ácido linolênico.

Tabela 7.4.1: Resultados da atividade antioxidante referentes à lavanda brasileira (Absorbância)

	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
Controle β -caroteno	0,665	0,563	0,460	0,406
40 °C/100 bar	0,867	0,735	0,643	0,605
40 °C/200 bar	0,866	0,787	0,725	0,680
40 °C/300 bar	0,851	0,738	0,655	0,558
50 °C/100 bar	0,821	0,667	0,575	0,544
50 °C/200 bar	1,645	1,556	1,490	1,156
50 °C/300 bar	1,04	1,13	1,17	1,09
controle	0,330	0,277	0,256	0,244
Metanol	0,458	0,437	0,404	0,393
Etanol	0,492	0,450	0,431	0,410
Hexano	0,551	0,505	0,483	0,460

Tabela 7.4.2: Resultados da atividade antioxidante referentes à lavanda brasileira (% de inibição).

	% Atividade antioxidante		
Tempo (h)	1	2	3
40 °C/100 bar	-29	-9	-1
40 °C/200 bar	74	31	28
40 °C/300 bar	-10	4	-13
50 °C/100 bar	-51	-20	-7
50 °C/200 bar	13	25	-89
50 °C/300 bar	188	164	119
Metanol	62	28	25
Etanol	22	18	5
Hexano	14	8	-5

Tabela 7.4.3: Resultados da atividade antioxidante referentes à quebra pedra (Absorbância)

	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
Controle β -caroteno	0,66	0,56	0,46	0,41
40 °C/100 bar	1,58	1,54	1,47	1,45
40 °C/200 bar	0,97	0,99	0,98	0,97
40 °C/300 bar	0,96	0,88	0,89	0,87
50 °C/100 bar	1,17	1,07	1,13	1,09
50 °C/200 bar	1,36	1,38	1,52	1,54
50 °C/300 bar	1,27	1,26	1,29	1,31
Controle β -caroteno	0,33	0,28	0,26	0,24
Metanol	0,55	0,53	0,51	0,48
Etanol	0,57	0,61	0,60	0,56
Hexano	0,68	0,75	0,76	0,75

Tabela 7.4.4: Resultados da atividade antioxidante referentes à quebra pedra (% de inibição)

	% Atividade antioxidante		
Tempo (h)			
40 °C/100 bar	59	46	49
40 °C/200 bar	118	103	100
40 °C/250 bar	53	42	37
40 °C/300 bar	21	66	64
50 °C/100 bar	-6	77	69
50 °C/200 bar	117	175	167
50 °C/300 bar	83	110	113
Metanol	60	48	17
Etanol	170	141	87
Hexano	217	202	177

Tabela 7.4.5: Resultados da atividade antioxidante referentes à ginseng brasileiro (Absorbância)

	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
Controle β -caroteno	0,665	0,563	0,460	0,406
40 °C/100 bar	0,718	0,655	0,583	0,546
40 °C/200 bar	0,863	0,775	0,680	0,618
40 °C/300 bar	1,079	1,041	0,994	0,948
50 °C/100 bar	1,816	1,776	1,772	1,753
50 °C/200 bar	1,351	1,407	1,438	1,472
50 °C/300 bar	1,869	1,993	2,030	2,064
Controle β -caroteno	0,3302	0,2769	0,2562	0,2436
Metanol	0,4037	0,4128	0,4052	0,3986
Etanol	0,481	0,4777	0,4566	0,437
Hexano	0,6396	0,6207	0,6129	0,5906

Tabela 7.4.6: Resultados da atividade antioxidante referentes à ginseng brasileiro (% de inibição)

	% Atividade antioxidante		
Tempo (h)	1	2	3
40 °C/100 bar	39	34	34
40 °C/150 bar	76	69	59
40 °C/200 bar	7	3	-2
40 °C/300 bar	62	59	50
50 °C/100 bar	60	79	75
50 °C/200 bar	155	143	147
50 °C/300 bar	246	184	167
Metanol	117	102	94
Etanol	94	67	49
Hexano	65	64	43

