UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA DE FOLHAS SECAS DE *Senna reticulata*

Max Adilson Lima Costa

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do titulo de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Costa, Max Adilson Lima
C823e Extração de compostos com ação antifúngica de folhas secas de senna reticulata / Max Adilson Lima Costa. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Everson Alves Miranda, Paulo de Tarso Vieira e Rosa.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração. 2. Extração supercrítica. 3. Antifúngicos. I. Miranda, Everson Alves. II. Rosa, Paulo de Tarso Vieira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Extraction of antifungal compounds from dried leaves of senna reticulata
Palavras-chave em Inglês: Extraction, Supercritical extraction, Antifungal
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Ademir Castro e Silva, Érika Ohta Watanabe
Data da defesa: 08/07/2011
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Max Adilson Lima Costa e aprovada em 08 de julho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

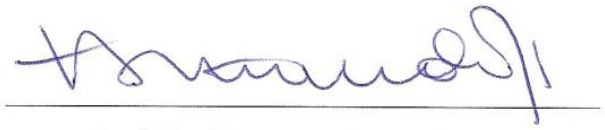
Prof. Dr. Everson Alves Miranda - Orientador

Prof. Dr. Ademir Castro e Silva (titular)

Érika Ohta Watanabe

Profa. Dra. Érika Ohta Watanabe (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Manoel e Maria Amélia, pelas orações e ensinamentos.

Aos meus irmãos Zelinda, Zélia, Manoel Augusto, Marcos, Zeila e Saskia, pela confiança depositada.

A minha esposa Eliziane e meus filhos Max Jr. e Erick, pela compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Pensei que seria fácil, mas agora vejo o quanto é difícil enumerar as pessoas a agradecer dado o grande número delas que tiveram participação direta e indireta na realização dessa prazerosa tarefa.

Agradeço primeiramente a Deus pelas maravilhas realizadas em minha vida e por segurar a minha mão nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Obrigado, Senhor, porque por pura piedade me trouxe de tão longe e me deu a oportunidade de realizar meus sonhos.

Ao meu orientador Everson Alves Miranda, que me aceitou como orientado sem mesmo me conhecer, pela paciência, amizade, competência e profissionalismo com que conduziu este trabalho.

Ao professor Paulo de Tarso Vieira e Rosa do Laboratório de Tecnologias Supercríticas – LTS, do IQ/UNICAMP, que co-orientou esse trabalho, possibilitou os estudos com fluido supercrítico e por toda a disponibilidade em colaborar.

À doutoranda Fernanda Pereira Barbosa do LTS, do IQ/UNICAMP, por toda sua, paciente, ajuda durante o processo de extração supercrítica além de sua grata amizade.

À professora Kátia Tannous do Laboratório de Tecnologia de Partículas e Processos Multifásicos – LaProM, da FEQ/UNICAMP e ao mestrando Francisco Otávio Miranda Farias pela ajuda na caracterização granulométrica do material.

A todos os colegas e amigos do LEBp, LIMBIO e LEBC por toda ajuda disponibilizada.

À direção do Centro de estudos Superiores de Parintins-UEA, aos professores Ademir Castro e Silva e Naimy Castro e aos colegas dos laboratórios de Química e Biologia deste centro, pela ajuda na realização dos testes antifúngicos.

Ao Sr. Sebastião Teixeira, proprietário da empresa “A Regional”, responsável pela trituração do material.

Ao professor Alberto Marques, idealizador do Programa MINTER/DINTER-UEA/UNICAMP, sem o qual não teríamos a oportunidade de estar aqui.

À Coordenação de Pós-graduação e todos os professores da Faculdade de Engenharia Química - FEQ/UNICAMP que abraçaram o Programa MINTER/DINTER – UEA/UNICAMP.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela bolsa de mestrado e FAPESP, CAPES e CNPq, responsáveis pelo aporte financeiro do LEBp e LTS.

RESUMO

Madeiras sofrem ataques de fungos que comprometem a sua resistência e valor de mercado, levando a indústria madeireira a buscar fungicidas capazes de reduzir as perdas no setor. Nesse contexto, a espécie *Senna reticulata* aparece como possibilidade promissora, pois estudos preliminares revelaram a existência de substâncias, ainda não identificadas, em diferentes partes dessa planta com atividade fungicida e/ou fungistática. Assim, o presente trabalho objetivou a obtenção de compostos antifúngicos a partir de folhas secas de *S. reticulata* por extração convencional e supercrítica. Estudou-se o efeito da temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente (água, etanol e composição destes) sobre a concentração de compostos fenólicos e proteínas nos extratos produzidos em tanque agitado. Na extração supercrítica, estudou-se o efeito da pressão e da temperatura sobre a concentração de compostos fenólicos nos extratos. Na extração convencional a composição do solvente, temperatura e pH apresentaram efeito sobre a concentração de compostos fenólicos e proteínas nos extratos. Para a extração supercrítica, o rendimento dos extratos foi afetado pela pressão do sistema. No entanto, o extrato com o menor rendimento em massa teve o maior teor de compostos fenólicos. Nos testes de atividade antifúngica, todos os extratos convencionais apresentaram ação contra os fungos utilizados. Os extratos supercríticos em baixas concentrações (baixas concentrações foram necessárias devido à utilização de etanol como solvente/diluente) apresentaram pequena ou nenhuma atividade sobre o crescimento dos fungos. Portanto, a extração convencional mostrou ser uma técnica promissora para a obtenção de extratos com efeito antifúngico de *S. reticulata* por apresentar alto rendimento, atividade antifúngica considerável, tempo de extração curto.

Palavras-chave: extração, extração supercrítica, antifúngicos.

ABSTRACT

Wood suffers fungal attacks which undertake its resistance and market value, taking the wood industry to search for fungicides capable of to reduce losses in the sector. In this context, *Senna reticulata* appears as a promising possibility because preliminary studies revealed the existence of yet unidentified substances from various parts of this plant with fungicide and/or fungistatic activity. Thus, this work aimed to obtain antifungal compounds from dried leaves of *S. reticulata* by conventional and supercritical extraction. We studied the effect of temperature, pH, ionic strength, and type of solvent (water, ethanol and composition of this two) on the concentration of phenolic compounds and proteins in the extracts produced using stirred tanks. In the supercritical extraction we studied the effect of pressure and temperature on the phenolic compounds extraction. In the conventional extraction the solvent composition, temperature, and pH showed effect on the concentration of phenolic compounds and proteins in the extracts. For the supercritical extraction, yield of extracts was affected by the pressure of the system. However, the extract with the lowest yield in mass, had the highest content of phenolic compounds. In tests for antifungal activity, all conventional extracts showed activity against the fungi used. Supercritical extracts at low concentrations (low concentration required due to the ethanol used as a solvent/diluents) showed small and no activity on fungal growth. Therefore, the conventional extraction showed to be as a promising technique for obtaining extracts with antifungal effect from *S. reticulata* because of high yield, considerable antifungal activity, and short extraction time.

Keywords: extraction, supercritical extraction, antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Diagrama esquemático que representa as quatro etapas do plano de trabalho em desenvolvimento..... 5

Figura 2.1: Espécie *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (conhecida vulgarmente como mata pasto)..... 8

Figura 2.2: Representação esquemática de uma célula vegetal: lamela média (LM); parede primária (P); parede secundária externa (S1); parede secundária média (S2); parede secundária interna (S3); lúmen (L). Fonte: CARVALHO et al., 2009..... 12

Figura 2.3: Diagrama esquemático do gráfico de pressão e temperatura para um composto puro..... 23

Figura 2.4: Densidade do CO2 supercrítico em função da temperatura e pressão (adaptado de ANGUS et al., 1976)..... 24

Figura 3.1: Localização da área de coleta das folhas de *Senna reticulata*, Parintins-AM. Fonte: Google imagens.com..... 27

Figura 3.2: Desenho esquemático do equipamento montado para os ensaios de extrações convencionais..... 29

Figura 3.3: Representação esquemática do sistema de extração com fluído supercrítico montado no Laboratório de Tecnologias Supercríticas do Instituto de Química da UNICAMP..... 30

Figura 4.1: Distribuição granulométrica de folhas trituradas de *S. reticulata* a partir de dados obtidos pelo de peneiramento com peneiras de 10, 14, 20, 28, 35, 48 e 65 mesh..... 41

Figura 4.2: Amostras de folhas de *S. reticulata*: face adaxial (**a**); face abaxial (**b**); folíolo (**c**) folíolos em fase de secagem (**d**)..... 42

Figura 4.3: Concentrações de proteínas (○) e compostos fenólicos (●) para a determinação do tempo de extração convencional. As barras de erro representam o desvio padrão para n=3. Extração com água a 25°C e pH 7,0..... 43

Figura 4.4: Gráficos de Pareto das variáveis de concentração de compostos fenólicos **(a)** e de proteínas **(b)**, presentes nos extratos aquosos de folhas de *S. reticulata*..... 45

Figura 4.5: Superfície de resposta da concentração de compostos fenólicos em função das variáveis: temperatura e pH, para a extração aquosa de folhas de *S. reticulata*..... 47

Figura 4.6: Superfície de resposta da concentração de proteínas em função das variáveis: temperatura e pH para a extração aquosa de folhas de *S. reticulata*..... 48

Figura 4.7: Teor de compostos fenólicos (○) e proteínas (●) em função da concentração de etanol na solução extratora. Experimentos realizados em duplicata com amplitude máxima para os compostos fenólicos 0,08 g/L e para proteínas 0,09 g/L. Temperatura, 40°C e pH = 9,0..... 49

Figura 4.8: Rendimento em massa de extrato por massa de folhas com a variação da densidade do CO_2 na extração supercrítica das folhas de *S. reticulata*..... 52

Figura 4.9: Análise de Pareto dos dados de rendimento em massa da extração de *S. reticulata* com CO_2 supercrítico..... 52

Figura 4.10: Análise de Pareto dos dados de teor de compostos fenólicos nos extratos de *S. reticulata* obtidos com CO_2 supercrítico..... 53

Figura 4.11: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40°C, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 1,0 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato B; (●) controle geral. Teste realizado em triplicata com amplitude máxima de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,4 cm)..... 59

Figura 4.12: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato C (extração a 10°C, pH 5,0 com água) na concentração 1,0 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; com amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato C (amplitude de 0,4 cm)..... 60

Figura 4.13: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40°C, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm)..... 63

Figura 4.14: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40°C, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-03. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm)..... 63

Figura 4.15: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40°C, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FV-06. (+) teste com o extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm)..... 64

Figura 4.16: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato C (extração a 10°C, pH 5,0 com água) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato C (amplitude de 0,3 cm)..... 65

Figura 4.17: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato D (extração a 10°C, pH 9,0 com água) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FV-06. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato D (amplitude de 0,4 cm)..... 66

Figura 4.18: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato I (extração a 40°C e 100 bar) na concentração 1,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste co extrato I; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato I (amplitude de 0,4 cm)..... 68

Figura 4.19: Avanço da fronteira micelial no teste com o extrato L (extração a 60°C e 300 bar) na concentração 5,00 g/L frente a cepa fúngica FI-03. (+) teste com extrato L; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato L (amplitude de 0,3 cm)..... 70

Figura A.1: Curva padrão para a determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford..... 85

Figura A.2: Curva padrão para a determinação da concentração de compostos fenólicos pelo método de Price e Butler..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Classes de compostos fenólicos em plantas..... 14

Tabela 2.2: Propriedades físico-químicas de alguns dos solventes usados na extração de produtos naturais..... 21

Tabela 2.3: Valores característicos para o estado gasoso, líquido e fluido supercrítico.... 23

Tabela 2.4: Dados de temperatua e pressão crítica de algums solventes..... 25

Tabela 3.1: Planejamento fatorial 2^3 para extrações em reator agitado convencional..... 36

Tabela 3.2: Planejamento experimental fatorial 2^2 para extrações com CO_2 supercrítico..... 37

Tabela 4.1: Distribuição granulométrica das folhas trituradas de *S. reticulata*..... 41

Tabela 4.2: Resultados dos ensaios de extração convencional de folhas de *S. reticulata* em tanque agitado utilizando água como solvente segundo o planejamento experimental fatorial do tipo 2^3 com níveis +1, -1 e 3 pontos centrais..... 44

Tabela 4.3: Resultados para extração de *S. reticulata* com CO_2 supercrítico..... 50

Tabela 4.4: Resultados em teor e rendimento de fenólicos para as extrações de *S. reticulata*..... 53

Tabela 4.5: Resultados de rendimento dos extratos convencionais obtidos em escala preparativa para os testes de atividade antifúngica..... 54

Tabela 4.6: Resultados de rendimento dos extratos supercríticos obtidos em escala preparativa para os testes de atividade antifúngica..... 55

Tabela 4.7: Concentração dos extratos convencionais nas soluções utilizadas nos testes de atividade antifúngica..... 56

Tabela 4.8: Concentração dos extratos supercríticos nas soluções utilizadas nos testes de atividade antifúngica..... 57

Tabela 4.9: Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) dos extratos convencionais de folhas de *S. reticulata* na concentração 1,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06..... 58

Tabela 4.10: Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) dos extratos convencionais de folhas de *S. reticulata* na concentração 10,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06..... 62

Tabela 4.11: Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) dos extratos supercríticos de folhas de *Senna reticulata* na concentração 1,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06..... 67

Tabela 4.12: Percentual de Inibição de Crescimento (PIC) dos extratos supercríticos de folhas de *Senna reticulata* na concentração 5,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06..... 69

NOMENCLATURA

Símbolos latinos

C	concentração de soluto
t	tempo
x	caminho de difusão
D	difusividade
T	temperatura
T_c	temperatura crítica
P_c	pressão crítica
TU	teor de umidade
PU	massa úmida
PS	massa seca
$\bar{d}_p$	diâmetro médio de peneira
$\bar{d}_{pi}$	diâmetro médio de peneira equivalente
$\bar{d}_{pi+1}$	diâmetro médio de peneira equivalente subseqüente
r	rendimento
m_e	massa de extrato obtido
m_i	massa seca de material triturado colocado na coluna de extração
P	pressão
R	constante universal dos gases
a	parâmetro de atração de Peng e Robinson
b	co-volume de Peng e Robinson
D_c	diâmetro da colônia na placa controle
D_t	diâmetro da colônia na placa teste
MM_{C0_2}	massa molar de CO_2

Símbolos gregos

η	coeficiente de viscosidade dinâmica
v	volume molar
ρ_{CO_2}	Densidade do CO_2
v_{CO_2}	volume molar do CO_2

Siglas

LM	lamela média
P	parede primária
S1	parede secundária externa
S2	parede secundária média
S3	parede secundária interna
L	lúmem
SCF	extração por fluido supercrítico
BSA	albumina de soro bovino
BDA	batata, dextrose e Agar
FI-03	fungo de igapó número 3
FI-09	fungo de igapó número 9
FV-06	fungo de várzea número 6
PIC	percentual de inibição de crescimento
LBQ/CESP	Laboratório de Biologia e Química do Centro de Estudos Superiores de Parintins

INTRODUÇÃO

Dentre os produtos oferecidos pela floresta amazônica, a madeira ocupa lugar de destaque e sua extração constitui-se em uma das mais tradicionais e importantes atividades econômicas da região (BRASIL, 2008). Desde o início da colonização até o século XX, a extração da madeira era feita nas áreas de várzea, mas a partir de 1970 essa atividade atingiu também as áreas de terra firme, facilitada pela abertura de estradas que permitiram o acesso das madeireiras ao interior da floresta (BARROS e UHL, 1995).

No ano de 2009, as 2.226 empresas madeireiras em atividade na Amazônia retiraram da floresta cerca de 3,5 milhões de árvores, produzindo 14,2 milhões de metros cúbicos de madeira em tora nativa gerando aproximadamente 204 mil empregos diretos e indiretos. Porém, quando comparado aos anos anteriores, as exportações de madeiras da Amazônia diminuíram de 36 para apenas 21% entre os anos de 2004 e 2009, respectivamente em decorrência da crise econômica e a valorização da moeda brasileira frente ao dólar e ao euro além do aumento do consumo interno (IMAZON, 2010).

Na busca do aumento de mercado, é necessário não apenas o aumento na produção, mas também uma melhora na qualidade da madeira para atender as exigências do mercado interno e externo, que é sempre mais rigoroso (REDIVO et al., 2010). Um dos pontos para atingir esse objetivo reside no melhor aproveitamento da madeira, ou seja, a maior obtenção em metro cúbico de madeira útil por árvore derrubada, evitando o desperdício entre a retirada das árvores e o beneficiamento, diminuindo as perdas para a indústria madeireira e a pressão sobre a floresta, imposta pelo desmatamento (AMARAL et al., 1998).

São vários os fatores pelos quais a madeira tanto como produto bruto ou bem de consumo pode ser deteriorada ou destruída. Mendes (1988) classificou como as principais causas:

a) O desgaste mecânico, decorrente do movimento contínuo como no caso de escadas, pontes, dormentes, etc;

b) A degradação física, tendo o fogo como o seu principal agente;

c) A degradação química, causada pelo contato da madeira com substâncias químicas;

d) A degradação biológica, causada por organismos xilófagos como fungos, insetos, moluscos, crustáceos e bactérias, dos quais, fungos e insetos são os mais importantes, responsáveis por grandes perdas em vários tipos de produtos florestais.

Fungos em geral são organismos aclorofilados e por isso são incapazes de produzir seu próprio alimento; na sua grande maioria são aeróbios, apesar de em poucos casos se desenvolverem em lugares com baixa concentração de oxigênio ou até mesmo na ausência deste. Fungos precisam de condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, aeração e ausência de substâncias tóxicas para o seu desenvolvimento e proliferação (GUIA DA MADEIRA, 2010).

Os fungos xilófagos usam os polímeros da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) como fonte de nutrientes propiciando a liberação de enzimas capazes de hidrolisar seus componentes. Esses ataques podem resultar em simples manchas ou até a decomposição total da madeira (MENDES, 1988).

Oliveira et al. (1986) dividem os ataques dos fungos xilófagos em cinco categorias: mancha, bolor, podridão branca, podridão parda e podridão mole. As três últimas categorias de ataques fúngicos podem ser credenciadas aos chamados fungos apodrecedores e são responsáveis pela perda da resistência da madeira e sua conseqüente deterioração.

Sendo os fungos responsáveis por grande parte dos prejuízos da indústria madeireira, faz-se necessário um investimento constante em produtos e estratégias de controle desses organismos como forma de diminuir essas perdas. O uso de biocidas tem crescido muito nos últimos anos em todo o planeta, mas ao mesmo tempo, aumenta também a pressão dos órgãos fiscalizadores com relação aos riscos ambientais e à eficácia desses produtos, restringindo ou proibindo o uso de biocidas tradicionalmente usados (BRAND et al., 2006). Os danos ambientais e à saúde humana ocasionados pela utilização desses produtos têm preocupado o mundo e despertado o interesse por pesquisas que buscam desenvolver produtos naturais para o tratamento da madeira (ONUORAH, 2000).

A madeira pode conter, entre os seus constituintes, substâncias que, dependendo do tipo e da quantidade, podem favorecer ou inibir a presença desses organismos. As substâncias tóxicas aos fungos podem ser produzidas naturalmente pelas próprias plantas ou por outros microorganismos ou ainda introduzidas pelo homem (GUIA DA MADEIRA, 2010).

Além da celulose, da hemicelulose e da lignina, as plantas apresentam pequenas quantidades de metabólitos secundários, chamados de extrativos, que são responsáveis por sua resistência natural ao ataque de microrganismos. Esses componentes podem ser extraídos por diversas técnicas, tradicionalmente utilizando água e solventes orgânicos como etanol, acetona, diclorometano, metanol entre outros e, mais recentemente, o CO_2 supercrítico (OLIVEIRA et al., 2005).

Entre as espécies de plantas existem variações da quantidade e também na qualidade dos extrativos e, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, pode haver variação no teor desses compostos (OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Pettersen (1984) para madeiras de clima temperado os extrativos representam de 4 a 10% da massa seca, enquanto que em madeiras tropicais esse percentual pode chegar a 20%. Apesar de não ter função direta no desenvolvimento dos vegetais, os metabólitos secundários contribuem para a proteção das plantas, agindo contra o ataque de organismos patógenos como os fungos (ALVES, 2001).

Fenner et al. (2006), em um trabalho de pesquisa bibliográfica feito em publicações a partir de 1840, contabilizaram 409 espécies vegetais utilizadas no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas. Tais espécies são pertencentes a 98 famílias, das quais se destacaram as famílias *Fabaceae* (Leguminosae) com 30 citações e *Asteraceae* com 29 citações. Este resultado é importante, pois em estudos posteriores de avaliação de atividade antifúngica, pode ser dada prioridade às espécies pertencentes a estas famílias.

Esses extrativos têm massa molecular e natureza química variada, englobando muitas classes diferentes de compostos orgânicos (PETTERSEN, 1984). Particularmente os metabólitos secundários como terpenóides, quinonas, fenóis, flavonóides, alcalóides e taninos têm papel relevante no mecanismo de resistência à patógenos devido às suas propriedades fungicidas (GÓMEZ-GARIBAY et al., 1990).

Estudos realizados por Castro (2005) e Costa et al. (2008) com extratos de *Senna reticulata*, leguminosa muito abundante na região amazônica, frente a fungos xilófagos sugerem a presença de compostos com ação antifúngica nesta planta.

Costa et al. (2008) trabalhando com extratos etanólicos da casca do caule, caule e fruto de *S. reticulata* obtidos por maceração a frio, na concentração de 1,00 e 10,00 g/L em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), observaram a inibição parcial e total por estes extratos de

três espécies de fungos xilófagos amazônicos, indicando a presença de compostos com atividade fungicida e ou fungistática nestas partes da planta.

No trabalho de avaliação dos extratos das folhas de *S. reticulata* contra fungos xilófagos realizado por Castro (2005), os testes em meio de cultura com o fungo *Panus crinitus* mostraram que os extratos brutos obtidos com diferentes solventes orgânicos, assim como suas frações e sub-frações, apresentaram resultados inibitórios ao crescimento micelial.

Ainda segundo Castro (2005) a escolha da espécie *S. reticulata* para o seu estudo baseou-se no seu uso contra micoses superficiais, relatados por ribeirinhos da região amazônica.

1.1 Colocação do problema e objetivo

A atividade madeireira na Amazônia é de importância econômica histórica e é inevitável que ela esteja sempre presente mesmo dentro de um quadro de preservação, situação tão desejada, através de práticas sustentáveis. No entanto, o valor agregado e mercado desta produção madeireira têm sido prejudicados pela falta de qualidade do produto, causado em parte pelo ataque de fungos, tornando o combate a tais microrganismos um desafio tecnológico de relevância.

A existência de substâncias ainda não identificadas de várias partes da espécie *S. reticulata* (vulgarmente conhecida com mata-pasto) com ação fungicida e/ou fungistática foi verificada em experimentos preliminares de extração realizados por Castro (2005) e Costa et al. (2008). No entanto, estes estudos foram realizados em sistemas estáticos, sem variação e controle preciso de temperatura, utilizando hexano, acetato de etila, etanol e metanol como solventes. Baixos rendimentos foram relatados e os tempos de extração foram relativamente longos, da ordem de horas e até mesmo dias. Faz-se, então, necessário um estudo rigoroso desta extração para que se possa testar de forma definitiva a potencialidade destes extratos no combate aos fungos xilófagos e, assim, abrir a possibilidade de um tratamento da madeira produzida na região que preserve a sua qualidade inicial.

Portanto, o presente trabalho objetivou estudar de forma sistemática a obtenção de extratos de folhas secas de *S. reticulata*, através de extrações hidroalcoólicas em tanque agitado (que aqui chamaremos de convencionais) com a variação de temperatura, pH, força iônica e

concentração de etanol e de extrações com fluido supercrítico utilizando CO_2 como solvente, testando esses extratos quanto ao seu poder antifúngico.

Especificamente, determinou-se as concentrações de compostos fenólicos nos extratos e estes foram selecionados para testes de poder antifúngico, frente à três espécies de fungos xilófagos basidiomicetos amazônicos, de acordo com a concentração dos extratos e condições de maior ou menor hidrofilicidade dos solventes hidroalcoólicos e seletividade do sistema com CO_2 supercrítico usados na extração.