7.5. Resultados referentes curva de SFE do ginseng brasileiro

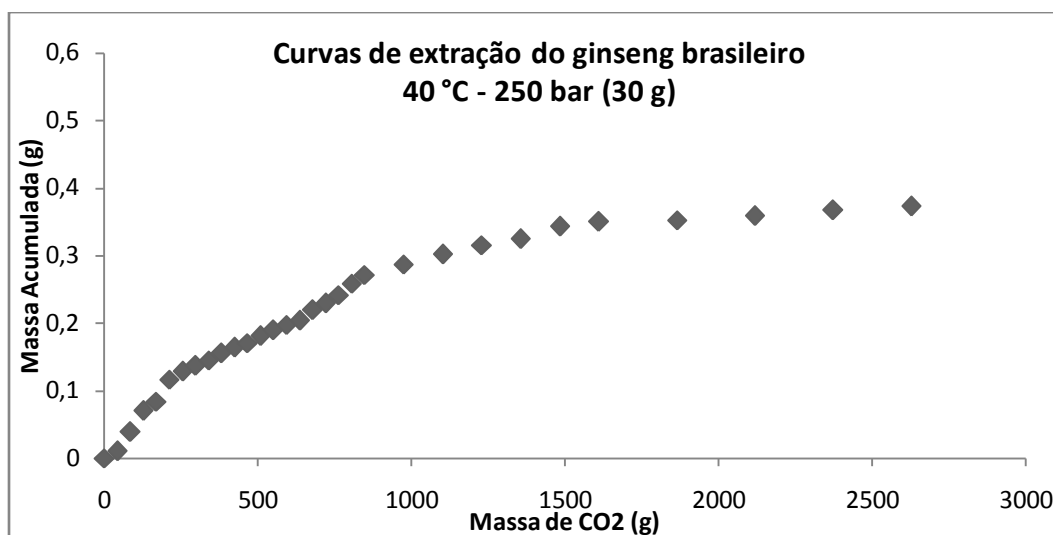


Figura 7.11(a): Curvas de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 30 gramas.

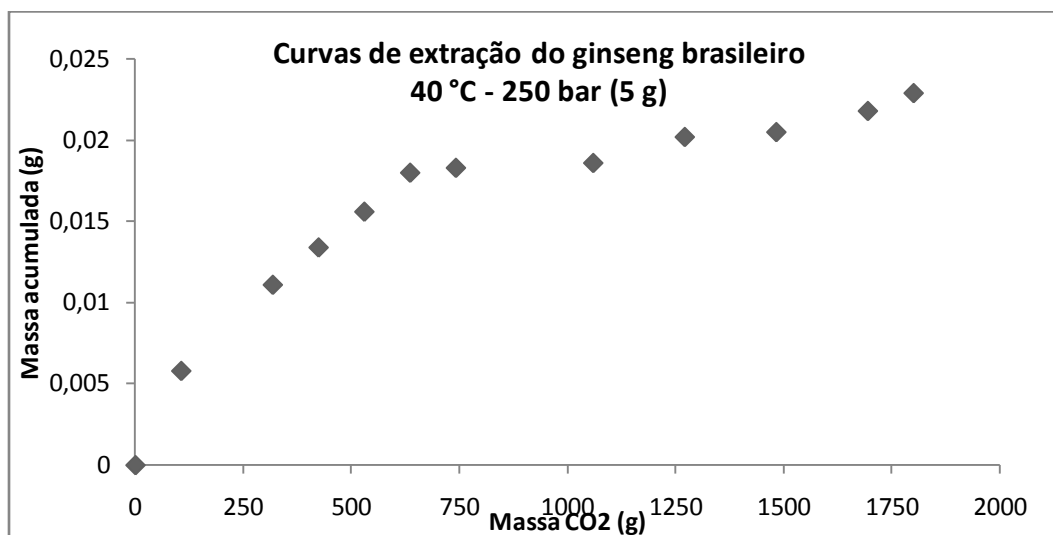


Figura 7.11(b): Curvas de extração do ginseng brasileiro obtida na condição de operação de 40 °C, 250 bar, $7,0 \times 10^{-5}$ kg/s e 5 gramas.

Programação do ajuste Linear – SAS Learning Edition

```
options ls=80 ps=50;
```

```
Title 'pfaffia L';
```

```
data EnsaioPP;
```

```
    input tmin mext;
```

```
    AL1=max(tmin-60,0);
```

```
    AL2=max(tmin-260,0);
```

```
cards;
```

```
10      0.0097
20      0.0362
30      0.0655
40      0.0783
50      0.1086
60      0.1196
70      0.1277
80      0.1352
90      0.1452
10      0 0.1527
110     0.1593
120     0.1690
130     0.1771
140     0.1845
150     0.1903
160     0.2049
170     0.2140
180     0.2254
190     0.2409
200     0.2531
230     0.2676
260     0.2815
290     0.2940
320     0.3029
350     0.3200
380     0.3270
440     0.3290
500     0.3347
560     0.3430
620     0.3481
```

```
Proc Reg;
```

```
    Model mext = tmin AL1 AL2;
```

```
    Output out = a p = mextthat r = Mres;
```

```
Proc Print;
```

```
Proc gplot; axis order=(0 to 0.40 by 0.05);
```

```
    Plot mext*tmin/legend overlay vaxis=axis1;
```

```
    Plot Mres*mextthat;
```

```
Proc gplot;
```

```
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;
```

```
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis=axis1; Plot2 mextthat*tmin/legend overlay vaxis=axis1;
```

```
Run;
```