1.2 Plano e etapas do trabalho desenvolvido

Para o desenvolvimento do trabalho elaborou-se um plano de acordo com a Figura 1.1 e o detalhamento das atividades referentes a estas etapas do trabalho é apresentado a seguir.

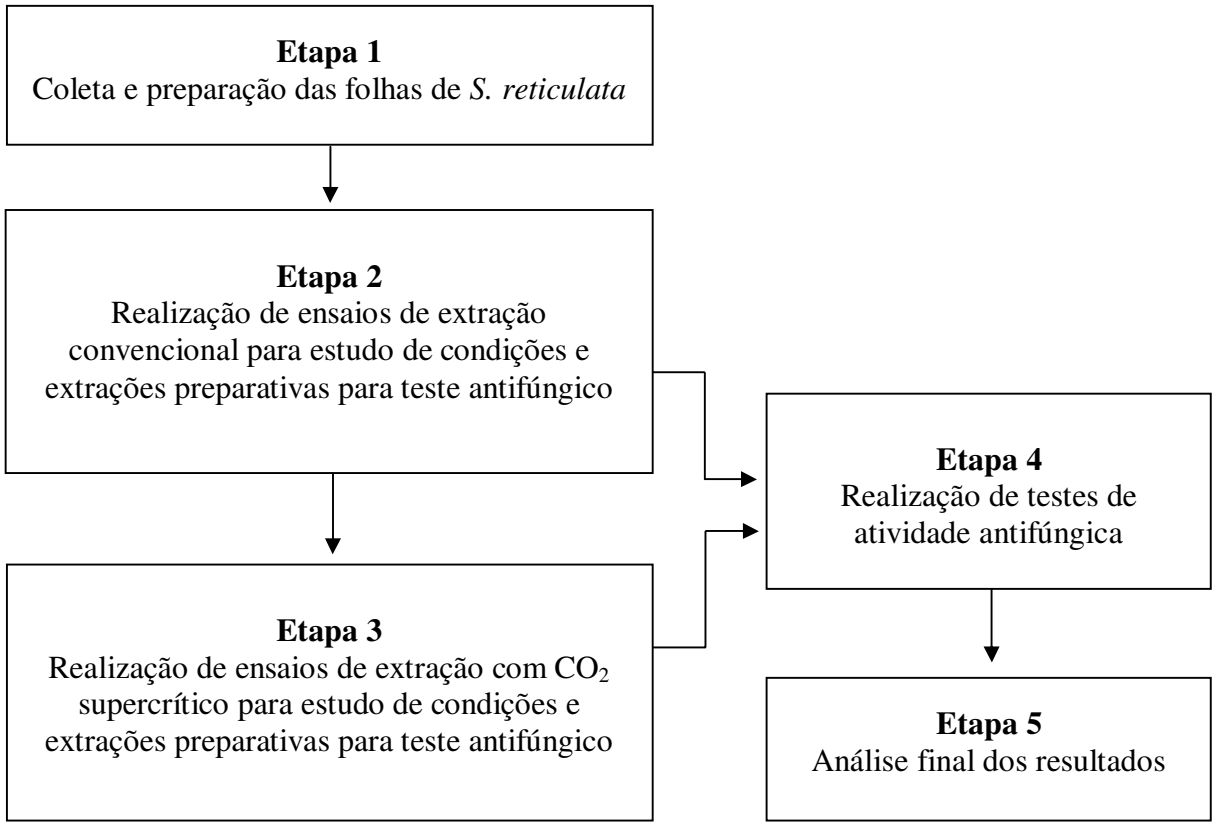


Figura 1.1: Diagrama esquemático que representa as cinco etapas do plano de trabalho desenvolvido.

A **Etapa 1** constou de:

- **a)** Coleta, secagem e trituração das folhas de *S. reticulata*;
- **b)** Caracterização física das folhas: determinação da umidade e distribuição granulométrica.

A **Etapa 2** foi composta de:

- **a)** Implementação de métodos analíticos para a determinação da concentração de proteínas (BRADFORD, 1976) e compostos fenólicos (PRICE e BUTLER, 1977);
- **b)** Testes preliminares de adequação do equipamento para os ensaios de extração convencional em tanque agitado e determinação das condições de operação (razão massa:volume, velocidade de agitação e tempo de batelada);
- **c)** Realização de ensaios de extração convencional das folhas em solução aquosa e hidroalcoólica em tanque agitado para estudo de condições;
- **d)** Realização de extrações convencionais preparativas para teste de atividade antifúngica.

A **Etapa 3** teve as seguintes atividades:

- **a)** Testes preliminares de adequação do equipamento e determinação das condições de operação para os ensaios de extração com CO_2 supercrítico;
- **b)** Realização de ensaios de extração com CO_2 supercrítico das folhas para estudo de condições;
- **c)** Realização de extrações supercríticas preparativas para teste de atividade antifúngica.

A **Etapa 4** refere-se à realização de testes de atividade antifúngica dos extratos obtidos frente a três espécies de fungos xilófagos basidiomicetos amazônicos.

Na **Etapa 5** foi realizada a análise dos resultados obtidos durante todo o desenvolvimento do trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre a espécie *Senna reticulata*

As espécies do gênero *Senna* têm distribuição muito ampla por várias partes do mundo. Em geral são árvores, arbustos e subarbustos e possuem uma grande diversidade de substâncias bioativas e inéditas com vários padrões moleculares dentre as quais, as antraquinonas, os flavonóides e outros compostos fenólicos são os mais freqüentes (RODRIGUES et al., 2005; VIEGAS et al., 2006).

Vários autores, em seus estudos com algumas espécies deste gênero, relataram propriedades como: antibacteriana (SAMY e IGNACIMUTHU, 2000), antifúngica (PALAMICHAMY e NAGARAGAN, 1990), anti-inflamatória (CUELLAR et al., 2001), hepatoprotetora (JAFRI et al., 1999) e antimalárica (TONA et al., 1999), confirmando o potencial farmacológico deste gênero.

S. reticulata é uma planta encontrada em quase toda a América Latina, que no Brasil é utilizada na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades (CORRÊA, 1984). Esta espécie (Figura 2.1) é um arbusto, pertencente à família das leguminosas, com ampla distribuição geográfica e pode ocorrer em terrenos inundáveis e não-inundáveis, campo aberto e sombreado (REVILLA, 2000). Por seu crescimento rápido e fácil adaptação em planícies inundadas, é considerada uma planta pioneira de áreas abertas da planície Amazônica. No entanto, para os criadores de gado da região, ela é considerada uma erva daninha lenhosa, pois, o seu rápido crescimento impede a formação de pastos, motivo pelo qual, na região amazônica, recebeu o nome vulgar de mata-pasto (PAROLIN, 2001).

Figura 2.1: Espécie *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (conhecida vulgarmente como mata pasto).

Esta espécie é também popularmente conhecida como maria-mole, mata-pasto do grande, mata-pasto verdadeiro, retama, entre outros nomes, dependendo da região onde se encontra (SILVA et al., 2004). Ela tem a seguinte classificação taxonômica:

- Família: Leguminosae;
- Sub-família: Caesalpinioideae;
- Gênero: *Senna;*
- Espécie: *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby.

A espécie *S. reticulata* é muito conhecida e utilizada na medicina popular. O suco das folhas é indicado contra dermatoses e para as feridas sifilíticas, as sementes são consideradas anti-helmínticas e usadas no tratamento de hidropisia (CAMPELO, 1982; REVILLA, 2000). A infusão da raiz é dita útil no tratamento de irregularidades menstruais e nas obstruções do fígado, sendo também considerada anti-reumática, diurética e febrífuga. Além do uso na medicina popular, a espécie *S. reticulata* é usada, por sua beleza natural, como planta ornamental (PRANCE e SILVA, 1984).

Carbajal (2007) registrou a atividade cicatrizante do extrato etanólico de folhas de *Senna reticulata*, obtido por maceração a frio, em testes com ratos. Nesse extrato foi confirmada a presença de metabólitos secundários como alcalóides, taninos e flavonas.

Santos (2007) em análise cromatográfica dos extratos etanólicos de folhas, caule e cascas de *S. reticulata*, obtidos por maceração a frio, os quais tiveram rendimentos de 3,65%, 0,87% e 1,70% respectivamente, isolou e caracterizou diferentes compostos. Das folhas 1,8-di-hidroxi-3-metilantraquinona (crisofanol) e 1,8-di-hidroxi-3-metil-6-metoxiantraquinona (fisciona); do caule 1,6,8-tri-hidroxi-3-metilantraquinona (emodina) e 3-carbinol-1,8-di-hidroxiantraquinona (aloe-emodina), além de misturas dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol e dos triterpenos α-amirina e β-amirina; os extratos das cascas apresentaram 1,3,8-tri-hidroxiantraquinona e 1,6,8-tri-hidroxi-3-metoxiantraquinona (lunatina), o dímero crisofanol-10,10'-biantrona, o flavonóide caempferol, além da mistura dos esteróides β-sistoterol e estigmasterol em suas formas glicosiladas.

Entre as muitas atividades biológicas desempenhadas pelas antraquinonas estão as funções herbicida, fungicida, helminticida, antipsoriática, moluscicida, bactericida, antiparasitária e tuberculostática (SINGH et al., 2006; SILVA, 1987).

Costa et al. (2008) trabalhando com extratos etanólicos da casca do caule, caule e fruto de *S. reticulata* obtidos por maceração a frio, na concentração de 1,00 e 10,00 g/L em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), observaram a inibição parcial e total por estes extratos de três espécies de fungos xilófagos amazônicos, com destaque para o extrato etanólico do caule, pois este apresentou inibição total em uma das espécies, além da inibição parcial sobre as outras duas espécies fúngicas testadas, indicando a presença de compostos com atividade fungicida e ou fungistática nesta parte da planta.

No trabalho de avaliação dos extratos das folhas de *S. reticulata* contra fungos xilófagos realizado por Castro (2005) os testes em meio de cultura com o fungo *Panus crinitus* mostraram que os extratos brutos obtidos com diferentes solventes orgânicos, assim como suas frações e sub-frações, apresentaram resultados inibitórios ao crescimento micelial, os resultados mostraram uma tendência à inibição total do fungo, principalmente na sub-fração metanólica oriunda do extrato bruto obtido com acetato de etila, com o aumento da concentração deste no meio.

2.2 Os fungos xilófagos e suas estratégias de ataque à madeira

2.2.1 Fungos xilófagos amazônicos

Fungos, em geral, são organismos com núcleo, portadores de esporos sem clorofila, que se reproduzem sexuada ou assexuadamente e cujas estruturas somáticas são filamentosas e ramificadas, estando tipicamente rodeada por uma parede celular que contém celulose, quitina ou ambas (ALEXOPOULOS, 1966).

Fungos xilófagos são organismos heterotróficos (retiram energia de outros organismos para sobreviver) secretando enzimas que atuam sobre os carboidratos e lignina, quebrando-os em compostos mais simples, até que atinjam a solubilidade para serem metabolizados. Fatores como temperatura (faixa de 5 a 65°C), umidade (acima de 20%), aeração e a natureza dos extrativos (certos compostos químicos presentes em vegetais, discutidos à frente) como condições à nutrição, são fundamentais para o seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 1986). Segundo Mendes (1988), a faixa de pH para o desenvolvimento dos fungos xilófagos vai de 2,0 até um pouco acima de 7,0 e estes podem se desenvolver na madeira mesmo que esta apresente concentração de oxigênio inferior a 20% encontrada no ar; alguns sobrevivem em atmosfera de apenas 1% de oxigênio, mas a ausência ou concentrações muito baixas deste gás impedem ou limitam o seu desenvolvimento.

As características ambientais da Amazônia, como temperatura e umidade elevadas, propiciam a existência e a proliferação de fungos xilófagos. Além disso, o pH ótimo para o crescimento desses organismos está na faixa entre 4,5 e 5,5, que coincide com os valores de pH encontrado na maioria das espécies de madeira (MENDES, 1988). Deste modo, os fungos xilófagos tornam-se responsáveis pelos maiores danos na madeira, por atacarem a parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), diminuindo a resistência mecânica dessa matéria prima (ROCHA, 2001).

2.2.2 Estratégia de ataque dos fungos xilófagos à madeira

A madeira é formada por diferentes polímeros: a) a celulose que forma um esqueleto imerso em uma matriz de, b) hemicelulose e c) lignina que é material aglutinante, formando a

parede celular (LEPAGE, 1986). A madeira é degradada por fungos porque os organismos xilófagos reconhecem os polímeros estruturais como fontes de nutrientes e através da síntese de enzimas específicas são capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis (OLIVEIRA et al., 1986).

Os ataques fúngicos em geral, ocorrem quando a umidade da madeira está acima de 20% e a umidade atinge o ponto de saturação das fibras. Neste ponto, as paredes celulares encontram-se completamente saturadas e o lúmen celular isento de água livre (MENDES, 1988).

Fungos de diferentes classes como ascomicetos, deuteromicetos, basidiomicetos provocam diferentes formas de degradação em madeiras como emboloramento, manchas e podridão, respectivamente (OLIVEIRA et al., 1986).

Os fungos que, freqüentemente, são encontrados atuando como degradadores de madeiras estão divididos em cinco categorias, segundo as suas estratégias de ataque, a saber: podridão parda, podridão branca, podridão mole, mancha e bolor. As três primeiras categorias podem ser credenciadas aos chamados fungos apodrecedores de madeira (LEVY, 1979 *apud* MENDES, 1988) e são descritas a seguir.

2.2.2.1 Podridão parda

A podridão parda é um processo biológico que resulta da ação de enzimas do micélio dos fungos sobre a superfície da parede celular primária e da parede celular secundária (S1, S2 e S3) da madeira (Figura 2.2), transformando a celulose e a hemicelulose em substâncias solúveis e facilmente assimiladas e digeridas. Como a lignina (de cor escura) não é digerida no processo, a área degradada adquire uma coloração pardo-escuro. Essa retirada de elementos estruturais da parede celular provoca a perda da resistência mecânica da madeira (MENDES, 1988).

2.2.2.2 Podridão branca

Na podridão branca, os fungos também atuam na superfície das paredes celulares. A ação restrita das enzimas ocasiona a formação de fendas ou orifícios nos quais os fungos se assentam. No decorrer do ataque as fendas vão se juntando, provocando uma lenta e total erosão da parede

celular a partir do lúmen. Esses fungos podem degradar todos os componentes da parede celular, incluindo a lignina e outros carboidratos (BLANCHETTE, 2000).

Quando a madeira é atacada desta forma, apresenta progressiva perda de massa e das propriedades mecânicas e adquire coloração esbranquiçada devido ao maior percentual de holocelulose (termo usado para designar toda a fração de carboidrato do material celulósico depois de removida lignina) presente na madeira (MENDES, 1988; BLANCHETE, 2000).

2.2.2.3 Podridão mole

A podridão mole é causada por fungos chamados imperfeitos (Ascomicetos). Esses fungos penetram na parede secundária da célula, perfurando longas cadeias de forma helicoidal que são paralelas às cadeias da celulose. Uma vez dentro da parede celular, os fungos atravessam a lamela média (Figura 2.2) e penetram a parede da célula vizinha e, assim, continuam o seu caminho. A superfície da área atacada apresenta trincas transversais como se tivessem sido carbonizadas. Dos três tipos de podridão, a podridão mole é a que se desenvolve de forma mais lenta (MENDES, 1988)

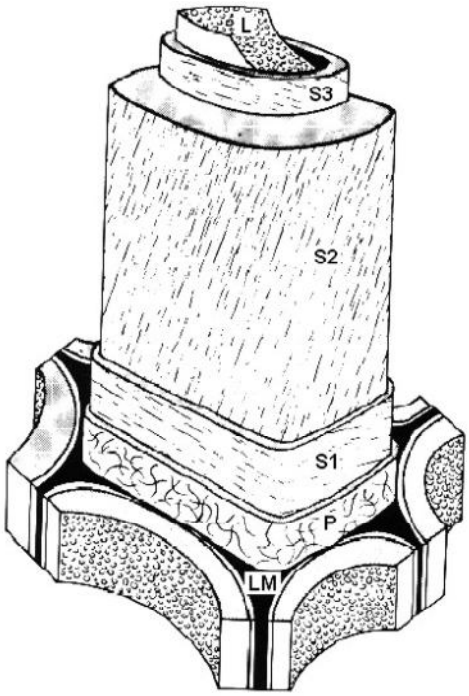


Figura 2.2: Representação esquemática de uma célula vegetal: lamela média (LM); parede primária (P); parede secundária externa (S1); parede secundária média (S2); parede secundária interna (S3); lúmen (L). Fonte: CARVALHO et al., 2009.

2.3 Os extrativos ou metabólitos secundários das plantas

Os extrativos ou metabólitos secundários são compostos orgânicos de baixa massa molecular produzidos e armazenados pelos vegetais (FERREIRA et al., 2008). Apesar de não ter função direta no crescimento e no desenvolvimento dos vegetais, os metabólitos secundários contribuem para a proteção das plantas, agindo contra herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas, ao mesmo tempo em que auxilia na atração de organismos benéficos (ALVES, 2001). Os metabólitos secundários estão divididos em três grandes grupos: terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (SARTORI, 2005).

Segundo Andrade et al. (2007) os compostos fenólicos como os taninos, os flavonóides, principalmente os isoflavonóides e os terpenos, são os principais metabólitos secundários com ação antifúngica e antimicrobiana.

2.3.1 Compostos fenólicos: características, funções e aplicações

Dentre os produtos do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos ou polifenóis apresentam-se como um dos mais numerosos grupos de substâncias, com mais de 8.000 estruturas fenólicas conhecidas e amplamente distribuídas por todo o reino vegetal (HARBORNE, 1993). São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus derivados funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos podem variar desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados como os taninos. Aparecem principalmente na forma conjugada, com um ou mais resíduos de açúcar ligados a grupos hidroxila, embora existam também ligações diretas da unidade de açúcar com um carbono aromático (BRAVO, 1998).

Os polifenóis são resultados das muitas combinações de compostos fenólicos existentes na natureza, decorrentes de sua diversidade estrutural. Essas diferentes combinações fenólicas podem ser classificadas de acordo com as suas estruturas básicas (HARBORNE, 1989). A Tabela 2.1 ilustra as estruturas químicas básicas de algumas classes de compostos fenólicos.

Tabela 2.1: Classes de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura básica
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 – C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 – C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6 – C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 – C_4$
Xantonas	$C_6 – C_1 – C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 – C_2 – C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6 – C_3 – C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 – C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6 – C_3 – C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 – C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 – C_3 – C_6)_n$

Fonte: HARBORNE, 1989

A quantidade de compostos presentes pode variar entre populações de uma mesma espécie e entre partes diferentes de uma mesma planta. O tipo e a variedade de compostos fenólicos que uma planta apresenta têm ligação direta com fatores como: estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, manejo, processamento e armazenamento da matéria-prima (AUW at al., 2000; CHAVAN et al., 2001).

Os compostos fenólicos, na sua grande maioria, apresentam-se na natureza na forma de ésteres ou de heterosídeos, que podem ser solubilizados por solventes orgânicos polares ou água

(MELLO e SANTOS, 2001). A polaridade do solvente utilizado na extração, o grau de polimerização do composto fenólico, sua interação com outros constituintes e a formação de complexos, determinam a solubilidade do mesmo. Assim, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração e relação mássica solvente:amostra também influenciam significativamente na eficácia da extração de compostos fenólicos (WU et al., 2004; LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005; NAM et al., 2005).

Muitas atividades terapêuticas de fitoquímicos são creditadas aos compostos fenólicos biologicamente ativos tais como flavonóides, ácidos fenólicos e outros (CROFT, 1998; PIETTA, 2000). Além da bastante conhecida atividade antioxidante, os compostos fenólicos destacam-se também pela habilidade de se ligarem a receptores celulares e a transportadores de membrana, de influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular entre outras funções (MANACH e DONOVAN, 2004).

Além da função antioxidante existem muitos indícios que comprovam a ação antifúngica dos compostos fenólicos e um dos mecanismos pelo qual esta ação pode ocorrer é a inativação dos sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e na síntese de compostos naturais (OLIVEIRA e BADIALE-FURLONG, 2008).

2.4 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido é uma operação unitária presente em muitas indústrias, tais como a indústria mineral, de alimentos, a nuclear, etc. Nas indústrias farmacêuticas, de perfumes e de pesticidas a utilização da extração sólido-líquido visa em muitos casos a recuperação de princípios ativos de plantas (ROMDHANE e GOURDON, 2002).

Também chamada de lixiviação ou simplesmente extração, a extração sólido-líquido é um processo de separação que envolve a transferência de massa de um soluto de uma matriz sólida para um solvente. Este tipo de extração é uma operação unitária muito utilizada não só na recuperação de compostos de interesse, mas, também na remoção de toxinas e contaminantes presentes em alimentos (AGUILERA, 2003). O rendimento da extração de compostos bioativos, a partir de materiais vegetais, é influenciado principalmente pelo processo de extração com solventes aquosos ou orgânicos (CACACE e MAZZA, 2003).

Segundo Aguilera (2003), durante uma extração sólido-líquido a concentração de solutos no interior da matriz sólida varia levando a uma condição instável ou não estacionária. Para que ocorra a extração, efetivamente, é necessário que durante o período de interação entre as partículas que contém o soluto e o solvente, aconteça uma série de fenômenos tais como:

a) A entrada do solvente no interior da matriz sólida;

b) Solubilização de componentes no solvente;

c) Transporte do soluto para o exterior da matriz sólida;

d) Migração do soluto extraído da superfície do sólido para a solução;

e) Movimento do extrato em relação ao sólido (deslocamento do extrato);

f) Separação entre o extrato e o sólido.

A difusão molecular é o processo pelo qual as moléculas são transportadas de uma parte para outra do sistema em movimento aleatório como resultado do gradiente de concentração (AGUILERA, 2003). Na difusão em estado não-estacionário (condições transientes) o fluxo de difusão e a concentração em um ponto específico no interior de um sólido variam ao longo do tempo, havendo como resultado um acúmulo ou esgotamento líquido do componente que se encontra em difusão. A taxa de difusão pode ser descrita pela segunda lei de Fick (Equação 2.4.1):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \qquad \text{Equação 2.4.1}$$

na qual C é a concentração do soluto, t é o tempo, D é a difusividade ou coeficiente de difusão e x é o caminho de difusão (BIRD et al., 1960).

Na difusão, o movimento da matéria é o resultado da ação da força motriz (diferença de concentração) que está associada à resistência do meio (interação soluto-meio). A transferência de massa também pode estar associada à convecção, processo no qual o escoamento de uma região a outra se dá em escala macroscópica, ou seja, pela própria movimentação do meio. Nesse caso, a força motriz é a mesma da difusão, porém a resistência do meio está associada à interação

soluto-meio somada à ação externa (características do meio e geometria do lugar onde se encontra) (CREMASCO, 2002).

Segundo Rosenthal et al. (1996) as etapas que compõem a transferência de massa são influenciadas por fatores como a temperatura, o tamanho da partícula sólida, a razão massa:volume (soluto:solvente), o grau de agitação, as características do solvente dentre outros.

A dissolução dos componentes no processo de extração sólido-líquido pode ser aumentada pela elevação da temperatura (ROSENTHAL et al., 1996). O aumento da temperatura leva a um aumento significativo da difusividade, relação descrita pela equação de Einstein (equação 2.4.2):

$$D \propto \left(\frac{T}{\eta} \right)$$ Equação 2.4.2

na qual T é a temperatura absoluta e η é o coeficiente de viscosidade dinâmica (CACACE e MAZZA, 2003).

Numa extração é sempre desejável um menor tamanho de partícula, pois o menor tamanho da partícula, além de aumentar a superfície de contato da matriz sólida, reduz a distância de difusão do soluto no sólido e aumenta o gradiente de concentração levando a um aumento na taxa de extração. Como o caminho do soluto para alcançar a superfície é menor, o tempo de extração é reduzido (CACACE e MAZZA, 2003).

Durante a transferência de massa, o gradiente de concentração (força motriz) aumenta com a diminuição da razão massa:volume resultando no aumento da taxa de difusão (CACACE e MAZZA, 2003).

O grau de agitação reflete na velocidade de movimento e na turbulência do conjunto soluto-solvente afetando a eficácia das operações de dispersão e mistura no interior do recipiente de processamento e, principalmente, diminuindo a espessura da camada estagnada, diminuindo assim a resistência à difusão externa (ROSENTHAL et al., 1996).

Outro aspecto importante que deve ser observado é a escolha do solvente, pois, as características do solvente selecionado terão influência na composição do extrato, na sua pureza e rendimento da extração (DANISCO, 2001). Segundo Aguilera (2003), no processo de escolha do solvente adequado, algumas de suas propriedades devem ser observadas. Tais propriedades incluem:

1. A solubilidade do composto específico no solvente;
2. A possibilidade de recuperação do solvente;
3. A sua tensão interfacial e viscosidade;
4. Idealmente, o solvente deve ser seletivo, não-tóxico, estável, não reativo, não inflamável, inofensivo ao meio ambiente e de baixo custo.

Atualmente, a seleção do solvente deve ser feita de acordo com a legislação que governa o uso do extrato, se para fins alimentícios, cosméticos, perfumaria, etc e também de acordo com as especificações do cliente, que podem ser mais restritivas do que a própria legislação (PEREIRA, 2009).

2.5 Extração com solventes líquidos

A água é o solvente líquido mais comum em processos de lixiviação, e muitos solventes são à base de água. Aqueles que não são à base de água, são chamados orgânicos. Esses são hidrocarbonetos lipofílicos e, portanto, são capazes de extrair, dissolver ou suspender, principalmente, gorduras, óleos e ceras (BRUCKNER e WARREN, 2001). A extração por solvente foi relatada pela primeira vez em 1835 por Robiquet para a obtenção de compostos de flores (HUI e JOHN, 2007).

No caso da extração de compostos de vegetais, na maioria das vezes, o material é submetido ao processo de secagem para a preservação ou armazenagem do mesmo, seguido da trituração que facilita o processo de extração (BERLINCK, 2009).

Em geral, o material vegetal deve ser seco em temperaturas abaixo de 30ºC para evitar a decomposição de compostos termo-sensíveis. Da mesma forma, devem ser protegidos do sol por causa do potencial para transformação química resultantes da exposição à radiação ultravioleta.

Para evitar o acúmulo de calor e umidade, a circulação do ar em todo o material vegetal é essencial. Por isso, não deve ser compactado, e pode ser necessário o uso de um sistema para fornecer fluxo de ar às amostras durante o processo de secagem (JONES e KINGHORN, 2006).

Caso haja necessidade de extração de material fresco, esta deve ser realizada imediatamente após a coleta, de modo a preservar suas características originais, para a qual é indicado o uso de solventes orgânicos como metanol ou etanol (BERLINCK, 2009).

Existem vários métodos de extração de compostos vegetais que empregam água ou solventes orgânicos. O método mais adequado para cada caso deve ser determinado de acordo com o caráter da substância a ser extraída. Os métodos de extração de compostos de vegetais mais usados que incluem a maceração, a percolação, a extração em Soxhlet, a decocção e a turbolização são detalhados a seguir.

a) Maceração - Nesse processo o material vegetal é colocado em contato com o solvente, por um tempo que varia de horas a dias; em seguida o solvente é removido por filtração e o resíduo é re-extraído. Nesse procedimento, três extrações são suficientes para a obtenção do máximo de eficiência (BERLINCK, 2009). É um método comum para a extração de pequenas quantidades de material vegetal em laboratório, pois pode ser realizado em frascos Erlenmeyer que devem ser vedados para evitar a evaporação do solvente (JONES e KINGHORN, 2006).

b) Percolação - É um método eficiente de extração no qual o material vegetal moído é colocado em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador) de vidro ou metal; em seguida faz-se passar o solvente em fluxo contínuo. O procedimento pode ser realizado a quente ou a frio. Um exemplo clássico de extração por percolação é a preparação de café (BERLINCK, 2009).

c) Extração em Soxhlet - É um método conveniente para pequenos volumes de material vegetal em que requer sistemas disponíveis no mercado. Como a extração ocorre em um sistema fechado no qual o solvente é reciclado continuamente, o volume de solvente utilizado é mínimo. No entanto, o calor necessário para realizar a extração pode levar à decomposição de compostos termo sensíveis (JONES e KINGHORN, 2006).

d) Decocção - Nesse tipo de extração o material vegetal é mantido em contato, durante certo tempo, com o solvente (normalmente água) em ebulição. Seu uso é restrito a materiais duros de natureza lenhosa, pois o aquecimento prolongado pode alterar as substâncias ativas (FALKEMBERG et al., 2003).

e) Turbolização - Nesse método a extração ocorre ao mesmo tempo em que acontece a redução do tamanho das partículas pela força de cisalhamento, resultante da agitação no sistema, favorecendo a rápida dissolução das substâncias ativas (FALKEMBERG et al., 2003). Neste tipo de extração, enquadra-se a extração em tanque agitado por impelidores.

2.5.1 Extrações aquosas

A água, considerada como solvente universal é um solvente com elevada polaridade utilizado para a extração de compostos hidrofílicos (SANTOS e MELLO, 2003). A sua disponibilidade e não-toxidade justificam a sua grande utilização. Por outro lado, os extratos aquosos são suscetíveis à degradação e a contaminação microbiana e, por esse motivo, extratos aquosos devem ser liofilizados ou preparados para uso imediato (SONAGLIO et al., 2003).

Nos extratos obtidos a quente, a elevação da temperatura reduz as contaminações enquanto que nos extratos obtidos a frio, o armazenamento em temperaturas entre 8°C e 10°C minimiza a proliferação de microorganismos (RUTHERFORD e POWRIE, 1993). Segundo Falkenberg et al. (2003) a secagem do extrato vegetal aquoso diminui o crescimento de microorganismos e impede reações de hidrólise, promovendo maior estabilidade química.

A água não é um solvente ideal para a extração de compostos biologicamente ativos de plantas, pois o isolamento de constituintes solúveis em água é um desafio para os métodos convencionais, tais como a cromatografia em sílica gel. Além disso, o ponto de ebulição relativamente alto e elevada tensão superficial da água tornam difícil a concentração de extratos aquosos em evaporador rotativo (JONES e KINGHORN, 2006).

2.5.2 Extrações por solventes orgânicos

No processo de extração por solventes orgânicos podem ser empregados solventes miscíveis ou imiscíveis em água. O solvente selecionado deve ser atóxico e ter baixo potencial para reação, baixa inflamabilidade e baixo risco de explosão. Além disso, ele deve ser de baixo custo e facilmente reciclado por evaporação. Essas questões são importantes no caso de extrações onde grandes volumes de solvente são empregados (SEIDEL, 2005).

> Em uma extração de compostos vegetais, chamada de total, é usado um solvente orgânico polar (metanol, etanol ou uma solução hidroalcoólica) na tentativa de extrair o maior número possível de compostos. Esta é baseada na habilidade dos solventes alcoólicos em aumentar a permeabilidade da parede celular, facilitando a extração de grandes quantidades de componentes de alta, média e baixa polaridade (LIN et al., 2003; AKHTAR et al., 2003).

Alguns solventes utilizados para extração são apresentados na Tabela 2.2, com suas respectivas propriedades físico-químicas.

Tabela 2.2: Propriedades físico-químicas de alguns dos solventes usados na extração de produtos naturais

Solvente	Índice de polaridade	Ponto de ebulição (ºC)	Viscosidade (cPoise)	Solubilidade em água (% v/v)
n- Hexano	0,0	69	0,33	0,001
Diclorometano	3,1	41	0,44	1,600
n-Butanol	3,9	118	2,98	7,810
iso-propanol	3,9	82	2,30	Miscível
n-Propanol	4,0	92	2,27	Miscível
Clorofórmio	4,1	61	0,57	0,815
Acetato de etila	4,4	77	0,45	8,700
Acetona	5,1	56	0,32	Miscível
Metanol	5,1	65	0,60	Miscível
Etanol	5,2	78	1,20	Miscível
Água	9,0	100	1,00	Miscível

Fonte: SEIDEL, 2005

As extrações podem ser seletivas ou totais. A escolha do solvente mais adequado é baseada na sua seletividade para as substâncias a serem extraídas. Em uma extração seletiva, o material vegetal é extraído com um solvente de polaridade adequada, seguindo o princípio de que "semelhante dissolve semelhante". Assim, os solventes apolares são utilizados para solubilizar os compostos lipofílicos (alcanos, ácidos graxos, pigmentos, ceras, esteróis, terpenóides, alcalóides e cumarinas). Solventes com polaridade média são usados para extrair compostos de polaridade mediana (alguns alcalóides e flavonóides, por exemplo), enquanto os solventes de maior polaridade são usados para extrair compostos mais polares (exemplos são flavonóides, taninos e alguns alcalóides). A extração seletiva também pode ser realizada seqüencialmente com solventes de polaridade crescente. Isso permite uma separação preliminar dos metabólitos presentes no material em diferentes extratos proporcionando maior eficiência no isolamento (COTTIGLIA et al., 2004).

2.6 Extração com fluido supercrítico

Nas últimas décadas, a preocupação com o meio ambiente vem resultando em discussões sobre a utilização de técnicas de obtenção e processamento de produtos naturais que evitem ou minimizem os impactos ambientais. Os processos que empregam como solvente de extração gases a altas pressões (extração por fluido supercrítico, SCF) têm sido estudados por serem considerados ecologicamente limpos. Além disso, caracterizam-se pela fácil separação do solvente, obtendo-se assim extratos de alta pureza (COSTA et al., 2006).

Os fenômenos críticos foram descobertos pelo barão Charles Cagniard de la Tour em 1822 (BERCH et al., 2009). Cada composto puro possui seu ponto crítico característico, que é definido em termos de temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). O ponto crítico de uma substância é definida como as mais altas temperatura e pressão em que a substância pode existir no equilibrio líquido-vapor (Figura 2.3). À temperaturas e pressões acima desse ponto o composto é conhecido como fluido supercrítico (NAHAR e SARKER, 2006).

Segundo Sahena et al. (2009) esses compostos não podem ser liquefeitos acima da temperatura crítica, independentemente da pressão aplicada, mas pode alcançar uma densidade próxima à de um líquido.

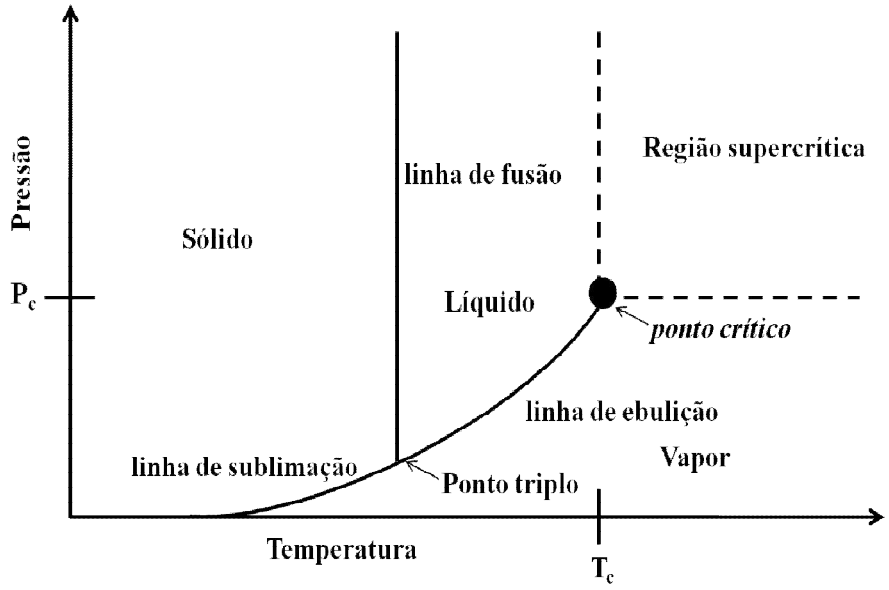


Figura 2.3: Diagrama esquemático do gráfico de pressão e temperatura para um composto puro.

Em condições supercríticas, o fluido exibe propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um líquido e de um gás favorecendo o seu uso como solvente. A elevada densidade, baixa viscosidade, baixa tensão superficial, alta difusividade (Tabela 2.3), alto poder de solvatação e grande potencial de seletividade dos fluidos supercríticos são algumas características que tornam este método de extração muito atraente (SOUZA et al., 2002).

Tabela 2.3: Valores característicos para o estado gasoso, líquido e fluido supercrítico

Estado do fuido	**Densidade (g/cm^3)**	**Difusividade (cm^2/s)**	**Viscosidade (g/cm s)**
Gás P=1 atm, T= 15-30 °C	(0,6-2,0) x 10^{-3}	0,1-0,4	(0,6-2,0) x 10^{-4}
Líquido P= 1atm, T = 15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0) x 10^{-5}	(0,2-3,0) x 10^{-2}
Fluido supercrítico P= p_c; T≈ T_c	0,2-0,5	0,7 x 10^{-3}	(1-3) x 10^{-4}
P= $4p_c$; T≈ T_c	0,4-0,9	0,2 x 10^{-3}	(3-9) x 10^{-4}

Fonte: BRUNNER, 1994

No estado supercrítico, a densidade do composto é proxima a de um líquido (Figura 2.4), como já foi dito, enquanto a viscosidade é perto da de gases normais e a difusividade é de cerca de duas ordens de grandeza maior do que em líquidos típicos (SOUZA et al., 2002).

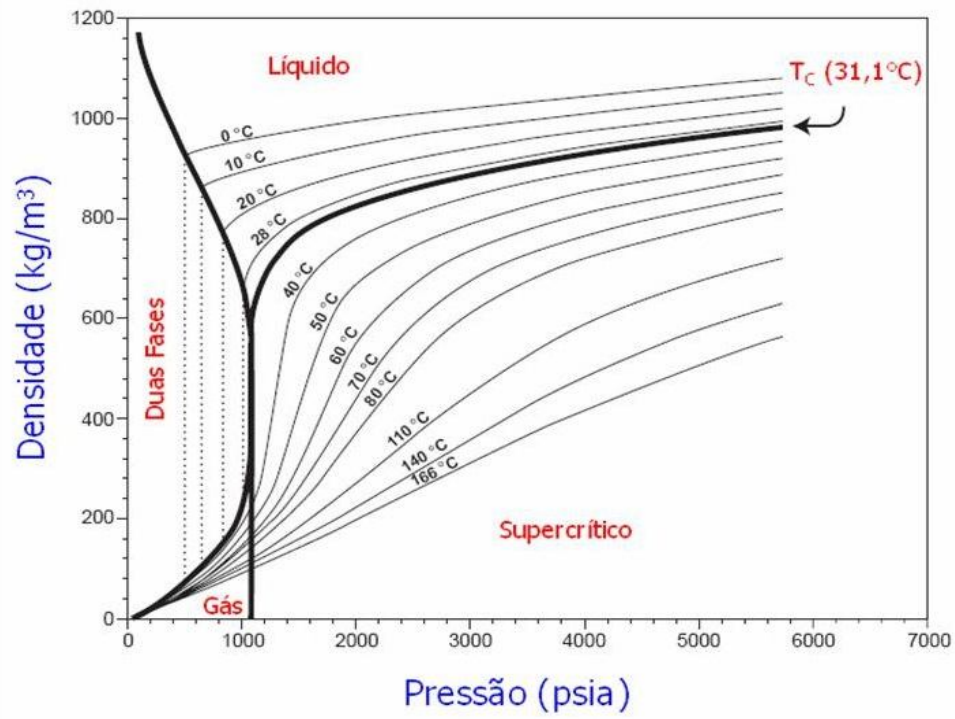


Figura 2.4: Densidade do CO_2 supercrítico em função da temperatura e pressão (adaptado de ANGUS et al., 1976).

O princípio da utilização da tecnologia de extração com fluido supercrítico está baseado no aumento da capacidade de dissolução de muitos gases quando estes são submetidos à pressão e temperatura acima do ponto crítico. Mesmo sendo conhecida há bastante tempo, essa tecnologia ganhou importância industrial apenas nas últimas décadas (SOUZA et. al., 2002). Devido ao custo de capital fixo, a SCF é utilizada, principalmente, na indústria de alimentos e em processos de menor escala como a extração de óleos essenciais e outros compostos de alto valor. Assim, o fator econômico do processo é um ponto de relevância e deve ser analisado separadamente para cada caso (BRUNNER, 2005; ROSA e MEIRELES, 2005).

A extração sólido-fluido supercrítico é realizada pela passagem do fluido supercrítico por um meio poroso formado pelo sólido que contém um soluto de interesse (REVERCHON, 1997). A mistura de soluto e solvente é enviada para um separador, no qual o solvente é expandido, perdendo sua capacidade de solvatação precipitando o soluto. Este processo foi utilizado com sucesso para a extração de óleos e gorduras comestíveis, purificação de matrizes sólidas, entre outras aplicações (MOHAMED e MANSOORI, 2002).

A extração com dióxido de carbono (CO_2) supercrítico tem atraído uma atenção considerável nos últimos anos como uma alternativa promissora frente aos métodos convencionais de extração de compostos naturais, pois oferece uma série de vantagens, incluindo a ausência de resíduos de solvente. Uma das caracteristicas de destaque do CO_2 neste contexto é o fato do mesmo ter temperatura e pressão crítica relativamente baixos quando comparados a outros solventes potenciais, 31,1 ºC e 7,38 MPa, respectivamente, que o torna um solvente muito atrativo para extrair compostos termicamente sensíveis (SAHENA et al., 2009). A Tabela 2.4 apresenta os valores de temperatura crítica e pressão crítica de alguns solventes comumente utilizados como fluidos supercríticos.

Tabela 2.4: Dados de temperatua e pressão crítica de algums solventes

Solvente	**T_c (ºC)**	**P_c (Mpa)**
Etileno	9,4	5,04
Dióxido de carbono	31,1	7,38
Etano	32,3	4,87
Oxido nitroso	36,6	7,26
Propano	96,8	4,25
n-Hexano	234,5	3,01
Acetona	235,1	4,70
Metanol	239,6	8,09
Etanol	240,9	6,14
Acetato de etila	250,2	3,83
Água	374,1	22,06

T_c - temperatura crítica, P_c - pressão crítica Fonte: BRUNNER, 2005

A seletividade do fluido supercrítico para diversas classes de compostos pode ser alterada pela seleção das condições de temperatura e de pressão do processo de extração ou pela introdução de co-solventes (QUISPE-CONDORI et al., 2005). Assim, extratos que apresentem

mais que uma classe de compostos de interesse podem ser fracionados durante o processo, utilizando técnicas como a extração fracionada e a separação fracionada. Na extração fracionada, uma mesma matéria-prima é sujeita a extrações sucessivas, em diferentes condições de extração e obtêm-se as frações enriquecidas nas diversas classes de compostos. Na separação fracionada, a matéria-prima é extraída em uma condição de temperatura e pressão tal que todas as classes de compostos sejam extraídas e as frações são obtidas através da descompressão em estágios da mistura solvente-soluto (MOHAMED, 1997).

A extração com fluido supercrítico é uma técnica que pode substituir os processos tradicionais de extração (destilação, extração líquido-liquido e extração sólido-líquido). A escolha do processo de extração depende de sua eficiência, da matéria prima, do custo do processamento, das características físicas, do destino de utilização e preço do produto final (SOUZA et al., 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Folhas de *S. reticulata*

As folhas da espécie botânica *S. reticulata* utilizadas no presente trabalho foram coletadas de indivíduos medindo entre 3 e 4 m de altura, no perímetro urbano da cidade de Parintins-AM, localizada à margem direita do rio Amazonas latitude - 02° 37' 40" Sul, longitude - 56° 44' 09" Oeste e 27 m de altitude (Figura 3.1), entre os meses de novembro e dezembro de 2009.

Figura 3.1: Localização da área de coleta das folhas de *Senna reticulata*, Parintins-AM. Fonte: Google imagens.

3.1.2 Reagentes diversos

Nas extrações convencionais em tanque agitado utilizou-se etanol, NaCl, HCl e NaOH de grau analítico da Synth, Brasil. Nas extrações em condições supercríticas foi utilizado CO_2 com 99,5% de pureza (Linde Gas – AGA, Brasil).

Para os procedimentos analíticos os reagentes utilizados foram: Coomassie Plus (Pierce, EUA); albumina de soro bovino (BSA) e D-catequina (ambos de pureza ≥ 98 %) da Sigma, EUA. Os sais $FeCl_3$ e $K_3Fe(CN)_6$ grau analítico foram adquiridos da Synth (Brasil).

Nos ensaios de atividade antifúngica foram utilizados água destilada, etanol grau analítico (Merck, Alemanha) e meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) da Oxoid, Inglaterra.

3.1.3 Equipamentos usados na caracterização física das folhas e análise dos extratos

Na caracterização física das folhas, feita em termos da determinação de umidade e distribuição granulométrica, utilizou-se balança semi-analítica (modelo AL 500 C, marca Marte, Brasil) com precisão de 0,001 g, peneiras Granutest da Telastem (Brasil) classificação Tyler na ordem 10, 14, 20, 28, 35, 48 e 65 mesh e agitador de peneiras Produteste (modelo T, Granuteste, Brasil). As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA) e a água ultrapura foi obtida com o equipamento Milli-Q System (Millipore, EUA).

3.1.4 Equipamento para extrações aquosas e hidroalcoólicas pelo método convencional

O sistema utilizado para a obtenção de extratos pelo método convencional é esquematizado na Figura 3.2 e constava basicamente de um tanque agitado projetado pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEBp da FEQ/UNICAMP. O aparato era composto de um tanque cilíndrico com fundo plano em aço inox 316 com volume interno de 100 mL, diâmetro de 4,0 cm e jaqueta térmica para controle de temperatura. O sistema de agitação consistia em um agitador mecânico Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha) e um impelidor com quatro pás inclinadas (inclinação de 45º) da Kroma (Brasil). A hélice ficava a

1,3 cm do fundo do tanque e tinha 2,8 cm de diâmetro. A vedação do tanque era feita na tampa por um conjunto de 4 parafusos e anel O'ring.

A temperatura do tanque era controlada com precisão de ± 0,2ºC pela jaqueta térmica, alimentada com água por um banho termostatizado TE-2000 (Tecnal, Brasil). O pH da solução era medido por um pH-metro Corning 430 (Labequip, Canadá).

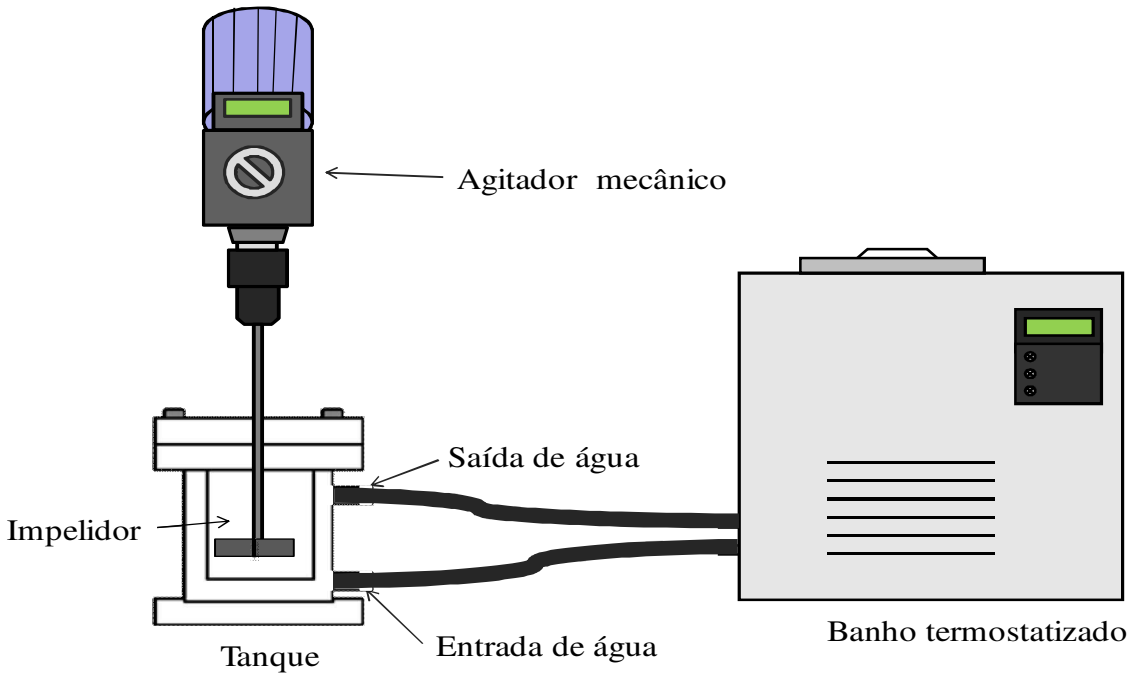


Figura 3.2: Desenho esquemático do sistema montado para os ensaios de extrações convencionais.