Programação do ajuste Não Linear – SAS Learning Edition

```

options ls=80 ps=50;
Title 'pfaffia NL';
data OEC1;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-100,0);
AL2 = max(tmin-300,0);
Cards;
10      .0097
20      0.0362
30      0.0655
40      0.0783
50      0.1086
60      0.1196
70      0.1277
80      0.1352
90      0.1452
100     0.1527
110     0.1593
120     0.1690
130     0.1771
140     0.1845
150     0.1903
160     0.2049
170     0.2140
180     0.2254
190     0.2409
200     0.2531
230     .2676
260     0.2815
290     0.2940
320     0.3029
350     0.3200
380     0.3270
440     0.3290
500     0.3347
560     0.3430
620     0.3481
Proc Nlin;
parms
b0 = -0.00429
b1 = 0.00206
b2 = -0.00118
b3 = -0.00071153
knot1 = 100
knot2 = 300;
AL1 = max(tmin-knot1,0);
AL2 = max(tmin-knot2,0);
Model mext = b0 + b1*tmin + b2*AL1 + b3*AL2;
Output out = a p=mexthat r=Mres;
Axis order = (0 to 0.40 by 0.05);

```

```

Proc gplot;
Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 mexthat*tmin/legend overlay vaxis = axis1;

```

Run;

Saída do programa SAS Learning Edition – Ajuste não linear
Ensaio 40 °C, 250 bar e 30 gramas de matéria-prima (ginseng brasileiro)

The NLIN Procedure
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase

Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	Sum of Squares
0	-0.00429	0.00206	-0.00118	-0.00071	100.0	300.0	0.0737
1	0.00805	0.00167	-0.00088	-0.00067	84.9994	291.1	0.00223
2	0.00321	0.00182	-0.00102	-0.00068	70.0098	289.4	0.00154
3	-0.00261	0.00201	-0.00114	-0.00072	58.8952	267.7	0.00106
4	-0.00746	0.00221	-0.00134	-0.00072	53.9918	268.6	0.000939
5	-0.0116	0.00237	-0.00150	-0.00072	51.6414	269.4	0.000827
6	-0.0123	0.00240	-0.00153	-0.00072	51.5781	269.5	0.000816
7	-0.0123	0.00240	-0.00153	-0.00072	51.5773	269.5	0.000816
8	-0.0123	0.00240	-0.00153	-0.00072	51.5773	269.5	0.000816