3.1.5 Equipamento para extração com fluido supercrítico

Nas extrações com fluido supercrítico foi utilizado um equipamento montado no Laboratório de Tecnologias Supercríticas do Instituto de Química da UNICAMP (Figura 3.3). O equipamento é dotado de cilindro contendo CO_2 (1), banho termostatizado (Ética Brasil, modelo 521.2) (2), bomba de pressurização (modelo M111-L, Maximator, Alemanha) com pressão máxima de 14000 psi (3), transdutor de pressão Heise Digital Pressure Indicator, modelo 901-A, EUA (faixa de 0 à 10.000 psi) (4), uma coluna de extração em aço com um volume interno de

50 mL alojada no interior de uma estufa (marca Quimis, modelo Q317M12) (5), uma válvula micrométrica aquecida (AUTIC, Brasil) (6), um frasco Kitassato coletor de produto (7) e um medidor de fluxo de CO_2 (modelo G 0,6 da LAO, Brasil) (8).

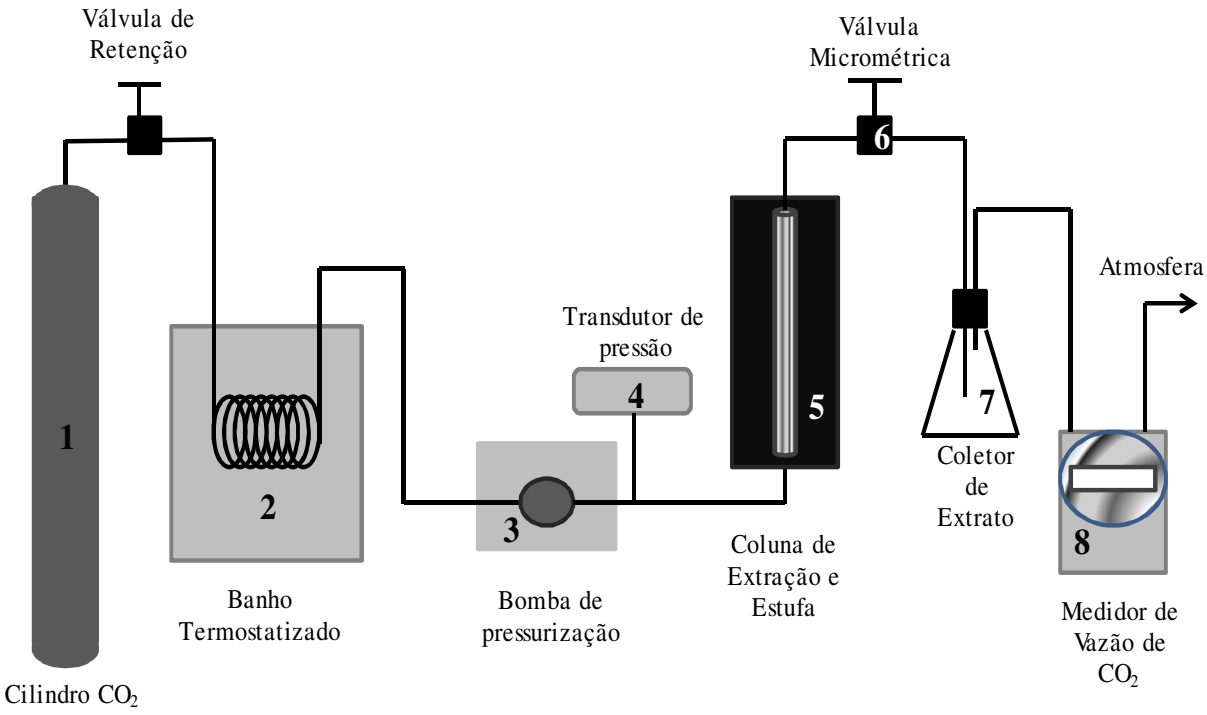


Figura 3.3: Representação esquemática do sistema de extração com fluído supercrítico montado no Laboratório de Tecnologias Supercríticas do Instituto de Química da UNICAMP.

3.1.6 Materiais e equipamentos usados nos ensaios de atividade antifúngica

Nos ensaios de atividade antifúngica foram utilizadas placas de Petri de dimensões 90 mm x 15 mm, béquer de 1.000 mL, frascos Erlenmeyer de 1.000 mL e de 200 mL todos em vidro Pyrex®, destilador de água MA-270 (Marconi, Brasil), autoclave CS-18 (Prismatec, Brasil), placa agitadora e aquecedora Q261-12 (Quimis, Brasil) e estufa incubadora B.O.D. (Quimis, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta e preparação das folhas de *S. reticulata*

As folhas de *S. reticulata* foram submetidas ao processo de secagem à sombra em temperatura ambiente (entre 35 e 40ºC) por 30 dias nos Laboratórios de Ensino de Química e Biologia do Centro de Estudos Superiores de Parintins-CESP da Universidade do Estado do Amazonas. Estas folhas secas foram então trituradas em moinho de facas e martelo (modelo DPM 02, Nogueira, Brasil) na empresa A Regional Amazônica Indústria e Comércio de Plantas e Cereais LTDA, em seguida foram acondicionadas em sacos de papel que foram colocados no interior de saco plástico e enviadas para o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da FEQ/UNICAMP.

3.2.2 Determinação do teor de umidade das folhas trituradas

Para a determinação do teor de umidade, cerca de 5,000 g de folhas trituradas (massa úmida) foram colocadas dentro de uma placa de Petri que em seguida foi coberta com papel alumínio perfurado em múltiplos pontos. Tanto a placa de Petri como o material destinado a cobri-la foram previamente pesados. A placa foi então colocada em um dessecador contendo sílica gel, sendo então a massa do conjunto medida diariamente até atingir valor constante, o que aconteceu em 20 dias.

O cálculo do teor de umidade foi feito segundo a Equação 3.1:

$$TU = \frac{PU - PS}{PS} x\ 100 \qquad \text{Equação 3.1}$$

na qual *TU* é o teor de umidade (em porcentagem), *PU* é a massa úmida e *PS* é a massa seca.

3.2.3 Determinação do tamanho médio e distribuição granulométrica das folhas trituradas

A caracterização granulométrica do material vegetal foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Partículas e Processos Multifásicos – LaProM, da FEQ/UNICAMP através do método de peneiramento. Em cada ensaio, 5,000 g de folhas trituradas foram submetidas ao peneiramento em agitador de peneiras a uma amplitude de vibração 9 e tempo de exposição de 20 min. O diâmetro médio das amostras coletadas em cada peneira foi calculado utilizando a Equação 3.2:

$$\bar{d}_p = \frac{d_{pi} + d_{pi+1}}{2} \qquad \text{Equação 3.2}$$

na qual $\bar{d}_p$ é o diâmetro médio de peneira, d_{pi} é o diâmetro médio da peneira equivalente e d_{pi+1} é o diâmetro médio da peneira equivalente subseqüente.

3.2.4 Ensaios preliminares de adequação das condições operacionais para extração convencional

A realização de ensaios preliminares foi necessária para a determinação de algumas condições operacionais como: proporção massa:volume (massa de folha triturada por volume de solvente), velocidade de agitação e tempo de extração. Diferentes razões massa:volume e rotação do impelidor foram testadas e o comportamento do conjunto sob agitação no interior do tanque foi monitorado por observação visual.

Para a determinação do tempo de extração fixou-se a razão m:v em 1:15 (água como solvente), a rotação em 900 rpm, a temperatura em 25ºC e pH 7,0. Agitou-se a mistura tomando-se amostras em tempos variados para dosagem de concentração de proteínas e compostos fenólicos como marcadores da extensão da extração, pelo fato de se esperar que compostos antifúngicos de *S. reticulata* sejam fenólicos (OLIVEIRA e BADIALE-FURLONG, 2008).

3.2.5 Ensaios de extração aquosa e hidroalcoólica em tanque agitado pelo método convencional

Nos ensaios de extração convencional 4,000 g de folhas trituradas de *S. reticulata* foram colocadas no interior do tanque, com a temperatura previamente ajustada pelo banho termostatizado (10, 25 e 40°C) e adicionou-se 60 mL de água. Em seguida, com o tanque ainda aberto, o agitador era acionado a 900 rpm por 30 s. Após esse procedimento mediu-se o pH da solução e este foi ajustado (5,0, 7,0 e 9,0) com a adição de solução de NaOH 2 mol/L ou HCl 2 mol/L. A seguir, adicionou-se quantidade de NaCl compatível com a força iônica desejada (0, 50 e 10 mmol/L), com o monitoramento do pH. O tanque foi fechado, o agitador novamente acionado à velocidade de 900 rpm e a extração transcorreu por um período total de 2,0 h. Os experimentos foram realizados aleatoriamente de acordo com o planejamento estatístico experimental fatorial do tipo 2^3, com níveis +1 e -1 e 3 repetições no ponto central (nível zero).

Para as extrações hidroalcoólicas, as condições de temperatura e pH que apresentaram os melhores resultados, nos estudos com água em termos de concentração de compostos fenólicos, foram fixadas e variou-se apenas a concentração de etanol da solução extratora (0, 10, 20, 30, 50, 70 e 100%). O procedimento utilizado seguiu o mesmo descrito para as extrações aquosas, diferenciando-se apenas pela ausência de NaCl no sistema.

Ao final dos ensaios, o extrato era retirado do tanque e centrifugado a 12.900 *g* e 25 °C por 15 min. Em seguida era retirado 500 μL do sobrenadante e feita a diluição com água na proporção 1:200. Após esse procedimento uma alíquota do extrato diluído era retirada e submetida aos métodos espectrofotométricos para a determinação das concentrações de proteínas e compostos fenólicos.

3.2.6 Ensaios de extração com fluído supercrítico

Para os ensaios de extração com fluido supercrítico, uma massa conhecida de folhas de *S. reticulata* trituradas era compactada no interior da coluna de extração de volume interno de 50 mL que era fechada e conectada ao sistema de extração. O CO_2 contido no cilindro era liberado e passava pelo banho termostatizado onde era resfriado à temperatura de -2 °C para garantir que o fluido estivesse líquido na bomba de pressurização. A pressão de extração era

ajustada pela bomba de pressurização e medida pelo através do transdutor de pressão. O CO_2 pressurizado fluía então para a coluna de extração na qual estava presente a matéria-prima. A coluna de extração estava alojada no interior da estufa pela qual era controlada a temperatura de extração. Na saída da coluna, a pressão era reduzida pela válvula micrométrica, resultando na precipitação do material extraído, que era coletado em um frasco Kitassato. O CO_2 gasoso escoava pelo medidor de vazão volumétrica e então era descartado para o ambiente. O material extraído coletado era pesado para a determinação da massa de extrato obtido. Em seguida era feito o cálculo do rendimento do extrato (Equação 3.3):

$$r = \frac{m_e}{m_i} x100 \qquad \text{Equação 3.3}$$

na qual r é o rendimento, m_e é a massa de extrato obtido e m_i é a massa seca de material triturado colocado na coluna de extração.

Uma das particularidades apresentadas pelos extratos de folhas de *S. reticulata* obtidos pela extração supercrítica era a alta retenção do CO_2 no mesmo, sendo necessário o tempo de 24 h entre a coleta do extrato e a pesagem para que o CO_2 fosse totalmente liberado.

Os extratos obtidos na extração com CO_2 supercrítico eram praticamente secos e pouco solúveis em água. Assim, para a análise subsequente da concentração de compostos fenólicos o produto da extração era dissolvido em 20 mL de etanol sendo, em seguida, diluído na proporção 1:100 em água.

No cálculo da densidade do CO_2 que fluía pela coluna de extração utilizou-se primeiramente a equação de Peng e Robinson (1976) (Equação 3.4) para a definição do volume molar:

$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{a(T)}{v(v+b)+b(v-b)} \qquad \text{Equação 3.4}$$

com $a = 045724\,\frac{R^2 T_c^2}{P_c}$ e $b = 0{,}07780\,\frac{RT_c}{P_c}$

na qual P é a pressão, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta, v é o volume molar, T_c e P_c são temperatura e pressão críticas, a e b são o parâmetro de atração e o co-volume de Peng e Robinson, respectivamente, específicos para cada fluido.

Para a determinação da densidade do CO_2 supercrítico nos experimentos utilizou-se a Equação 3.5:

$$\rho_{co_2} = \frac{MM_{co_2}}{v_{co_2}} \qquad \text{Equação 3.5}$$

na qual ρ_{co_2} é a densidade do CO_2 que passa pela coluna, MM_{co_2} é a massa molar do CO_2 e v_{co_2} é o volume molar do CO_2 que passa pela coluna de extração.

Nos ensaios de estudo de condições de extração foram utilizados 13,85 g de folhas trituradas (capacidade da coluna), pressões de 100, 200 e 300 bar, temperaturas de 40, 50 e 60°C, a vazão de CO_2 de 7,3 g/min e, o tempo de extração de 110 min. A densidade aparente do leito, constituído apenas de folhas de *S. reticulata*, nas extrações foi de 0,277 g/cm³. Nesses ensaios foram avaliados o rendimento em massa dos extratos obtidos e o teor de compostos fenólicos dos mesmos. O teor de proteínas não foi avaliado, pois estas moléculas não são extraídas neste tipo de extração com CO_2 supercrítico. A escolha das condições de pressão e temperatura estudadas nas extrações supercríticas deve-se ao fato de que a combinação destas oferece uma faixa ampla de densidade do CO_2 supercrítico, o que possibilitaria a extração de compostos com características variadas. A vazão de CO_2 e o tempo de extração foram selecionados de acordo com a razão massa de CO_2 pela massa do leito, de modo que a massa de CO_2 que passaria pela coluna seria o suficiente para garantir uma extração exaustiva da amostra.

3.2.7 Determinação da concentração de proteínas e compostos fenólicos

A concentração de proteínas em solução foi determinada pelo método modificado de Bradford (1976), de alta sensibilidade para uma faixa definida de concentração de proteína (até 25 μg/mL) usando BSA como referência para a obtenção da curva padrão. O procedimento constituiu em adicionar 500 μL de amostra a 500 μL de reagente Coomassie Plus e agitar a mistura em vórtex. Após repouso por 10 min, mede-se a absorbância em 595 nm.

Os compostos fenólicos em solução foram quantificados utilizando o método colorimétrico com azul da Prússia (PRICE e BUTLER, 1977) usando-se $FeCl_3$ e $K_3Fe(CN)_6$ como reagentes e D-catequina para a construção da curva padrão. Este procedimento consiste em adicionar 250 μL de solução de $FeCl_3$ 0,1 mol/L (preparada em solução de HCl 0,1 mol/L) e 250 μL de $K_3Fe(CN)_6$ 0,1 mo/L a 5,0 mL da amostra. Após a adição do último reagente, a solução permanecia em repouso por 10 min e então era feita a medida da absorbância a 720 nm.

3.2.8 Planejamento experimental fatorial para as extrações

Nas extrações aquosas (convencionais), estudou-se a variação de temperatura (10, 25 e 40 °C), pH (5, 7 e 9) e força iônica pela adição de cloreto de sódio (0, 50 e 100 mmol/L). O número de experimentos e a combinação das variáveis foram determinados através do planejamento experimental fatorial do tipo 2^3, com níveis +1 e –1 e 3 repetições no ponto central (PC, nível zero) conforme a Tabela 3.1 (RODRIGUES e IEMMA, 2005), resultando em 11 experimentos.

Tabela 3.1: Planejamento fatorial 2^3 para extrações em reator agitado convencional

Variável	Nível (-1)	Ponto Central	Nível (+1)
Temperatura (°C)	10	25	40
Força iônica (mmol/L)	0	50	100
pH	5,0	7,0	9,0

O ajuste de pH para o valor mais alto (pH 9,0) requereu o uso de uma quantidade de NaOH relativamente alta, resultando em um aumento significativo da força iônica da solução.

Assim, estimou-se a quantidade equivalente de NaCl que seria gerado pela neutralização desta massa de NaOH e, para os ensaios a pH 7,0 e 5,0 adicionou-se cristais de NaCl para se igualar a força iônica das soluções extrativas à força iônica equivalente dos ensaios a pH 9,0. Desta forma, a força iônica zero se refere a uma força iônica equivalente em NaCl daquela estimada para os ensaios em pH 9,0.

Para as extrações com CO_2 supercrítico elaborou-se um planejamento experimental fatorial do tipo 2^2, com níveis +1, -1 e 3 pontos centrais (nível zero) (RODRIGUES e IEMMA, 2005), resultando em sete experimentos (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Planejamento experimental fatorial 2^2 para extrações com CO_2 supercrítico

Variável	Nível (-1)	Ponto Central	Nível (+1)
Pressão (bar)	100	200	300
Temperatura (°C)	40	50	60

3.2.9 Produção dos extratos em escala preparativa para obtenção de quantidade de material para testes de atividade antifúngica

Para a produção de extratos em escala preparativa pelo método convencional foi utilizado um tanque cilíndrico com o volume interno de 1.000 mL e 8,6 cm de diâmetro interno, impelidor com quatro pás inclinadas (inclinação de 45º) com 5,2 cm de diâmetro. As condições de extração foram: agitação de 900 rpm; temperatura de 10, 25 e 40°C; pH de 5,0, 7,0 e 9,0 e o tempo de extração de 2 h. Utilizou-se 600 mL de solvente (água, etanol e água/etanol 50%) e 40 g de folhas secas de *S. reticulata*. Para essas extrações não foi adicionado NaCl no sistema, uma vez que a força iônica resultante da adição desse sal não apresentou efeito sobre a concentração de compostos fenólicos e proteínas nos extratos obtidos nos ensaios de estudos de condições. O produto da extração era coletado, seco em estufa a vácuo a 50°C por 48 h e posteriormente pesado para a determinação do rendimento em massa.

Na produção de extratos com fluido supercrítico em escala preparativa foi utilizada uma coluna com volume interno de 300 mL. As condições de extração foram: pressão de 100, 200 e 300 bar, temperatura de 40, 50 e 60°C que era controlada por resistências acopladas na própria

coluna. Foi utilizado CO_2 a uma vazão de 17,8 g/min e o tempo de extração de 240 min. A massa de folhas utilizadas nesses ensaios foi de 83,0 g. Após esse procedimento, produto da extração era coletado e pesado para a determinação do rendimento em massa.

3.2.10 Testes de atividade antifúngica dos extratos

Os testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Biologia do Centro de Estudos Superiores de Parintins - LB/CESP, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, sob a coordenação do Prof. Dr. Ademir Castro e Silva, pelo método de difusão em ágar adaptado de Auer e Bettiol (1986) que analisa o efeito dos extratos testados sobre o avanço da fronteira micelial dos fungos. Os extratos obtidos, foram dissolvidos em água ou etanol dependendo do extrato a ser testado, separadamente, adicionados ao meio BDA nas concentrações de 1,00 e 10,00 g/L, no caso dos extratos convencionais, e 1,00 e 5,00 g/L no caso dos extratos supercríticos.

O meio de cultura BDA fluente, com as diferentes concentrações de extratos dissolvidos, era vertido em placas de Petri. Após uma hora (tempo suficiente para o resfriamento e conseqüente solidificação do meio), um disco de micélio-ágar de 10 mm de diâmetro de colônias fúngicas purificadas em placas de Petri com meio BDA, era transferido para o centro das placas, que em seguida eram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa a 30°C. A avaliação do crescimento micelial era feita pela média de duas medidas perpendiculares do diâmetro da fronteira micelial realizadas diariamente. A quantificação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada com base no percentual de inibição de crescimento (PIC), que mede a atividade de cada extrato sobre o avanço da fronteira micelial das espécies fúngicas utilizadas segundo a Equação 3.6:

$$PIC\ (\%) = [(D_c - D_t) / D_c]\ 100 \qquad \text{Equação 3.6}$$

na qual D_c é o diâmetro da colônia na placa controle e D_t é o diâmetro da colônia na placa teste.

Para os testes com extratos aquosos as placas de controle geral eram constituídas apenas do meio BDA. Entretanto, para os testes com os extratos alcoólicos e supercríticos, além do

controle geral, foi necessária a utilização de placas de controle para etanol, nas quais era adicionado ao meio BDA um volume de etanol igual ao volume de extrato adicionado na placa teste, para análise da influência do etanol sobre o crescimento dos fungos.

Quanto às amostras fúngicas para estes ensaios, foram utilizadas três colônias codificadas como FI-09 (fungo de igapó), FI-03 (fungo de igapó) e FV-06 (fungo de várzea), que fazem parte da coleção de cepas do LB/CESP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor de umidade das folhas trituradas de *S. reticulata*

Os dados obtidos no processo de secagem das folhas trituradas de *S. reticulata* em dessecador nos permitiram afirmar que o material possui 8,6% de umidade em massa. Esse teor de umidade é considerado relativamente baixo se levarmos em consideração o processo de secagem (à sombra e temperatura ambiente, que na época variava entre 35 e 40°C), visando a preservação do material. Entretanto, é necessário registrar que, quando foi realizado o teste para a determinação de umidade, o material encontrava-se, havia algumas semanas, na cidade de Campinas-SP, mantida em freezer à 0°C.

O método de determinação de umidade utilizando dessecador apresenta como inconveniente um longo tempo para que a amostra atinja massa constante, devido à baixa temperatura de operação. Por outro lado, diminui significativamente o risco de perda de possíveis compostos presentes no material, por volatilização ou degradação, decorrentes da elevação da temperatura.

4.2 Tamanho e distribuição granulométrica

O resultado da distribuição granulométrica obtido do processo de peneiramento das folhas trituradas de *S. reticulata* (Tabela 4.1) mostra tratar-se de um material bastante heterogêneo do ponto de vista dos tamanhos de suas partículas, uma vez que o diâmetro variou entre 0,354 mm e 2,03 mm. O gráfico da distribuição granulométrica (Figura 4.1) mostra que 65% do material tem o diâmetro de partícula menor ou igual a 0,359 mm, podendo ser classificado como pó; o restante possui diâmetro médio que varia de 0,51 a 2,03 mm, em quantidades muito próximas e que podem ser classificados como sólidos granulares (GOMIDE, 1983).