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	8
Subiterations	1

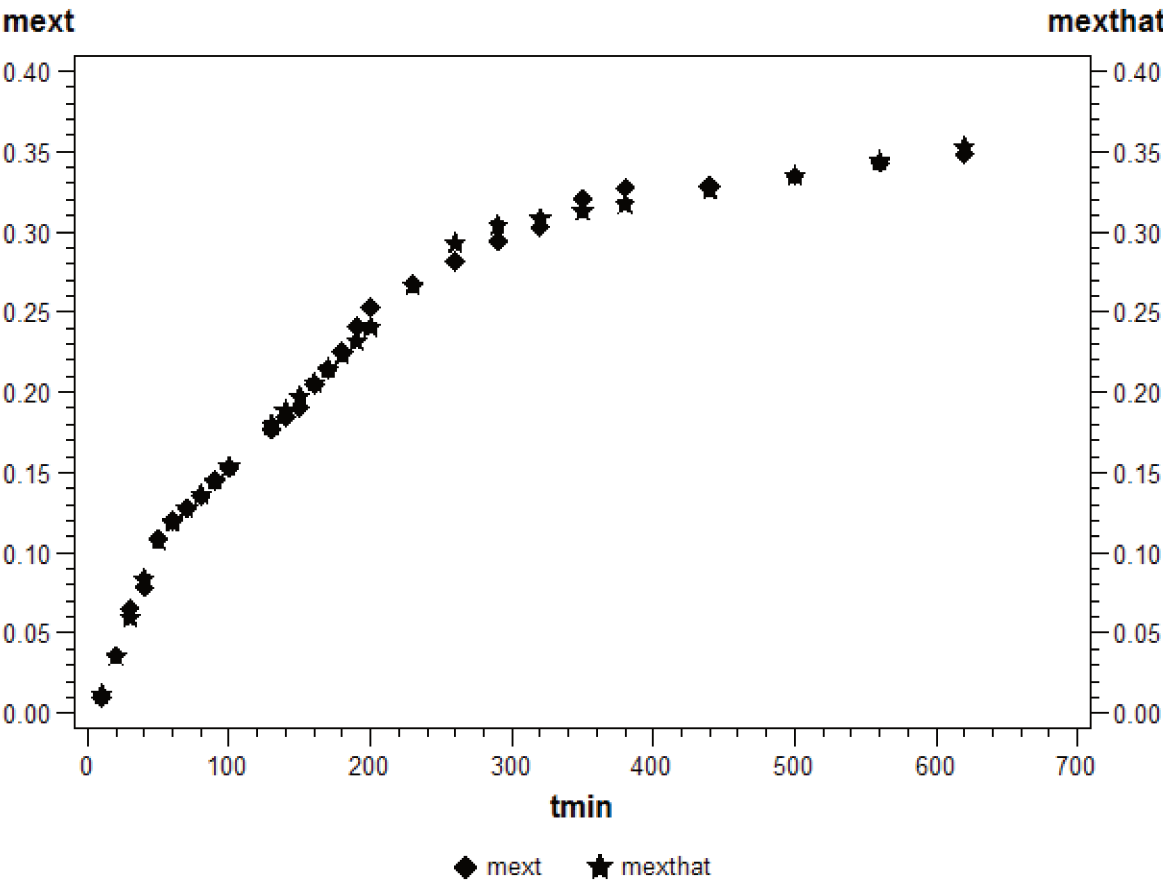
Estimation Summary

Average Subiterations	0.125
R	2.878E-8
PPC(b0)	1.333E-8
RPC(b0)	0.000011
Object	5.5E-10
Objective	0.000816
Observations Read	29
Observations Used	28
Observations Missing	1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	5	0.2675	0.0535	1442.51	<.0001
Error	22	0.000816	0.000037		
Corrected Total	27	0.2683			
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	-0.0123	0.00639	-0.0256		0.000936
b1	0.00240	0.000193	0.00200		0.00280
b2	-0.00153	0.000194	-0.00193		-0.00113
b3	-0.00072	0.000033	-0.00079		-0.00065
knot1	51.5773	3.8098	43.6764		59.4783
knot2	269.5	7.3576	254.2		284.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8956034	0.0000000	0.4456240	0.0000000
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.9901268	-0.0000000	-0.7129258	-0.0000000
b2	0.8956034	-0.9901268	1.0000000	-0.1142135	0.6431013	-0.0879141
b3	0.0000000	-0.0000000	-0.1142135	1.0000000	0.3649548	0.1657938
knot1	0.4456240	-0.7129258	0.6431013	0.3649548	1.0000000	0.2010383
knot2	0.0000000	-0.0000000	-0.0879141	0.1657938	0.2010383	1.0000000