Tabela 4.1: Distribuição granulométrica das folhas trituradas de *S. reticulata*

Peneiras (mesh)	$\overline{d}_{pi}$ (mm)	$\overline{d}_{p}$ (mm)	Massa da fração retida (g)	x
10	1,680	2,030	0,26	0,053
14	1,180	1,430	0,25	0,051
20	0,850	1,015	0,35	0,072
28	0,600	0,725	0,4	0,082
35	0,420	0,510	0,45	0,092
48	0,297	0,359	1,52	0,311
65	0,210	0,354	1,04	0,213
fundo	< 0,297	<0,297	0,62	0,127
Total			4,89	1,000

*Massa total = 5,000 g, x = fração retida

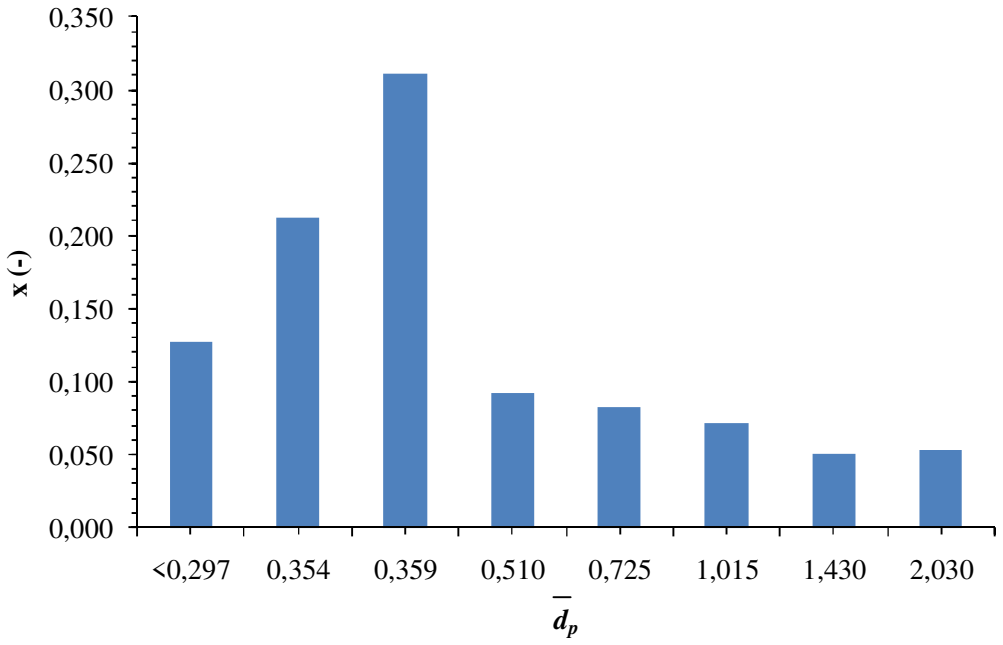


Figura 4.1: Distribuição granulométrica de folhas trituradas de *S. reticulata* a partir de dados obtidos pelo de peneiramento com peneiras de 10, 14, 20, 28, 35, 48 e 65 mesh. "x", frações retidas em cada peneira; "$\overline{d}_p$", o diâmetro médio de peneira.

A heterogeneidade do material pode estar relacionada à própria morfologia das folhas (Figura 4.2), pois estas apresentam partes menos resistentes (lâmina) e outras mais resistentes (nervuras), que podem facilitar ou não a redução no tamanho das partículas durante o processo de trituração.

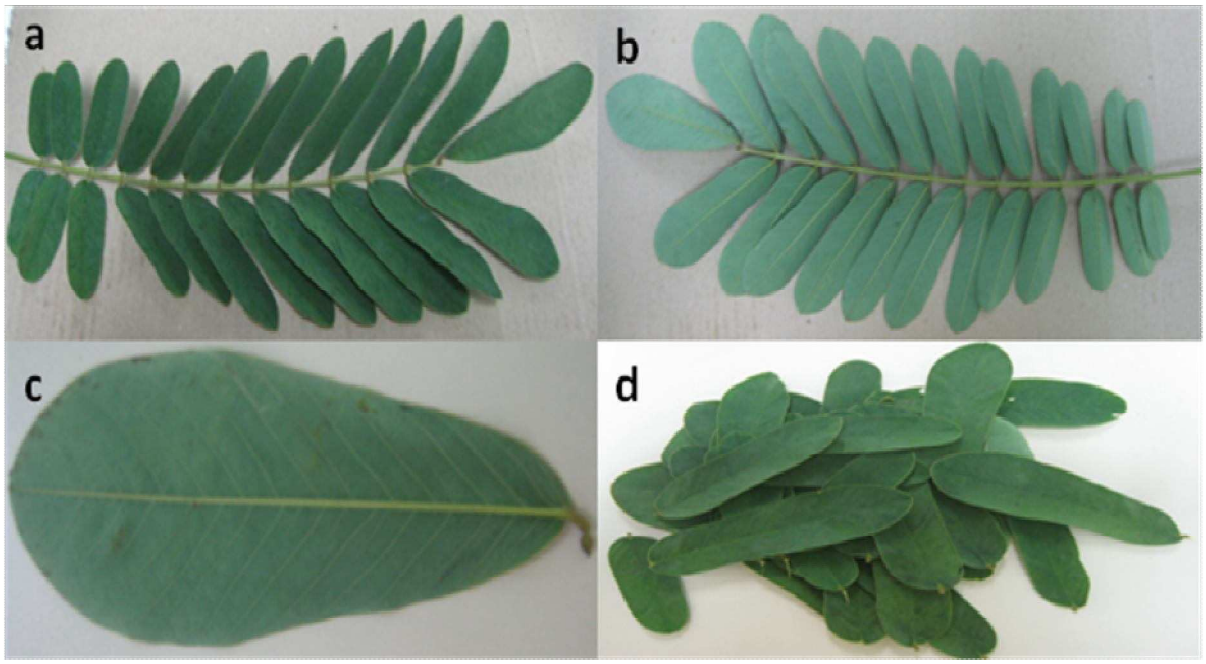


Figura 4.2: Amostras de folhas de *S. reticulata*: face adaxial (**a**); face abaxial (**b**); folíolo (**c**) folíolos na fase inicial de secagem (**d**).

4.3 Ensaios preliminares de adequação das condições operacionais para extração convencional

Nos ensaios preliminares, a proporção massa:volume (soluto:solvente) e a velocidade de agitação, foram fixadas em 1:15 e 900 rpm baseando-se apenas na observação visual do comportamento do conjunto soluto/solvente sob agitação no interior do tanque. Variou-se estes parâmetros de forma a se obter um conjunto de condições onde a suspensão de partículas tivesse uma fluidez intensa, sem excesso de líquido. Definida a razão massa:volume e a agitação, buscou-se definir um tempo de extração para a realização dos ensaios baseados no planejamento experimental. Para tal, ensaios de extração utilizando apenas água como solvente a 25°C e pH 7,0

tiveram amostras retiradas em diferentes intervalos de tempo. As amostras foram analisadas em termos de dois marcadores de eficiência de extração, proteínas e compostos fenólicos. O tempo de extração foi definido em 2,00 h, tempo no qual a concentração de proteína foi 0,51 g/L e a de compostos fenólicos foi 0,95 g/L, ou seja, 82,3 e 91,3% respectivamente das maiores concentrações registradas nos testes (Figura 4.3).

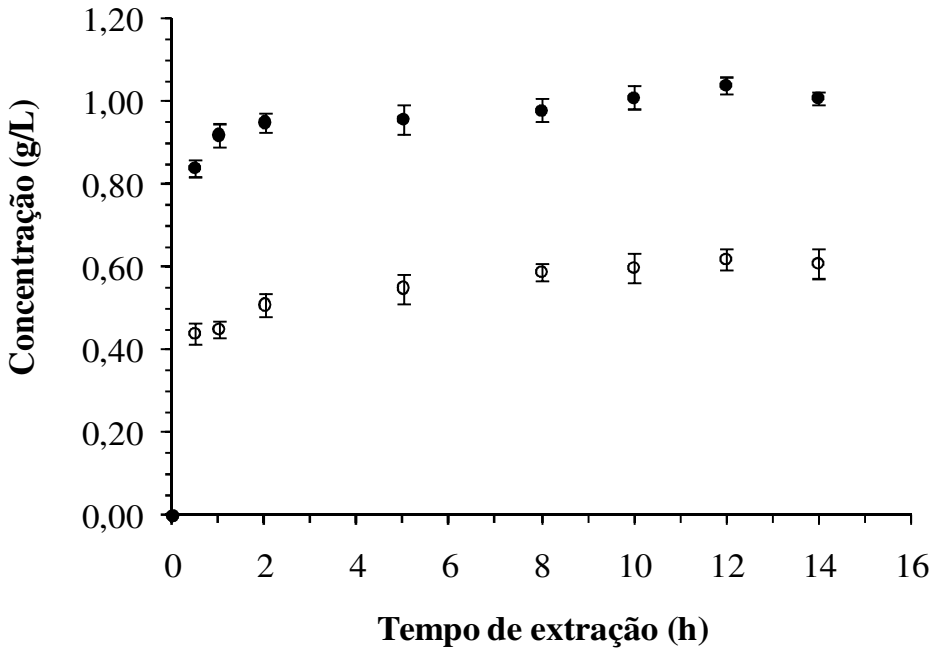


Figura 4.3: Concentrações de proteínas (○) e compostos fenólicos (●) para a determinação do tempo de extração convencional. As barras de erro representam o desvio padrão para n = 3. Extração com água a 25°C e pH 7,0.

4.4 Extrações convencionais aquosas

As extrações aquosas em tanque agitado (extração convencional) foram realizadas aleatoriamente de acordo com o planejamento experimental e os resultados estão apresentados na Tabela 4.2. Os maiores valores de concentração de proteínas e compostos fenólicos foram obtidos a temperatura de 40°C e pH 9,0 independentemente da força iônica da solução.

Tabela 4.2: Resultados dos ensaios de extração convencional de folhas de *S. reticulata* em tanque agitado utilizando água como solvente segundo o planejamento experimental fatorial do tipo 2^3 com níveis +1, -1 e 3 pontos centrais.

Ensaio	**Variáveis independentes**			**Resultados**	
	Temperatura (°C)	**Força iônica (mmol/L)**	**pH**	**Concentração de proteínas (g/L)**	**Concentração de fenólicos (g/L)**
1 C	40,0	100	9,0	1,09	1,13
2 C	40,0	100	5,0	0,29	0,75
3 C	40,0	0	5,0	0,36	0,88
4 C	10,0	0	5,0	0,02	0,48
5 C	10,0	0	9,0	1,01	0,80
6 C	10,0	100	5,0	0,06	0,55
7 C	10,0	100	9,0	0,88	0,90
8 C	40,0	0	9,0	1,18	1,12
9 C	25,0	50	7,0	0,62	0,90
10 C	25,0	50	7,0	0,62	0,90
11 C	25,0	50	7,0	0,62	0,90

Com os resultados da Tabela 4.2 e utilizando o programa estatístico da empresa Stat Soft Inc, STATISTICA "Data Analysis Software System" versão 7, obteve-se os diagrama de Pareto (Figura 4.4) dos valores dos efeitos de cada variável (temperatura, força iônica e pH) e de suas interações sobre a concentração de compostos fenólicos e concentração de proteínas, para determinar quais parâmetros realmente apresentavam influência estatística significativa ao nível de significância de 95% sobre o sistema no processo de extração desses compostos pelo método convencional.

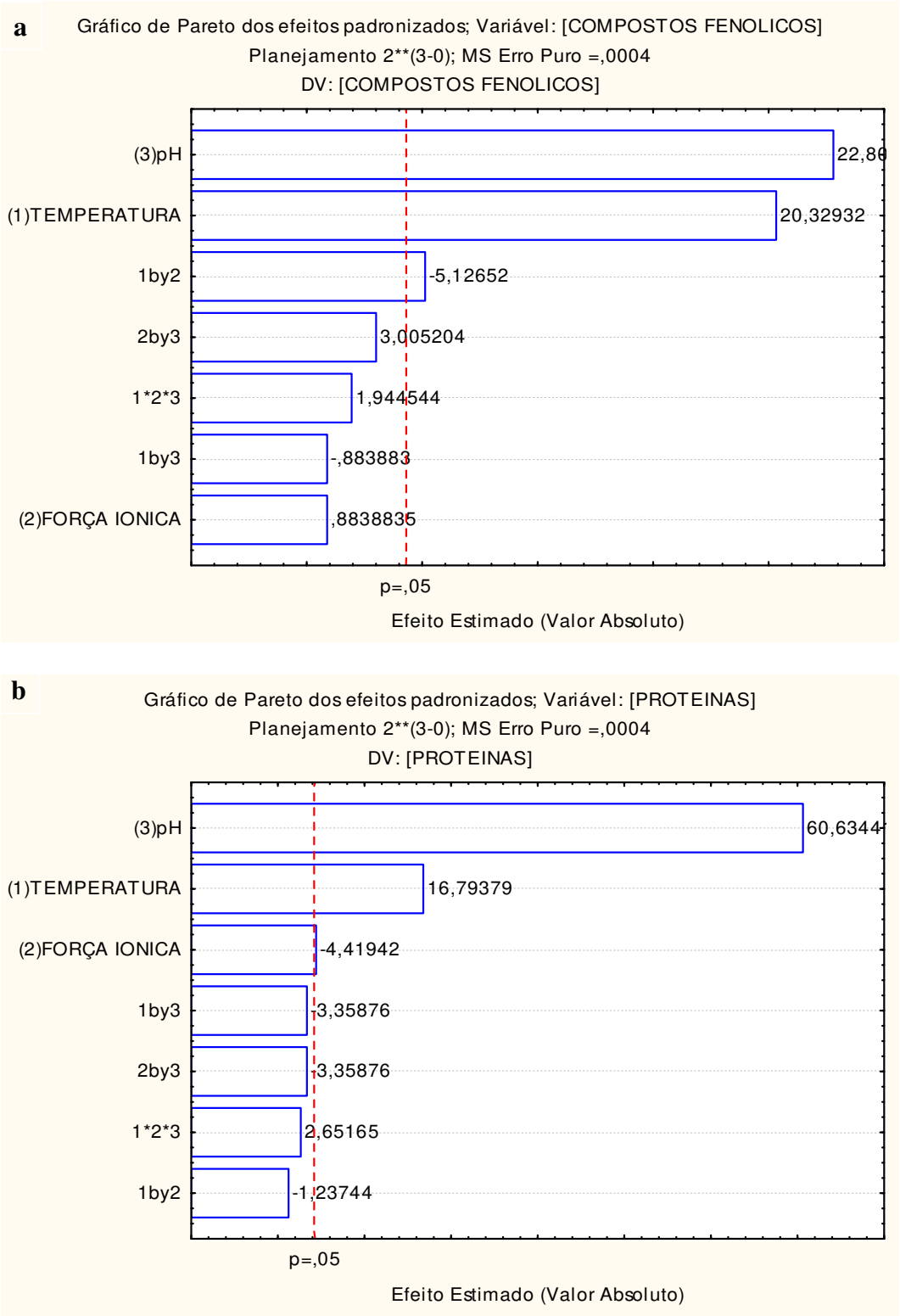


Figura 4.4: Gráficos de Pareto das variáveis de concentração de compostos fenólicos **(a)** e de proteínas **(b)**, presentes nos extratos aquosos de folhas de *S. reticulata*.

Para a concentração de compostos fenólicos (Figura 4.4 a), verificou-se que as variáveis pH e temperatura têm efeitos sobre a concentração dos extratos. A interação temperatura-força iônica também apresenta efeito, apesar de muito pequeno. A concentração de compostos fenólicos teve seu maior valor quando se utilizou os maiores valores para cada uma dessas variáveis.

No caso da concentração de proteínas (Figura 4.4 b) os parâmetros estatisticamente significativos são apenas pH e temperatura, sendo que a influência do pH em termos numéricos é aproximadamente quatro vezes maior que o efeito da temperatura. A concentração de proteínas nos extratos atingiu o seu maior valor quando os experimentos foram realizados utilizando os maiores valores para essas duas variáveis.

A utilização do Método de Superfície de Resposta (MSR) possibilitou o estudo do comportamento das variáveis simultaneamente e a determinação de regiões de altas concentrações de compostos fenólicos e proteínas. Uma vez que a força iônica não teve efeito significativo sobre a concentração de compostos fenólicos e proteínas nos extratos, o MSR foi utilizados apenas para demonstrar o efeito de temperatura e pH no sistema, ignorando assim o efeito da força iônica.

Na superfície de resposta do efeito de temperatura e pH sobre a concentração de compostos fenólicos (Figura 4.5) constata-se que os valores de concentração de compostos fenólicos aumentam mediante o aumento da temperatura e do pH da solução, chegando a 1,13 g/L quando a reação ocorre à temperatura é de 40 ºC e pH 9,0 (Tabela 4.2).

O aumento da temperatura melhora a solubilidade dos compostos fenólicos no solvente e diminui a viscosidade da água, facilitando a extração e ao mesmo tempo diminui a tendência à formação de complexos com proteínas, que são insolúveis em água; por outro lado, se a temperatura for muito elevada pode levar à degradação de alguns compostos (LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2004).

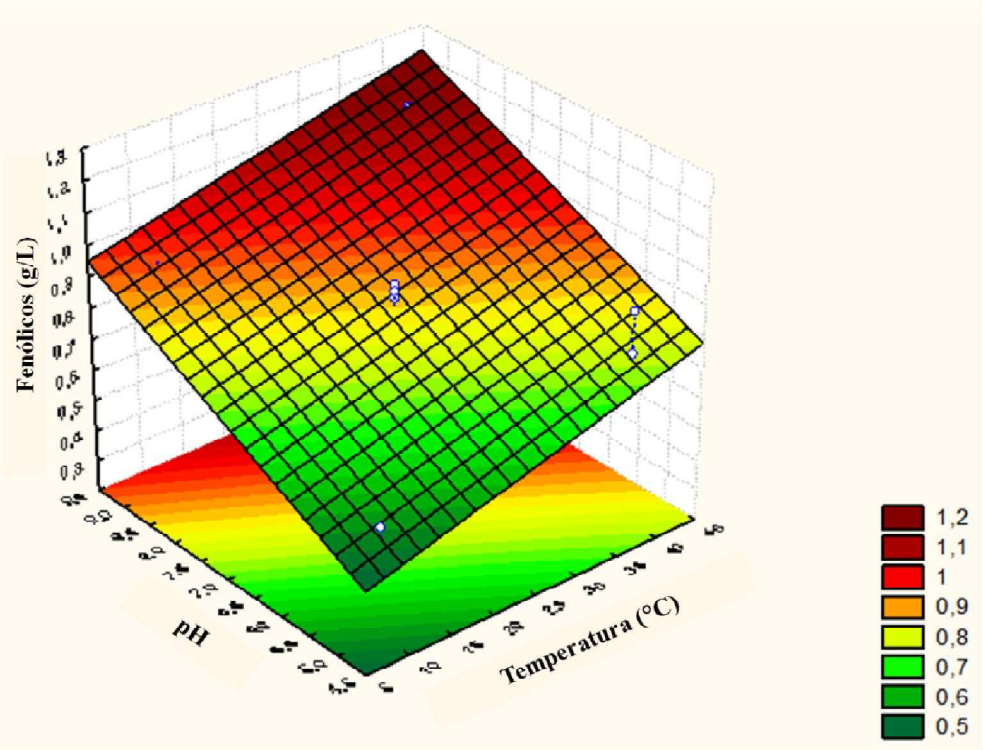


Figura 4.5: Superfície de resposta da concentração de compostos fenólicos em função das variáveis: temperatura e pH, para a extração aquosa de folhas de *S. reticulata.*

A influência do pH explica-se pelo fato de que compostos fenólicos que encontram-se livres são solubilizados por uma hidrólise ácida, enquanto fenólicos ligados à parede celular vegetal são liberados em pH alcalino (NACZK e SHAHIDI, 2004). A hidrólise alcalina tem sido empregada no isolamento de ácidos fenólicos de amostras de sucos cítricos, uva, café, cereais, sementes oleaginosas e plantas medicinais para determinar fenóis ligados. Muitos fenóis e particularmente ácidos fenólicos são encontrados em sua forma conjugada e a hidrólise alcalina libera esses fenóis (ROBARDS, 2003).

Na superfície de resposta do efeito de temperatura e pH sobre a concentração de proteína nos extratos (Figura 4.6) que também atingiu o seu maior valor (1,18 g/L) a 40ºC e pH 9,0 (Tabela 4.2). Os resultados mostraram que o efeito da temperatura sobre a concentração de proteínas nos extratos foi análogo àquele apresentado para a concentração de compostos fenólicos. Segundo Christopher et al. (1988), algumas proteínas exibem características de solubilidade retrograda, ou seja, a solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Entretanto, no presente experimento a concentração de proteínas nos extratos manteve-se crescente com o aumento da temperatura.

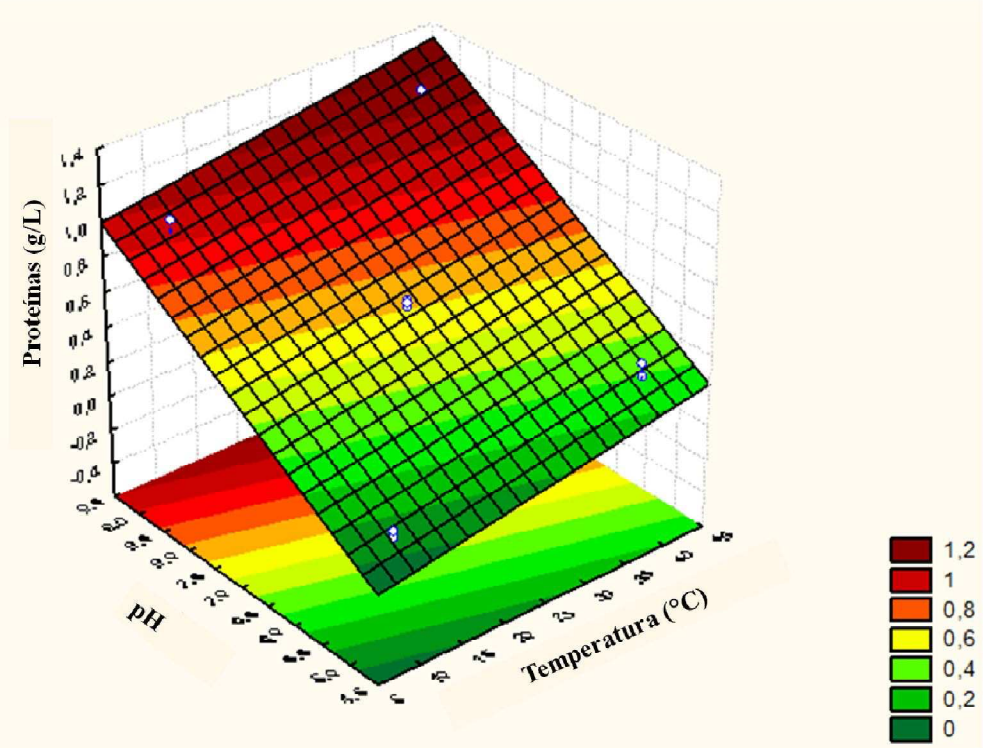


Figura 4.6: Superfície de resposta da concentração de proteínas em função das variáveis: temperatura e pH para a extração aquosa de folhas de *S. reticulata.*

O efeito do pH na extração de proteína pode ser explicado pelo rompimento das ligações entre proteínas e material insolúvel das plantas como a lignina (BRAVO, 1998). Seja o ponto isoelétrico (pI) da proteína ácido ou básico, o pH afeta a densidade de cargas e o balanço eletrostático intra e intermolecular, modificando a habilidade da proteína em participar das interações hidrofílicas e lipofílicas (DAMODARAN e PARAF, 1997; SGARBIERI, 1996). Quando as proteínas encontram-se em meio com o pH afastado do ponto isoelétrico aumenta a repulsão eletrostática proteína-proteína e facilita a interação proteína-água, aumentando sua solubilidade (ELIZALDE et al., 1996).

Entretanto, as superfícies de resposta tanto para a concentração de compostos fenólicos quanto para de proteínas não apresentam um ponto máximo e sim uma tendência crescente a qual sugere que esses valores de concentração podem ser aumentados com a elevação na temperatura e pH do sistema. Porém, existem limites de pH e temperatura que podem ser utilizados.

4.5 Extrações convencionais hidroalcoólicas

Para as extrações hidroalcoólicas, nas quais se variou a concentração de etanol de 0 a 100%, foi utilizada a condição de extração de temperatura 40ºC e pH 9,0 que resultou em uma maior concentração de proteínas e de compostos fenólicos nas extrações aquosas. Porém, a força iônica adotada (em termos de adição de NaCl) foi zero, uma vez que esta variável não teve influência na extração.

O ajuste do pH foi realizado pela adição de solução de NaOH 2 mol/L ao meio. Nos ensaios onde se utilizou apenas água como solvente foi necessária a adição de 170 µL da solução alcalina; no entanto, para os ensaios com 10% v/v de etanol em água o volume de NaOH adicionado ao meio foi de 240 µL. Esse volume foi o suficiente para o ajuste do pH (9,0) também nos ensaios com as outras concentrações de etanol, que variou de 0 a 100% na solução extratora. Os resultados das extrações hidroalcoólicas são apresentados na Figura 4.7.