7.6. AS Curvas padrão do estigmasterol e do β -sitosterol são apresentadas na Figura 7.613(a) e 7.13(b).

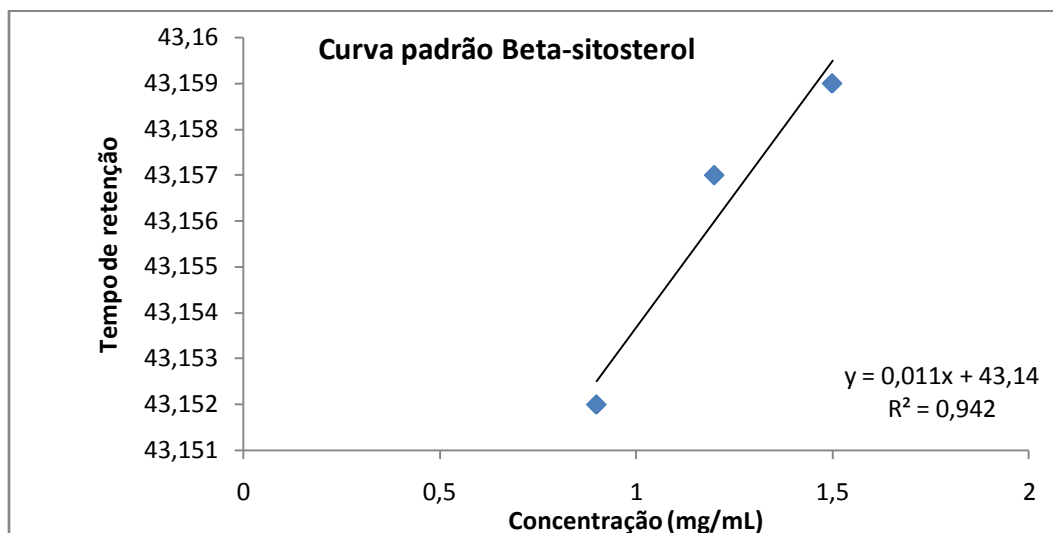


Figura 7.13(a): Resultados das curvas padrão do β -sitosterol.

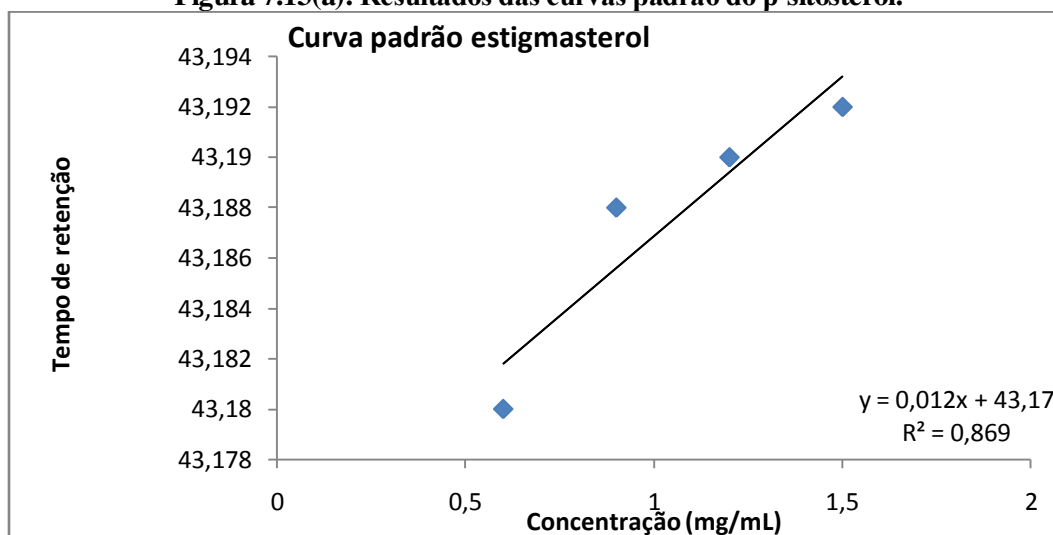


Figura 7.13(b): Resultados das curvas padrão do estigmasterol.

Como os tempos de retenção dos dois compostos de referência foram muito próximos, ficou impossível afirmar se os dois compostos estão presentes nos extratos SFE de *ginseng* brasileiro, ou se somente um deles está presente. Os extratos obtidos nas condições de extração de (30 °C/100 bar, 30 °C/150 bar, 30 °C/200 bar, 30 °C/250 bar, 30 °C/300 bar, 40 °C/100 bar, 40 °C/150 bar, 40 °C/200 bar, 40 °C/250 bar, 40 °C/300 bar) foram analisados quanto à presença ou não de um composto que apresenta-se o tempo de retenção em torno de 43 minutos.

Tabela 7.6.1: Extratos que apresentaram o tempo de retenção em torno de 43 minutos.

Condição de Operação (T °C e P bar)	Tempo de retenção
30 °C/100 bar	-
30 °C/150 bar	-
30 °C/200 bar	-
30 °C/250 bar	43,108
30 °C/300 bar	-
40 °C/100 bar	-
40°C/150bar	42,344
40°C/200bar	43,131
40°C/250bar	43,130
40°C/300bar	43,131

Na temperatura de 30 °C somente o extrato obtido a 250 bar apresentou um composto com tempo de retenção de 43,108 minutos, já para temperatura de 40 °C somente na pressão de 100 bar não foi observado nenhum composto com tempo de retenção em torno de 43 minutos, novamente confirmando a seletividade do processo SFE de acordo com a condição de operação.