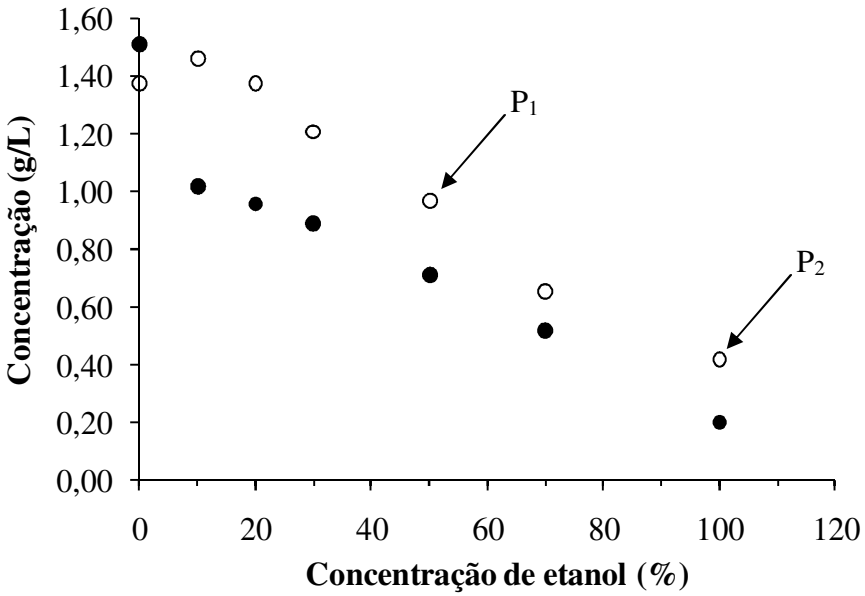


Figura 4.7: Teor de compostos fenólicos (○) e proteínas (●) em função da concentração de etanol na solução extratora. Experimentos realizados em duplicata com amplitude máxima para os compostos fenólicos 0,08 g/L e para proteínas 0,09 g/L. Temperatura, 40°C e pH = 9,0. P_1 e P_2 a serem discutidos à frente.

A Figura 4.7 mostra um decréscimo na concentração de compostos fenólicos e proteínas com o aumento da concentração de etanol na solução extratora. Evidencia-se, portanto, que a maior parte dos compostos fenólicos e proteínas contidas nas folhas de *S. reticulata* apresentam alta polaridade, portanto, são mais hidrossolúveis. Este resultado é paralelo ao resultado de Liyana-Pathirana e Shahidi (2004), que em trabalho de extração de compostos fenólicos de trigo observaram que a concentração de compostos fenólicos, medida pela atividade antioxidante, diminui com o aumento da concentração de solventes orgânicos (etanol, metanol ou acetona) ao meio.

4.6 Extrações com CO_2 supercrítico

As extrações com CO_2 supercrítico, de acordo com o planejamento experimental, foram realizadas aleatoriamente e os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Resultados para extração de folhas de *S. reticulata* com CO_2 supercrítico

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO_2 (g/cm³)	Massa total de extrato (g)	Rendimento em massa* (%)
1SC	300	60,0	0,831	0,395	2,24
2SC	200	50,0	0,762	0,234	1,76
3SC	100	60,0	0,298	0,089	0,64
4SC	200	50,0	0,762	0,250	1,76
5SC	100	40,0	0,562	0,144	1,04
6SC	200	50,0	0,762	0,248	1,76
7SC	300	40,0	0,928	0,288	2,08

*Referente à massa inicial de folhas trituradas na coluna de extração (13,85 g)

Os maiores rendimentos foram obtidos em alta pressão, 300 bar, com rendimento médio de 2,16% e os menores a baixa pressão, 100 bar, com 0, 64% de rendimento em média. Percebe-se que com o aumento da temperatura e pressão há um maior o rendimento. Os resultados obtidos são discutidos em termos de densidade, ou seja, em termos do poder de solvatação do dióxido de carbono supercrítico que varia de acordo com a variação da pressão e temperatura do sistema.

Através da equação cúbica de estado de Peng-Robinson foram calculadas as densidades do CO_2 nas temperaturas e pressões em questão e este parâmetro relacionado com o rendimento (Figura 4.8). A tendência geral foi que com o aumento da densidade há um aumento de rendimento. A melhor condição para a extração foi obtida a 300 bar e 60°C, cuja densidade é de 0,831 g/cm³. A pior condição foi obtida à 100 bar e 60°C, cuja densidade é de 0,298 g/cm³, ou seja, na condição na qual o dióxido de carbono supercrítico possui o menor poder de solvatação. No entanto, na extração realizada a 300 bar e 40°C, que registrou de 0,928 g/cm^3, não obedeceu essa tendência. Segundo Bahramifar et al. (2005), o aumento da densidade do fluido supercrítico com o aumento da pressão no sistema pode ocasionar dois efeitos opostos: a) o aumento no poder de solvatação do fluido, responsável pelo aumento no rendimento do extrato; b) maior dificuldade de penetração do fluido na matriz sólida, responsável pela diminuição no rendimento. Outro fator que pode ser considerado é o comportamento da solubilidade de compostos em fluidos supercríticos com o aumento da temperatura em pressões elevadas (REVERCHON, 1997).

Para a análise do planejamento foi utilizado o programa estatístico da empresa Stat Soft Inc, STATISTICA "Data Analysis Software System" versão 7, para o qual utilizou-se pressão e temperatura como variáveis independentes e o rendimento em massa como variável dependente. Os resultados que foram analisados através do gráfico de Pareto (Figura 4.9) mostram que na extração supercrítica para a extração compostos de folhas de *S. reticulata,* a pressão é a variável capaz de exercer influência sobre o rendimento dos extratos.

Porém, o maior rendimento em massa não necessariamente fornecerá extratos com maior teor de compostos fenólicos, que são os compostos alvos deste presente trabalho. Os resultados da análise da concentração de compostos fenólicos nos extratos estão apresentados na Tabela 4.4. As condições de maior e menor densidade nos forneceram extratos com teores de fenólicos (em relação à massa de extrato) que se assemelham, porém, com rendimentos em fenólicos (em

relação à massa de folha) muito diferentes entre si, 0,02 e 0,05%, respectivamente. Os resultados foram analisados através do gráfico de Pareto (Figura 4.10), segundo o qual, a variação da pressão influencia diretamente o teor de compostos fenólicos nos extratos obtidos nas extrações supercríticas com CO_2 de folhas de *S. reticulata*.

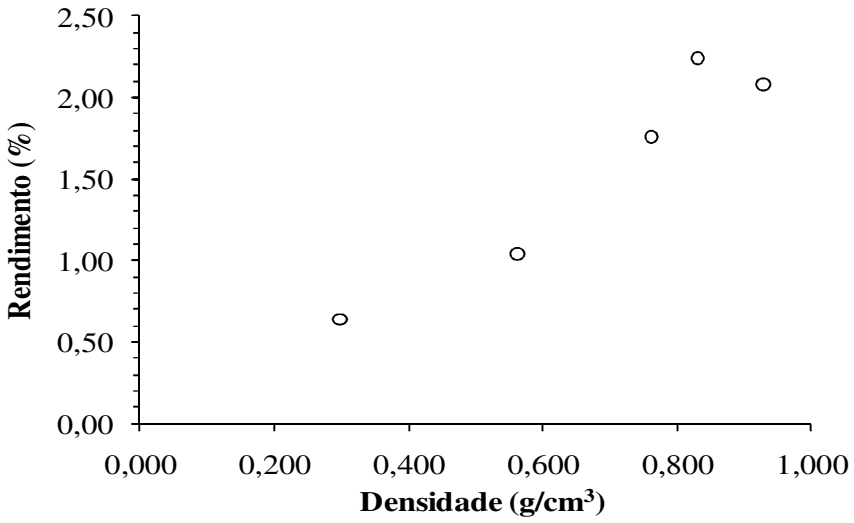


Figura 4.8: Rendimento em massa de extrato por massa de folhas com a variação da densidade do CO_2 na extração supercrítica das folhas de *S. reticulata.*

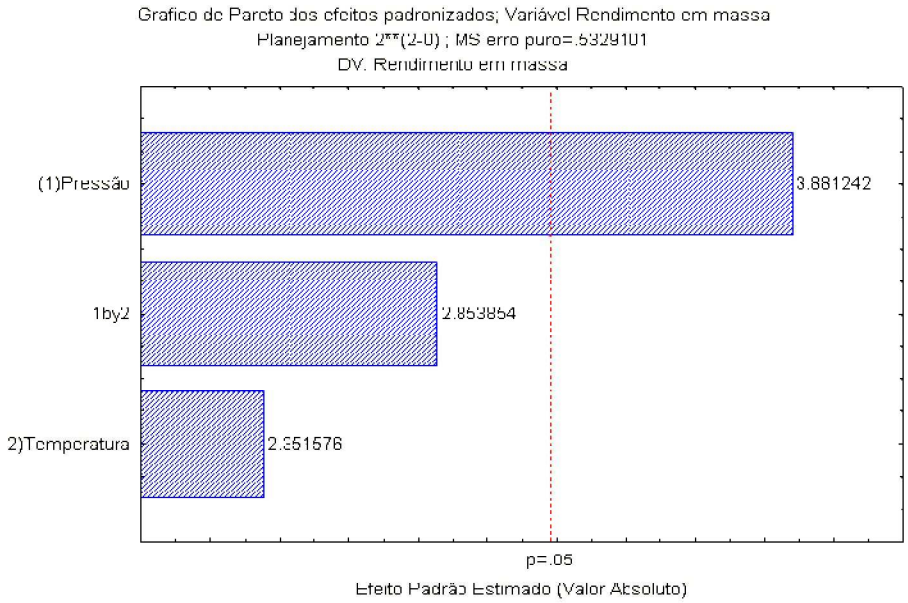


Figura 4.9: Análise de Pareto dos dados de rendimento em massa da extração de *S. reticulata* com CO_2 supercrítico.

Tabela 4.4: Resultados em teor e rendimento de fenólicos para as extrações de *S.reticulata*

Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa de fenólicos (mg)	*Teor de fenólicos (%)	**Rendimento em fenólicos (%)
1	300	60,0	6,83	2,21	0,05
2	200	50,0	5,49	2,35	0,04
3	100	60,0	2,12	2,38	0,02
4	200	50,0	5,38	2,15	0,04
5	100	40,0	2,69	1,87	0,02
6	200	50,0	5,41	2,18	0,04
7	300	40,0	6,42	2,23	0,05

*Em relação à massa de extrato obtido

**Em relação à massa inicial de folhas de *S. reticulata* (13,85 g)

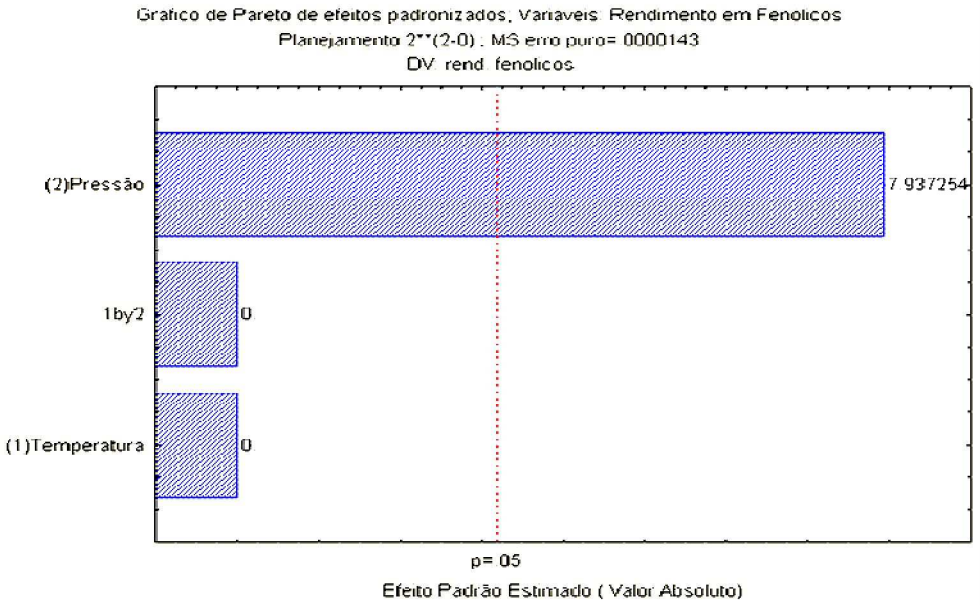


Figura 4.10: Análise de Pareto dos dados de teor de compostos fenólicos nos extratos de *S. reticulata* obtidos com CO_2 supercrítico.

4.7 Extração em escala preparativa de material para testes de atividade antifúngica

Nas extrações convencionais em escala preparativa, as condições de operação adotadas foram temperatura de 10, 25 e 40°C, pH 5,0, 7,0 e 9,0. A força iônica zero e o tempo de extração de 2 h foram mantidos, tendo a água como solvente. Além desses extratos, foram também selecionadas, extrações com etanol e com etanol 50% v/v em água, a 40ºC e pH 9,0 que foram as condições que apresentaram uma maior concentração de compostos fenólicos e de proteínas nos ensaios de estudo de condições com água. Os resultados de rendimento em massa dos extratos convencionais e supercríticos são apresentados na (Tabela 4.5) e (Tabela 4.6), respectivamente.

Nas extrações convencionais, em escala preparativa para teste de atividade antifúngica, os extratos obtidos, utilizando exclusivamente água como solvente (sem etanol), tiveram rendimentos em termos de massa de extrato por massa de folha, que variou entre 4,33 e 7,80%, com o maior rendimento para os extratos obtidos a 40°C e pH 9,0. Tal resultado indica a presença de compostos que têm sua solubilidade favorecida por hidrólise alcalina e temperatura elevada

Tabela 4.5: Resultados de rendimento dos extratos convencionais obtidos em escala preparativa para os testes de atividade antifúngica

Preparação	Ensaio de condição equivalente	Temperatura (°C)	pH	Solução extratora	Rendimento em massa (g)	*Rendimento (%)
A	P_2 Fig. 4.7	40,0	9,0	Etanol	1,906	4,77
B	P_1 Fig. 4.7	40,0	9,0	Etanol 50%	1,606	4,24
C	4C	10,0	5,0	Água	1,732	4,33
D	5C	10,0	9,0	Água	1,834	4,59
E	9, 10 e 11C	25,0	7,0	Água	2,192	5,48
F	3C	40,0	5,0	Água	2,573	6,43
G	8C	40,0	9,0	Água	3,118	7,80

* Em relação à massa inicial de folhas de *S. reticulata* (40,00 g)

facilitando o processo de extração. Por outro lado, os extratos obtidos com etanol 50 e 100%, nas mesmas condição de temperatura e pH, apresentaram valores de rendimento menores, muito próximos daqueles extraídos a baixas temperaturas e/ou pH em água. Esse fato pode estar relacionado com a composição da solução extratora, pois a adição do etanol à água gera um solvente de menor polaridade que a água e conseqüentemente de menor poder de solvatação.

Todos os percentuais de rendimento obtidos no presente trabalho são menores que os registrados por Castro (2005) que obteve 13,25% de rendimento em massa de extrato de folhas de *S. reticulata,* porém, essas extrações foram realizadas à quente em sistema do tipo Soxhlet por um período de 8 h utilizando etanol como solvente. Por outro lado, os percentuais obtidos neste trabalho são maiores que aqueles obtidos por Santos (2007), com a produção de extratos etanólicos de *S. reticulata* por maceração a frio por um período de dez dias cujo rendimento em massa foi de apenas 3,65%.

Tabela 4.6: Resultados de rendimento dos extratos supercríticos obtidos em escala preparativa para os testes de atividade antifúngica

Preparação	Ensaio de condição equivalente	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Massa total de extrato (g)	*Rendimento (%)	Variação do ensaio equivalente
H	3SC	100	60,0	0,207	0,25	- 61,0 %
I	5SC	100	40,0	0,980	1,18	+ 13,6 %
J	7SC	300	40,0	1,012	1,22	- 41,5 %
K	2, 4 e 6SC	200	50,0	1,351	1,63	- 7,5 %
L	1SC	300	60,0	1,516	1,83	- 36,0 %

* Em relação à massa inicial de folhas de *S. reticulata* (83,00 g)

Nas extrações feitas com CO_2 supercrítico o rendimento variou entre 0,25 e 1,83%. Esses resultados estão de acordo com os obtidos nos experimentos de estudo das condições de extração (Tabela 4.3) no que se refere à relação entre o rendimento e a densidade do fluido supercrítico. No entanto, apresentaram diferenças entre os rendimentos percentuais obtidos nos dois momentos. Esses resultados eram esperados, pois para essas extrações em escala preparativa não

foi realizado um estudo de ampliação de escala uma vez que, nesse momento, o objetivo das extrações era apenas a produção de extrato em uma quantidade suficiente para a realização dos testes de atividade antifúngica.

4.8 Testes de atividade antifúngica

Para os testes de atividade antifúngica, os sólidos dos ensaios em escala preparativa obtidos dos extratos após secagem dos mesmos foram dissolvidos em 20 mL de solvente: água foi o solvente para os sólidos oriundos de extrações aquosas, etanol 50% em água foi o solvente para o caso de extrações com 50% de etanol e etanol foi o solvente para o extrato obtido apenas com etanol e para todos os sólidos das extrações supercríticas (Tabelas 4.7 e 4.8).

Tabela 4.7: Concentração dos extratos convencionais nas soluções utilizadas nos testes de atividade antifúngica

	Condição de extração			
Preparação	**Temperatura (°C)**	**pH**	**Solvente (20 mL)**	**Concentração do extrato (g/L)**
A	40,0	9,0	Etanol	95,3
B	40,0	9,0	Etanol 50%	80,3
C	10,0	5,0	Água	86,6
D	10,0	9,0	Água	91,7
E	25,0	7,0	Água	109,6
F	40,0	5,0	Água	128,7
G	40,0	9,0	Água	156,0

Etanol 50% = solução de um volume de etanol com um volume de água

Tabela 4.8: Concentração dos extratos supercríticos nas soluções utilizadas nos testes de atividade antifúngica

Preparação	Condição de extração			
	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Solvente (15 mL)	Concentração do extrato (g/L)
H	100	60,0	Etanol	13,8
I	100	40,0	Etanol	65,3
J	300	40,0	Etanol	67,5
K	200	50,0	Etanol	90,1
L	300	60,0	Etanol	233,2

4.8.1 Testes de atividade antifúngica dos extratos convencionais

Os resultados de atividade antifúngica são aqui apresentados, primeiramente, como valores de percentual de inibição de crescimento (PIC), que mede a eficiência antifúngica dos extratos frente ao avanço da fronteira micelial dos fungos em crescimento em placa de Petri. Os extratos foram testados nas concentrações 1,00 g/L e 10,00 g/L, respectivamente. Para os extratos que tiveram valores de PIC acima de 50%, são apresentados gráficos que mostram o efeito dos extratos sobre o crescimento fúngico durante o tempo de incubação.

Os resultados de PIC obtidos nos testes com concentração 1,00 g/L dos extratos de *S. reticulata* (Tabela 4.9), mostraram haver atividade antifúngica em todos os extratos. Nesses experimentos, a colônia fúngica FI-09 demonstrou maior sensibilidade aos extratos uma vez que seu crescimento sofreu a influência de todos os extratos testados, além de exibir os maiores valores de PIC, em todos os testes.

Dentre os extratos, as diferentes condições de extração resultaram em diferentes efeitos sobre o crescimento fúngico. Dos extratos testados, apenas três (B, E e G) apresentaram atividade frente a todas as três cepas fúngicas.

Tabela 4.9: Percentual de inibição de crescimento (PIC) dos extratos convencionais de folhas de *S. reticulata* na concentração 1,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06.

Preparação	Cepa fúngica	Crescimento micelial teste* (cm)	Crescimento micelial controle* (cm)	Tempo de incubação (dias)	PIC (%)
A	FI-09	6,8	8,6	7	20,9
	FI-03	7,5	8,3	7	4,8
	FV-06	9,0	9,0	7	-
B	FI-09	4,2	9,0	7	53,3
	FI-03	7,6	9,0	6	10,0
	FV-06	5,9	9,0	6	27,8
C	FI-09	4,3	9,0	4	52,2
	FI-03	9,0	9,0	7	-
	FV-06	9,0	9,0	7	-
D	FI-09	7,0	9,0	4	22,2
	FI-03	9,0	9,0	7	-
	FV-06	9,0	9,0	7	-
E	FI-09	7,0	9,0	4	22,2
	FI-03	8,5	9,0	7	5,6
	FV-06	8,1	9,0	7	10,0
F	FI-09	8,3	9,0	4	7,8
	FI-03	9,0	9,0	7	-
	FV-06	8,7	9,0	7	3,3
G	FI-09	4,9	9,0	4	45,6
	FI-03	8,2	9,0	7	8,9
	FV-06	8,6	9,0	7	4,4

O PIC dos testes com os extratos A e B foi calculado entre a placa teste (extrato dissolvido em etanol) e a placa controle com etanol e nos testes com os extratos C, D, E, F e G o PIC foi calculado entre a placa teste (extrato aquoso) e a placa controle (geral). *Médias do crescimento em três placas.

O extrato B (obtido com etanol 50% (v/v), pH 9,0 e 40°C), apesar de apresentar concentração de fenólicos mais baixa do que aquelas apresentadas pelos extratos obtidos quando se utilizou apenas água como solvente, resultou em valores de PIC de 10,0 a 53,3%. Esses resultados mostram que nessas condições de temperatura e pH, o extrato obtido apresenta maiores teores de compostos com atividade antifúngica, que podem ser compostos fenólicos que encontram-se ligados a outros compostos e são extraídos em pH alcalino. O extrato E (obtido com água a 25°C e pH 7,0) também apresentou atividade sobre o crescimento das três cepas fúngicas apesar de ter seus valores de PIC baixos quando comparado com os do extrato B, o mesmo acontecendo com o extrato G (obtido com água a 40°C e pH 9,0).

Os resultados mais expressivos (PIC maior ou igual a 50%) nos testes de atividade antifúngica dos extratos B e C na concentração 1,00 g/L são apresentados nos gráficos de avanço da fronteira micelial da cepa fúngica FI-09 (Figuras 4.11 e 4.12, respectivamente).

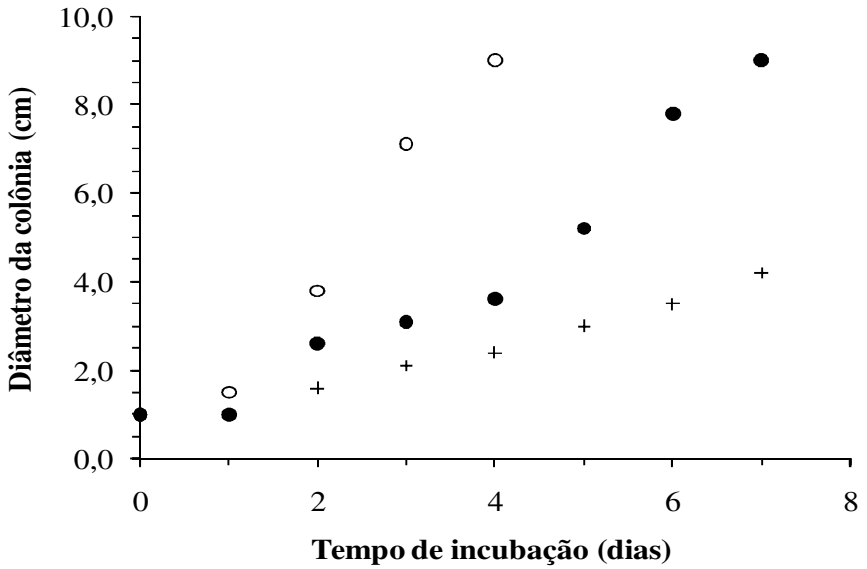


Figura 4.11: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40ºC, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 1,0 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,4 cm).

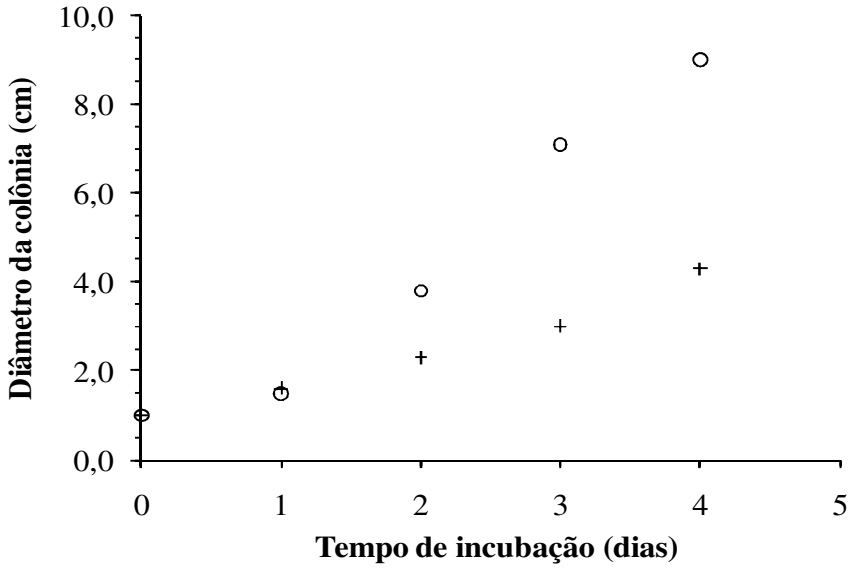


Figura 4.12: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato C (extração a 10ºC, pH 5,0 com água) na concentração 1,0 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato C (amplitude de 0,4 cm).

Para o crescimento da cepa fúngica FI-09 frente o extrato B (Figura 4.11), observa-se que as placas de controle geral apresentaram crescimento lento nas primeiras 24 h seguido de uma fase de crescimento rápido e constante, fase esta definida por McMeekin et al. (1993) como fase de crescimento exponencial, na qual todo o metabolismo do microrganismo está direcionado para a produção de novas células, fisiologicamente idênticas. Esse comportamento seguiu até o quarto dia, período no qual a cepa atingiu o tamanho total da placa de Petri. Nas placas de controle com etanol não houve avanço da fronteira micelial nas primeiras 24 h. Segundo McMeekin et al. (1993) essa fase é conhecida como "lag phase" (período de adaptação do microrganismo ao meio). Em seguida a cepa fúngica passa a ter crescimento acelerado entre o primeiro e o segundo dia. Após o segundo dia, o crescimento é lento, porém constante, até o sétimo dia quando atinge o diâmetro total da placa. Assim, evidencia-se a influência do etanol sobre o crescimento fúngico, motivo pelo qual o PIC para a placa teste foi calculado levando-se em consideração o controle com etanol. A placa teste também apresentou uma fase lag nas primeiras 24 h, seguido de uma fase de crescimento mais lento em relação ao controle com etanol e, ao final de sete dias, atingiu 46,3% do diâmetro total da placa.

No caso do crescimento da cepa fúngica FI-09 frente o extrato C (Figura 4.12), observa-se que tanto o controle geral quanto o teste têm um pequeno avanço da fronteira micelial nas primeiras 24 h. A partir do segundo dia, o crescimento das cepas é diferenciado. A cepa da placa controle apresenta um crescimento acelerado até o quarto dia, quando atinge o diâmetro total da placa, enquanto a cepa da placa teste tem crescimento mais lento chegando ao quarto dia com o diâmetro menor que 50% do diâmetro total da placa.

O aumento da concentração dos extratos no meio de cultura de 1,00 para 10,00 g/L propiciou aumentos significativos nos valores de PIC (Tabela 4.10). O aumento da concentração dos extratos no meio teve influência direta no crescimento das cepas fúngicas, pois, esse aumento na concentração resultou no aumento da atividade antifúngica mesmo que em proporções diferentes para cada caso. Esses resultados nos permitem afirmar que em todos os extratos de folhas de *S. reticulata*, obtidos pelo processo convencional, existem compostos com ação antifúngica que estão presentes em concentrações que variam de acordo com as condições de temperatura, pH ou solvente em que foram obtidos.

Os resultados obtidos nos testes com os extratos na concentração 10,00 g/L, o extrato A (extrato etanólico), as placas contendo BDA com etanol e BDA com extrato não apresentaram avanço da fronteira micelial, ou seja, a presença do etanol inibiu totalmente o crescimento fúngico, sendo impossível detectar a atividade real do extrato.

Com exceção do teste do extrato C com a cepa FI-03, em todos os outros casos houve atividade antifúngica dos extratos frente às cepas com resultados de PIC que variaram de 5,6 a 73,3%. Novamente, o extrato B (hidroalcoólico) apresentou melhor resultado, com valores de PIC acima de 50% para as três cepas fúngicas testadas. Como era previsto, a cepa fúngica FI-09 foi a aquela que demonstrou maior sensibilidade à presença dos extratos no meio.

Os resultados que apresentaram PIC acima de 50% nos testes de atividade antifúngica dos extratos de *S. reticulata* na concentração 10,00 g/L (teste com extrato B com as cepas FI-09, FI-03 e FV-06, do extrato C frente a cepa FI-09 e do extrato D frente à cepa FV-06) são apresentados nos gráficos de avanço da fronteira micelial da cepa fúngica durante o tempo de incubação (Figuras 4.13 a 4.17).

Tabela 4.10: Percentual de inibição de crescimento (PIC) dos extratos convencionais de folhas de *S. reticulata* na concentração 10,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06.

Preparação	Cepa fúngica	Crescimento micelial teste* (cm)	Crescimento micelial controle* (cm)	Tempo de incubação (dias)	PIC (%)
A	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
B	FI-09	2,4	9,0	9	73,3
	FI-03	4,3	9,0	14	52,2
	FV-06	2,8	9,0	13	68,9
C	FI-09	4,5	9,0	4	50,0
	FI-03	9,0	9,0	7	-
	FV-06	8,5	9,0	7	5,6
D	FI-09	4,8	9,0	4	46,7
	FI-03	7,0	9,0	7	22,2
	FV-06	4,3	9,0	7	52,2
E	FI-09	5,1	9,0	4	43,3
	FI-03	5,6	9,0	7	37,8
	FV-06	5,5	9,0	7	38,9
F	FI-09	5,5	9,0	4	38,9
	FI-03	6,6	9,0	7	26,7
	FV-06	6,1	9,0	7	32,2
G	FI-09	4,9	9,0	4	45,6
	FI-03	6,5	9,0	7	27,8
	FV-06	6,6	9,0	7	26,7

O PIC dos testes com os extratos A e B foi calculado entre a placa teste (extrato dissolvido em etanol) e a placa controle com etanol e nos testes com os extratos C, D, E, F e G o PIC foi calculado entre a placa teste (extrato aquoso) e a placa controle (geral). *Médias do crescimento em três placas.

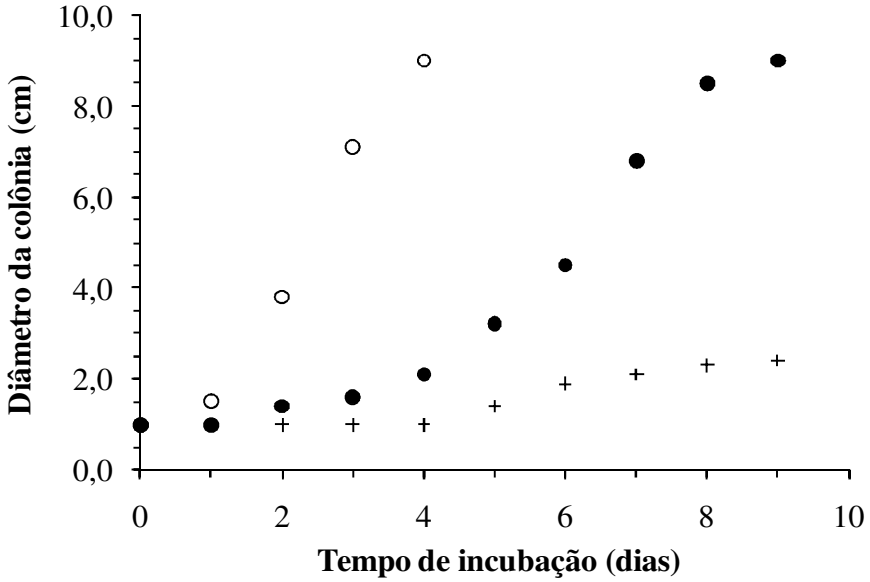


Figura 4.13: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40ºC, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm).

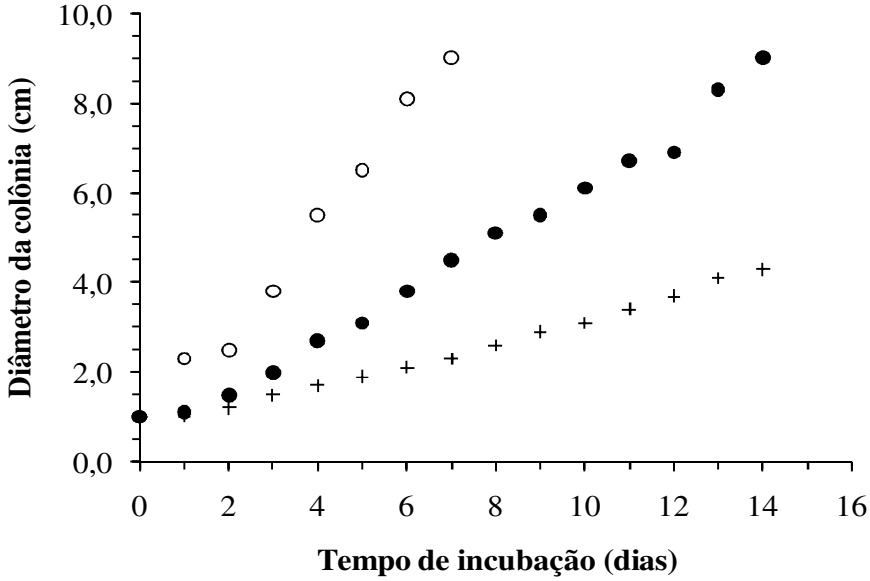


Figura 4.14: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40ºC, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-03. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm).

No teste do extrato B com a cepa fúngica FI-09 (Figura 4.13), a placa controle com etanol mostrou uma fase lag inicial seguida de crescimento mais lento que culmina com o preenchimento total da placa pela cepa fúngica. Nesse tratamento, a presença do etanol aumentou de 4 para 9 dias o tempo necessário para que a cepa atingisse o diâmetro total da placa. Na placa teste, a fase lag perdurou por 4 dias, tempo em que a cepa fúngica precisou para se adaptar à presença do extrato no meio de cultura, seguida de crescimento muito mais lento do que o crescimento apresentado no controle com etanol. Assim, depois de 9 dias de incubação o diâmetro da cepa atingiu aproximadamente 25% do diâmetro total da placa.

O teste do extrato B frente à cepa fúngica FI-03 (Figura 4.14) mostrou na placa controle geral um forte crescimento constante, atingindo o diâmetro máximo da placa em 7 dias. Para o controle com o etanol, esse crescimento foi mais lento e o tempo para que a cepa atingisse o diâmetro total da placa foi de 14 dias. A placa teste com extrato apresentou crescimento lento durante todo o período de incubação, nesse teste o diâmetro da cepa fúngica atingiu 47,8% do diâmetro da placa.

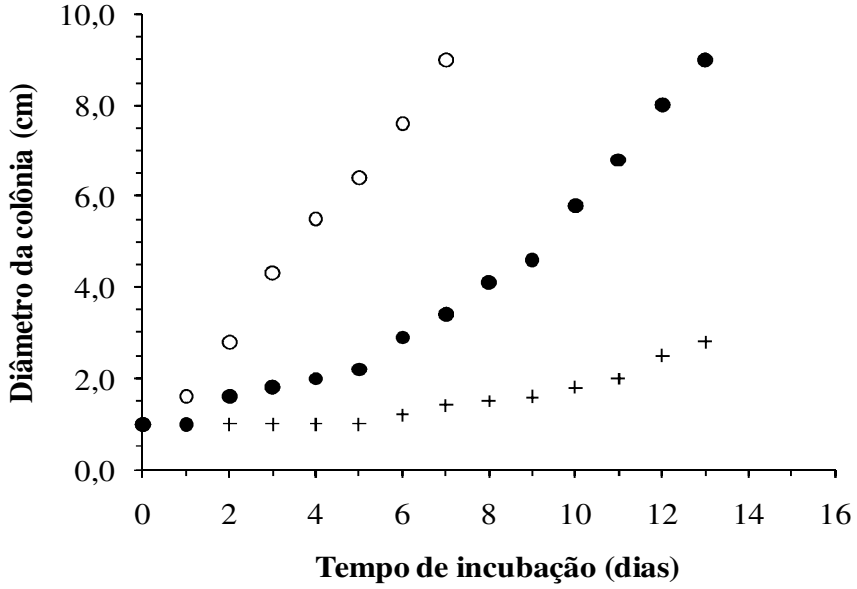


Figura 4.15: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato B (extração a 40ºC, pH 9,0 com etanol 50%) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FV-06. (+) teste com extrato B; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato B (amplitude de 0,3 cm).

O teste do extrato B frente à cepa fúngica FV-06 (Figura 4.15) mostrou na placa controle geral um crescimento rápido e constante, atingindo o diâmetro máximo da placa em 7 dias. No controle com etanol, esse crescimento foi mais lento. A placa teste com extrato apresentou a fase lag mais longa (5 dias) entre todos os testes, seguida de um crescimento tão lento que ao final do período de incubação o diâmetro da cepa fúngica atingiu apenas 31,0% do diâmetro total da placa.

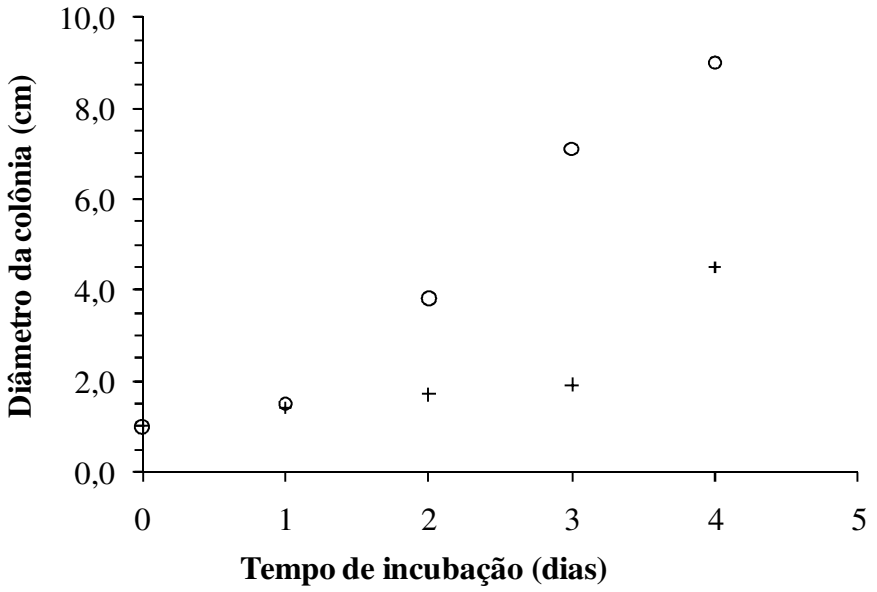


Figura 4.16: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato C (extração a 10ºC, pH 5,0 com água) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato C (amplitude de 0,3 cm).

No teste do extrato C com a cepa fúngica FI-09 (Figura 4.16), o crescimento das colônias das placas de controle geral foi rápido, em relação ao teste com extrato até o final do período de incubação (4 dias). Enquanto a cepa da placa teste com extrato continuou a sua fase de adaptação ao meio apresentando crescimento lento até o terceiro dia a partir do qual a cepa, totalmente adaptada ao meio, teve o seu crescimento acelerado até o final do período de incubação, quando alcançou 50% do diâmetro total da placa.

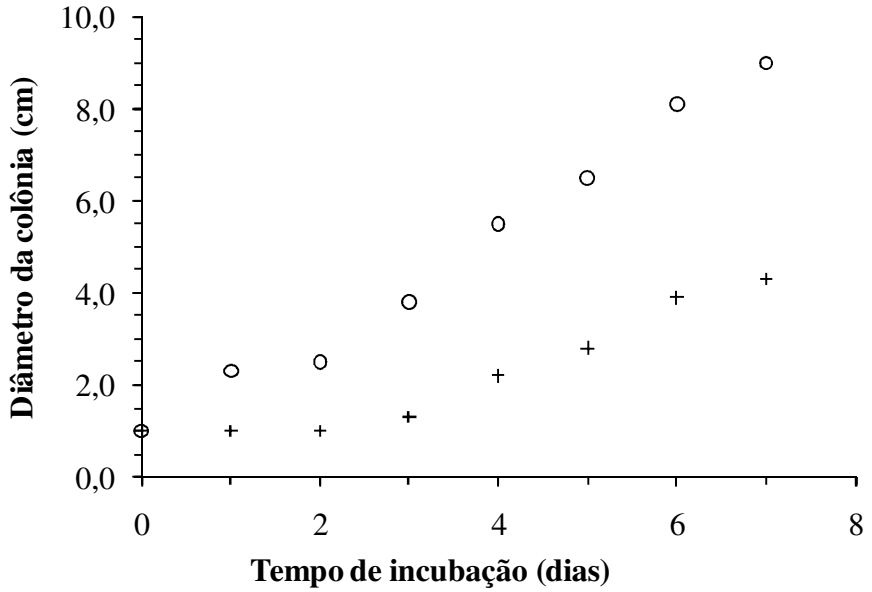


Figura 4.17: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato D (extração a 10ºC, pH 9,0 com água) na concentração 10,00 g/L frente a cepa fúngica FV-06. (+) teste com extrato C; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato D (amplitude de 0,4 cm).

No teste do extrato D com a cepa fúngica FV-06 (Figura 4.17), as cepas das placas teste tiveram crescimento considerado normal atingindo o limite da placa em 7 dias. A placa teste apresentou "lag phase" durante os primeiros 2 dias a partir do qual as cepas iniciaram o avanço de sua fronteira micelial até o final do período de incubação, quando atingiram 47,8% do diâmetro total da placa.

4.8.2 Testes de atividade antifúngica dos extratos supercríticos

Os resultados de atividade antifúngica para os extratos obtidos com CO_2 supercrítico são aqui apresentados como valores de PIC. Os extratos foram testados nas concentrações 1,00 g/L e 5,00 g/L. Para os extratos que apresentaram os maiores valores de PIC são apresentados os gráficos que mostram o efeito desses extratos sobre o crescimento fúngico durante o tempo de incubação.

Os resultados dos testes de atividade antifúngica dos extratos supercríticos na concentração 1,00 g/L mostraram que os extratos nessa concentração exercem pequena ou nenhuma atividade contra o crescimento das cepas fúngicas utilizadas (Tabela 4.11).

A necessidade de um volume elevado de etanol na dissolução do extrato H levou à adição ao meio BDA de um volume do extrato, próximo a 10% do volume total de meio. Essa concentração de etanol no meio de cultura provocou a inibição total das cepas fúngicas tanto na placa teste quanto na placa controle com o etanol.

Tabela 4.11: Percentual de inibição de crescimento (PIC) dos extratos supercríticos de folhas de *Senna reticulata* na concentração 1,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06.

Preparação	Cepa fúngica	Crescimento micelial teste* (cm)	Crescimento micelial controle* (cm)	Tempo de incubação (dias)	PIC (%)
H	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
I	FI-09	6,4	8,5	7	24,7
	FI-03	8,2	9,0	6	8,9
	FV-06	7,9	8,8	7	10,2
J	FI-09	8,2	8,2	4	-
	FI-03	9,0	9,0	7	-
	FV-06	7,7	8,7	5	11,5
K	FI-09	8,2	8,5	4	3,5
	FI-03	8,8	8,8	6	-
	FV-06	8,7	9,0	6	3,3
L	FI-09	9,0	9,0	4	-
	FI-03	8,9	9,0	6	1,1
	FV-06	8,5	9,0	6	4,4

O PIC dos testes com os extratos foi calculado entre a placa teste (extrato dissolvido em etanol) e a placa controle com etanol. *Médias do crescimento em três placas.

Nos outros testes onde a concentração de etanol no meio variou de 0,43 a 1,53%, a influência do álcool sobre o crescimento fúngico foi minimizado. Entre as cepas fúngicas, a cepa FV-06 foi a que sofreu interferência da presença do extrato em todos os testes em que foi possível se medir o PIC. Nesses testes, os melhores resultados foram demonstrados pelo extrato I (40°C e 100 bar) com PIC sobre as três espécies fúngicas que variou de 8,9 a 24,7%. O comportamento do avanço da fronteira micelial da cepa fúngica FI-09 durante o tempo de incubação frente ao extrato I é apresentado na Figura 4.18. Neste teste, o avanço da fronteira micelial da cepa fúngica comportou-se de forma parecida nas placas controle geral e controle com etanol. No entanto, na placa teste com extrato, o crescimento foi mais lento em relação aos controles, comportamento que fez com que ao final do período de incubação (4 dias) a cepa atingisse 71% do diâmetro total da placa.

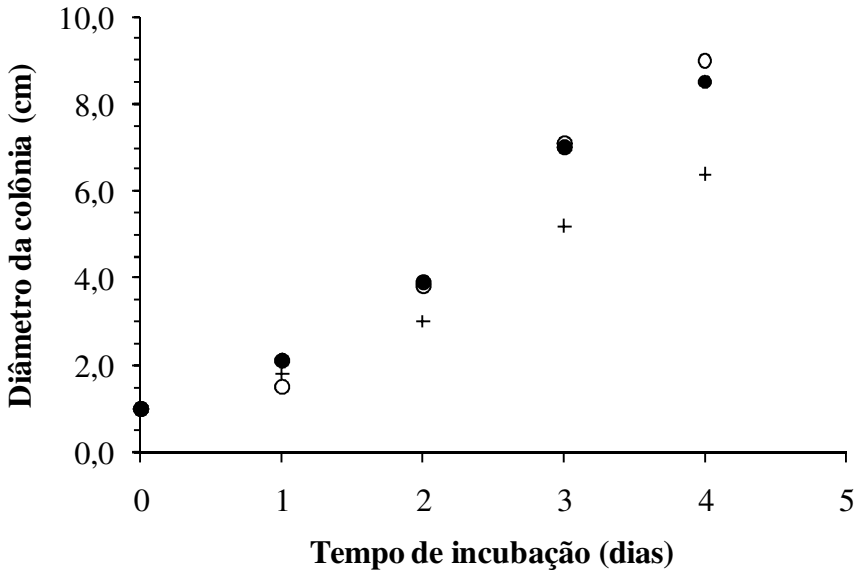


Figura 4.18: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato I (extração a 40ºC e 100 bar) na concentração 1,00 g/L frente a cepa fúngica FI-09. (+) teste com extrato I; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato I (amplitude de 0,4 cm).

A atividade antifúngica desse extrato pode estar relacionada com a presença de terpenos no mesmo, pois, estudos revelaram a presença de grande percentual desse composto em extratos vegetais obtidos nessas mesmas condições de temperatura e pressão (REVERCHON, 1997). Terpenos são compostos orgânicos formados por unidades de isoprenos, usualmente derivados de fontes naturais, principalmente como constituintes de óleos essenciais encontrados em flores,

frutos, sementes, raízes, folhas, pêlos glandulares e canais oleíferos. Podem ser extraídos por arraste a vapor de água, solventes orgânicos, prensagem ou CO_2 supercrítico. Muitos terpenos são hidrocarbonetos, mas compostos oxigenados, como alcoóis, aldeídos ou cetonas (terpenóides), também são encontrados. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os terpenos têm atividades antibacterianas, antifúngicas e anticâncer (DEWICK, 2002).

Nos testes com a concentração de extratos a 5,00 g/L (Tabela 4.12), com exceção do extrato L, o volume de etanol acrescido ao meio (aproximadamente 10% v/v) inibiu totalmente o crescimento fúngico nas placas testes e controle com etanol. Apenas no teste com o extrato L (extração a 60°C e 300 bar), a concentração de etanol no meio (2,15% v/v) permitiu o

Tabela 4.12: Percentual de inibição de crescimento (PIC) dos extratos supercríticos de folhas de *Senna reticulata* na concentração 5,00 g/L sobre o crescimento das cepas fúngicas FI-09, FI-03 e FV-06.

Preparação	Cepa fúngica	Crescimento micelial teste* (cm)	Crescimento micelial controle* (cm)	Tempo de incubação (dias)	PIC (%)
H	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
I	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
J	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
K	FI-09	-	-	7	-
	FI-03	-	-	7	-
	FV-06	-	-	7	-
L	FI-09	7,4	8,5	4	13,0
	FI-03	6,0	8,7	7	31,0
	FV-06	7,7	9,0	7	14,4

O PIC dos testes com os extratos foi calculado entre a placa teste (extrato dissolvido em etanol) e a placa controle com etanol. *Médias do crescimento em três placas.

crescimento das cepas fúngicas e, assim, foi possível a observação do crescimento em todas as placas. Nos testes do extrato L com as cepas fúngicas FI-09 e FI-03 o etanol teve interferência, mesmo que pequena, e com a cepa FV-06 essa interferência não foi registrada. Nos três testes, o extrato L apresentou aumento de atividade antifúngica com o aumento da concentração. O resultado mais expressivo do extrato L foi frente a cepa FI-03, onde o PIC alcançou 31% é apresentado na Figura 4.17 que mostra o crescimentos constantes para as três placas (teste, controle geral e controle com etanol), mas de forma mais lenta na placa teste, que atingiu 67% do diâmetro total da placa.

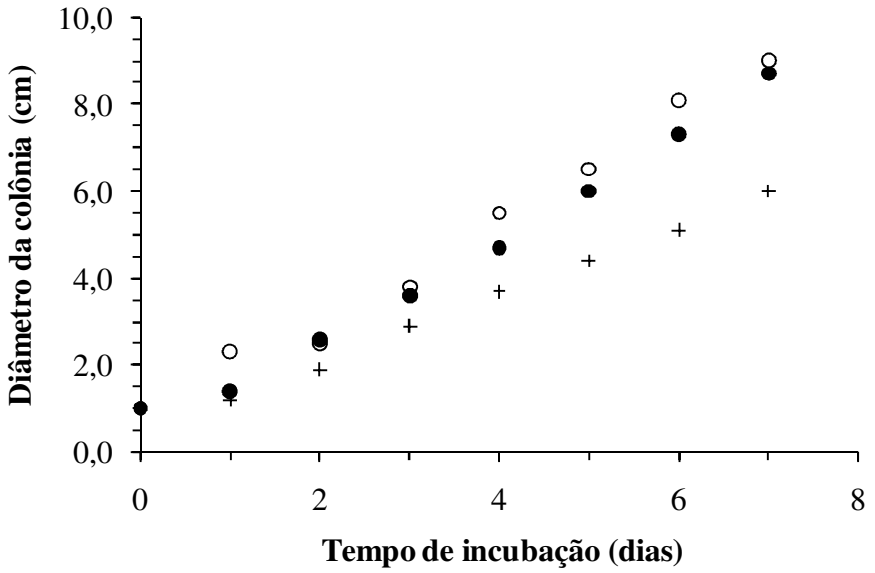


Figura 4.19: Avanço da fronteira micelial no testes com o extrato L (extração a 60ºC e 300 bar) na concentração 5,00 g/L frente a cepa fúngica FI-03. (+) teste com extrato L; (●) controle com etanol; (○) controle geral. Teste realizado em triplicata; amplitudes máximas de 0,2 cm, exceto para o teste com o extrato L (amplitude de 0,3 cm).

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusão

Os resultados obtidos nos estudos de extração convencional de folhas de *S. reticulata* mostraram que:

a) O uso da agitação no sistema de extração reduz de maneira significativa o tempo de operação quando comparado com trabalhos anteriores, o que pode ser um fator preponderante na escolha do método de obtenção de extrato de folhas de *S. reticulata*;

b) Das variáveis estudadas (temperatura, pH e força iônica), apenas a temperatura e o pH apresentaram efeito sobre a concentração de compostos fenólicos e proteínas nos extratos;

c) O aumento da concentração de etanol na solução extratora mostrou um decréscimo na concentração de compostos fenólicos e proteínas no extrato.

Nos estudos de condição de extração de folhas de *S. reticulata* no sistema supercrítico os resultados mostraram que:

a) Das variáveis estudadas, apenas a pressão tem efeito sobre o rendimento e o teor de compostos fenólicos dos extratos;

b) O extrato que apresentou o maior rendimento, não é o que possui o maior teor de compostos fenólicos.

As extrações preparativas convencionais apresentaram o seguinte resultado:

Os rendimentos em massa dos extratos convencionais foram menores que aqueles obtidos em extrações em sistema do tipo Soxhlet. Por outro lado, são maiores que os rendimentos dos extratos obtidos por maceração, registrados em trabalhos anteriores;

Os testes de atividade antifúngica dos extratos apresentaram os seguintes resultados:

a) Todos os extratos convencionais mostraram atividade antifúngica;

b) Os extratos obtidos com CO_2 supercrítico na concentração 1,00 g/L exercem pequena ou nenhuma atividade antifúngica sobre as cepas utilizadas nos testes;

c) A presença do etanol em concentração acima de 7% no meio inibe totalmente o crescimento das espécies fúngicas utilizadas;

d) A atividade antifúngica dos extratos aumenta com o aumento da sua concentração no meio de cultura.

Portanto, constatou-se nesse trabalho que dentre os compostos presentes nas folhas de *S. reticulata* encontram-se aqueles capazes de conter o avanço da fronteira micelial de alguns fungos xilófagos. Esses compostos podem ser obtidos por extração convencional aquosa, alcoólica ou hidroalcoólica e ainda por extração por fluído supercrítico utilizando CO_2 como solvente. Porém, a extração convencional mostrou ser a mais indicada para essa finalidade por apresentar maior rendimento, maior atividade antifúngica além da simplicidade de operação, sem a necessidade de equipamento sofisticado.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Sendo a espécie *S. reticulata* uma planta com ampla distribuição geográfica, muito abundante na região amazônica e com várias propriedades terapêuticas, algumas descritas na literatura e outras baseadas apenas em relatos populares, sugere-se para trabalhos futuros:

1- A realização de testes de atividade antifúngica dos extratos convencionais (B, C e D) que apresentaram melhores resultados, em concentrações que variem de 15 a 30 g/L segundo a metodologia descrita por Auer e Bettiol (1986), para testes de atividade antifúngica de extratos vegetais brutos, uma vez que neste trabalho esses testes não foram possíveis, pela limitação da massa de extrato obtido.

2- Estudo de ampliação de escala para as extrações supercríticas de folhas de *S. reticulata* visando à obtenção de percentuais de rendimentos dos extratos compatíveis com aqueles obtidos nas extrações para estudo de condições apresentados no presente trabalho;

3- Testes de solubilidade dos extratos supercríticos de folhas de *S. reticulata* em solventes, que não interfiram no crescimento fúngico, tornando possíveis os testes de atividade antifúngica desses extratos em maiores concentrações;

4- Realização de extração supercrítica utilizando etanol como co-solvente para aumentar a extração de compostos mais hidrofílicos;

5- Estudos mais aprofundados no sentido de isolar e identificar os compostos presentes nesses extratos, como forma de colaborar para o conhecimento do verdadeiro potencial dessa espécie botânica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J. M. Solid-liquid extraction. **In: Extraction otimization in food engineering**. Eds. TZIA, C.; LIADAKIS, G. Editora Marcel Dekker, Inc., New York, p. 35-55, 2003.

AKHTAR, M. N.; ATTA, U. R.; CHOUDHARY, M. I.; SENER, B.; ERDOGAN, I.; TSUDA, Y. New class of steroidal alkaloids from Fritillaria imperialis. **Phytochemistry**, v. 63, p. 115–122, 2003.

ALEXOPOULOS, C. J. **Introduccion a la micologia.** Editorial Universitária de Buenos Aires. Buenos Aires, 1966.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola.** v. 13, n. 3, p. 10-15, maio, 2001.

AMARAL, P.; VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; VIDAL, E. **Floresta para sempre: um manual para produção de madeira na Amazônia.** Belém: Imazon, 1998. 130 p.

ANDRADE, G. A.; REZENDE, D. M. L. C.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. **Avaliação fitotóxica de extratos de *Chencrus echinatus* - timbete.** In: 50ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria (RBRAS) e 11º Simpósio de Estastítica Aplicada a Experimentação Agronômica (SEAGRO), 2005, Londrina -PR. Seagro 2007.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. **International thermodynamic tables of the fluid state: carbon dioxide.** Pergamon Press. Oxford, Inglaterra, 1976.

AUER, C. G.; BETTIOL, W. Efeito da serrapilheira de *Eucalyptus grandis* no crescimento micelial *Pisolithus tinctorius* em meio de cultura. **IPEF,** n. 32, p. 49-52, abril, 1986.

AUW, J. M.; BLANCO, V.; O'KEEFE, S. F.; SIMS, C. A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their compositions in respective wines. **American Journal Enology Viticulture,** v. 51, p. 397-403, 2000.

BAHRAMIFAR, N.; YAMINI, Y.; SHAMSIPUR, M. Investigation on the supercritical carbon dioxide extraction of some polar drugs from spiked matrices and tablets. **Journal Supercritical Fluids**, v. 35, p. 205-211, 2005.

BARROS, A.C.; UHL, C. Logging along the Amazon river and estuary: patterns, problems and potential. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.77, p. 87-105, 1995.

BERCH, B.; HENKEL, M.; KENNA, R. Fenômenos críticos: 150 anos desde Cagniard de La Tour. **Revista Brasileira de Física,** v. 31, p. 2602-1 a 2602-4, 2009.

BERLINCK, R. G. S. Extrações e extrações – como, porque, quando e onde? **Química de produtos naturais,** 2009. Disponível em: http://quiprona.wordpress.com**.** Acesso em: 17/10/2010.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHFOOT, E. N. **Transport phenomena.** Nova York: John Wiley, 1960.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 46, p. 189-204, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid end sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira. "Perspectiva da pesquisa e utilização". **Floresta,** Curitiba, v. 36, n. 1, jan./abr. 2006.

BRASIL. Presidência da Republica. Ministério do meio ambiente. **Plano Amazônia sustentável: diretrizes para o desenvolvimento sustentável da Amazônia brasileira**. Brasília: MMA, 2008. 112 p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews,** v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRUCKNER, J. V.; WARREN, D. A. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLAASSEN C. D. ed. **Cassarett and doull's toxicology: the basic science of poisons.** 6th ed. New York: McGraw-Hill. p. 763–810, 2001.

BRUNNER, G. **Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes.** New York, NY: Springer, 1994.

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

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering,** n. 59, p. 379-389, 2003.

CAMPELO, G. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do estado de Alagoas III. **VII Simpósio de plantas medicinais do Brasil,** p. 85, 1 a 3 de setembro, Belo Horizonte, 1982.

CARBAJAL, C. J. V. **Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatória del extracto alcohólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irrwin & Barneby ("Retama")**. 2007. 87 f. Tesis (Magisterg em Recursos Vegetales y Terapéuticos) – Escuela de Post-grado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú, 2007.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova,** v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, N. F. **Avaliação dos extratos das folhas de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby como potencial de uso fungicida contra ataque de fungos de podridão da madeira.** 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2005.

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

CHRISTOPHER, G. K.; PHIPPS, A. G.; GRAY, R. J. Temperature-dependent solubility of selected proteins. **Journal of Crystal Growth,** v. 191, p. 820-826, 1988.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 1, p. 747, 1984.

COSTA, M. A. L.; CASTRO, N. F.; CORDEIRO, M. S. C.; SOUZA, J. A. **Atividade dos extratos etanólicos da casca do caule, caule e fruto de *Senna reticulata*** (Willd) Irwin & Barneby contra fungos apodrecedores de madeira In: 60ª Reunião Anual da SBPC, 2008, Campinas. **Anais/Resumos da 60ª Reunião Anual da SBPC: publicação eletrônica. Campinas: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2008.** Campinas: SBPC/UNICAMP, 2008.

COSTA, T. S.; PELAIS, A. C. A.; CORRÊA, N. C. F.; FRANÇA, L. F.; MARQUES, M. O M. Avaliação da extração de óleos essenciais de Vertiver (*Vetiveria zizanioides*) com CO_2 supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, p. 100-103, 2006.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliens***. Journal of Natural Products**, v. 67, p. 537–541, 2004.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa.** Campinas: Editora Unicamp, p. 798, 1998.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Sciences,** 845, 435-442, 1998.

CUELLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; RIOS, J. L. Tropical anti-inflamatory activity of same Asian medicinal plants used in dermatological disorders. **Fitoterapia,** v. 72, p. 221-229, 2001.

DAMODARAN, S.; PARAF, A.; **Food proteins and their applications.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

DANISCO, P. P. **Comparing extraction by traditional solvents with supercritical extraction from an economic and environmental standpoint**. ISASF–CD-Rom. Versailles, France, 2001.

DEWICK, P. M. The mevalonate and deoxyxylhlose phosphate pathways: Terpanoids and steroids. **Medicinal natural products,** John Wiley & Sons, Second editon, University of Nottingham, UK, p. 167-231, 2002.

ELIZALDE, B. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOF, A. M. R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 334-339, 1996.

FALKENBERG, M. B,; SANTOS, I. R.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. p. 229-245, 2003.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 42, n. 3, jul./set., 2006.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On-line,** v.2, p. 57-60, jul-dez, 2008. Disponível em www.agroambiente.ufrr.br. Acesso em 08/10/2010.

GOMEZ-GARIBAY, F.; CHILPA, R. R.; QUIJANO, L.; CALDERON PARDO, J. S.; CASTILHO, R. T. Metox furan auranols with fungistatic activity fron *Lonchocarpos castilloi*. **Phytochemistry,** v. 29, p. 459-463,1990.

GOMIDE, R. **Operações unitárias.** 1º volume: operações com sistemas sólidos granulares. Câmara Brasileira do Livro – São Paulo, 1983.

GUIA DA MADEIRA. **Montana química S.A.** Disponível em: http://www.montana.com.br. Acesso em 07/05/2010.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics.** London: Academic Press, 1989.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986.** London: Chapman and hall, 1993.

HUI, Y.H.; JOHN W. **Handbook of food products manufacturing**. JOHN W. & SONS Publications, EUA, 2007.

IMAZON. **A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados**. Serviço Florestal Brasileiro (SFB), Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (Imazon) – Belém, 2010.

JAFRI, M. A.; SUBAN, M. J.; JAVED, K.; SING., S. Hepatoprotective activity of leaves of cassia ocidentalis against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 66, p. 355-361, 1999.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of plant secondary metabolites. In: Methods in biotechnology, v. 20, **Natural products isolation**, 2nd ed. Eds. SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Humana Press Inc., Totowa, p. 323-351, 2006.

LENTINI, A.; VERÍSSIMO, A.; PEREIRA, D. A expansão madeireira na Amazônia. **O estado da Amazônia**, 2005.

LEPAGE, E. S. Química da madeira. In: **Manual de preservação da madeira,** v. 1, I.P.T., São Paulo, 1986.

LIN, L. C.; YANG, L. L.; CHOU, C. J. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from Plumbago zeylanica. **Phytochemistry, v**. 62, p. 619–622, 2003.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology**. Food Chemistry,** v. 93, p. 43-56, 2005.

MANACH, C. DONOVAN, J. Pharmacokinetcs and metabolism of dietry flavonoids in humans. **Free Radical Research,** v. 38, p. 771-785, 2004.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J. N.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive microbiology: theory and application.** Taunton: Research Studies, p. 1-86, 1993.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento;** SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P., orgs.; Ed. UFCS: Porto Alegre; 3ª Ed., 2001.

MENDES, A. de S. **A degradação da madeira e sua preservação.** Brasília, IBDF/DPq-LPF, 1988.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 17, p. 344-353, 1997.**

MOHAMED, R. S.; MANSOORI, G. A**.** The use of supercritical fluid extraction technology in food processing. **Food Technology,** June, 2002.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography,** v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAM, S. H.; CHOI, S. P.; KANG, M. Y.; KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. Antioxidative, antimutagenic and anticarcinogenic activies of rice bran extracts in chemical and cell essays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, p. 816-822, 2005.

NAHAR, L.; SARKER, S. D. Supercritical fluid extraction. In: Methods in biotechnology, v. 20, **Natural products isolation**, 2nd ed. Eds. SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Humana Press Inc., Totowa, p. 323-351, 2006.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T.; LEPAGE, E. S.; LOPEZ, G. A. C.; OLIVEIRA, L. C. S.; CANEDO, M. D.; MILANO, S. Agentes destruidores da madeira**. In: Manual de preservação da madeira.** v. 1, São Paulo: I. P. T, p. 99-175, 1986.

OLIVEIRA, J. T. S.; SOUZA, L. C.; LUCIA, R. M. D.; JÚNIOR, W. P. S. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore,** Viçosa, v. 29, p. 819-826, 2005.

OLIVEIRA, M. S.; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plants phenolic extract. **World Mycotoxin Journal,** v. 2, p. 139-146, 2008.

ONUORAH, E. O. The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. **Bioresource Technology,** v. 75, p. 171-173, 2000.

PALAMICHAMY, S.; NAGARAGAN, S. Antifungal activity of *Cassia alat*a leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 29, p. 337-340, 1990.

PAROLIN, P. *Senna reticulata*, a pionner the from amazoniam várzea floodplains**. The Botanical Review,** v. 67, p. 239-254, 2001.

PENG, D. Y.; ROBINSON, D. B. A new two-constant equation of state. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals,** v. 15, p. 59-64, 1976.

PEREIRA, C. S. S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curca L*).** 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PETTERSEN, R. C. **The chemical composition of wood. In:** The chemistry of solid wood. Ed. Roger M. Rowell. Advences in Chemistry Series 207. 614 p. 1984.

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

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Árvores de Manaus.** Manaus, IMPA, 1975. Ed. By Roger M. Rowell. Advances in Chemistry Series. U. S. A. 1984.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G.; Rapid visual estimation and espectrophotometric determination of tannin content of sorgum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 1268-1273, 1977.

QUISPE-CONDORI, S; SANCHEZ, D; FOGLIO, M. A; ROSA, P. T. V; ZETZL, C; BRUNNER, G; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids,** v. 36, p. 40–48, 2005.

REDIVO, A. R.; REDIVO, A.; SORNBERGER, G. P. Critérios de qualidade para o mercado nacional e internacional da madeira: Um estudo em empresas da micro região de Sinop/MT. **Revista Ingepro,** v. 2, 2010.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p. 1-37, 1997.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia**: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus: programa de desenvolvimento empresarial e tecnológico, 2000. 405 p.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography,** v. 1000, p. 657–691, 2003.

ROCHA, M. P. **Biodegradação e preservação da madeira.** Curitiba: FUPEF, 2001. 92 p.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüêncial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, R. S. L.; FLORES, A. S.; MIOTTO, S. T. S.; BAPTISTA, L. R. M. O gênero *Senna* (Legumonoseae, Caesalpinioideae) no Rio grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica,** v. 19, p. 1-6, 2005

ROMDHANE, M.; GOURDON, C. Investigation in solid-liquid extration: influence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal,** n. 87, p. 11-19, 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,** v.67, p.235–240, 2005.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 19, p. 402-420, 1996.

RUTHERFORD, M. C.; POWRIE, L. W. Allelochemic control of biomass allocation in interacting shrub species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 893-906, 1993.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO_2 in lipid extraction - a review. **Journal of Food Engineering,** v. 95, p. 240-253, 2009.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in western Ghats of India. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 69, p. 63-76, 2000.

SANTOS, R. N. **Estudo químico e farmacológico de *Senna reticulata* Willd. (sin. *Cassia reticulata Willd*.)**. 2007. 209 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. p. 615-656, 2003.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos da flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) Asteraceae.** 81 f. (Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas). Universidade do vale do Itajaí, SC, 2005.

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction. In: **Methods in biotechnology**, Vol. 20, Natural products isolation, 2nd ed. Edited by: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Gray . Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** Livraria Varela São Paulo, 1996.

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

SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G.; CARREIRA, L. M. M. **Nomes populares das leguminosas do Brasil.** Manaus: EDUA/INPA,FAPEAM, (Série: Biblioteca Científica da Amazônia). 2004, 236 p.

SILVA, M. G. V. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas superiores do nordeste: *Vaitarea macrocarpa* (Benth) Ducke.** p. 182. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade federal do Ceará, Fortaleza, 1987.

SINGH, D. N.; VERMA, N.; RAGHUWANSHI, S.; SHUKLA, P. K.; KULSHREHTHA, D. K. Antifungal anthraquinones from *Saprosma fragrans*. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters.** v. 16, p. 4512-4514, 2006.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. p. 289-326, 2003.

SOUZA, A. P.; SANTOS, J. P. L.; CABRAL, F. A.; SILVA, G. F. Modelagem termodinâmica na extração de ω-3 com CO_2 supercrítico. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, p.135-140, 2002.

TONA, L.; NGIMBI, N. P.; TSAKALA, M.; MESIA, K.; CIMANGA, K.; APERS, S.; BRUYNE, T. D.; PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; VLIETINK, A. J. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 68, p. 193-203, 1999.

VIEGAS JR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GANBÔA, I.; BOLZANI, V. S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero Cássia. **Química Nova,** v. 29, p. 1279-1286, 2006.

WU, X.; GU, L.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; BEECHER, G.; RONALD, R.L.; PRIOR, L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Compositions and Analisis,** v. 1063, p. 407-422, 2004.

APÊNDICE

A.1. Curva padrão de dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976)

As concentrações de proteínas nos extratos de folhas de *S. reticulata* obtidas pelo método convencional foram determinadas pelo método de Bradford (1976) modificado e calculadas de acordo com a equação da reta:

$$\text{Absorbância}_{(595\ nm)} = 0{,}0218 \times \text{Concentração de proteína},\ R^2 = 0{,}9942$$

obtida pela curva de calibração (Figura A.1).

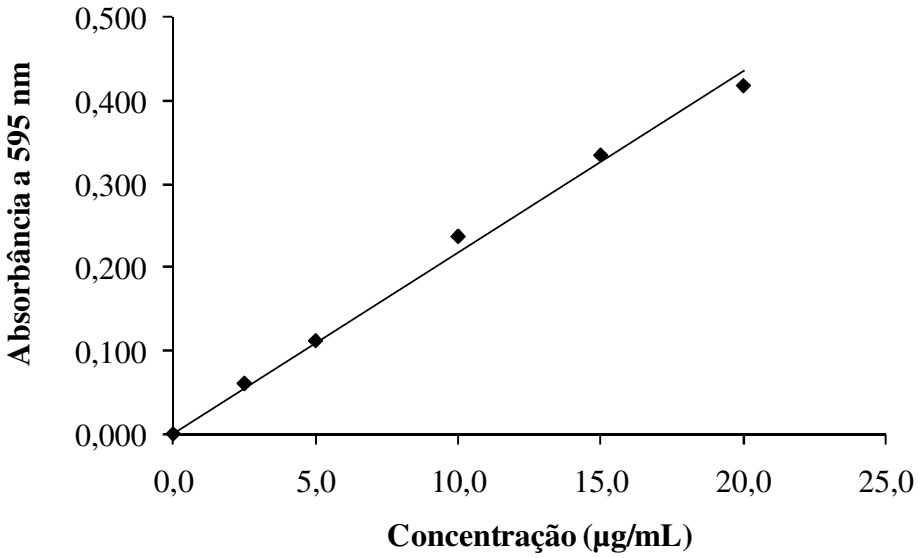


Figura A.1: Curva padrão para determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).

A.2 Curva padrão de dosagem de compostos fenólicos pelo método de Price e Butler (1977)

As concentrações de compostos fenólicos nos extratos de folhas de *S. reticulata* obtidos pelo método convencional e com CO2 supercrítico foram determinadas pelo método azul da Prússia (Price e Butler, 1977) e calculadas de acordo com a equação da reta:

Absorbância $_{(720\ nm)}$ = 0,0423 x Concentração de compostos fenólicos, R^2 = 0,9963

obtida pela curva de calibração (Figura A.2).

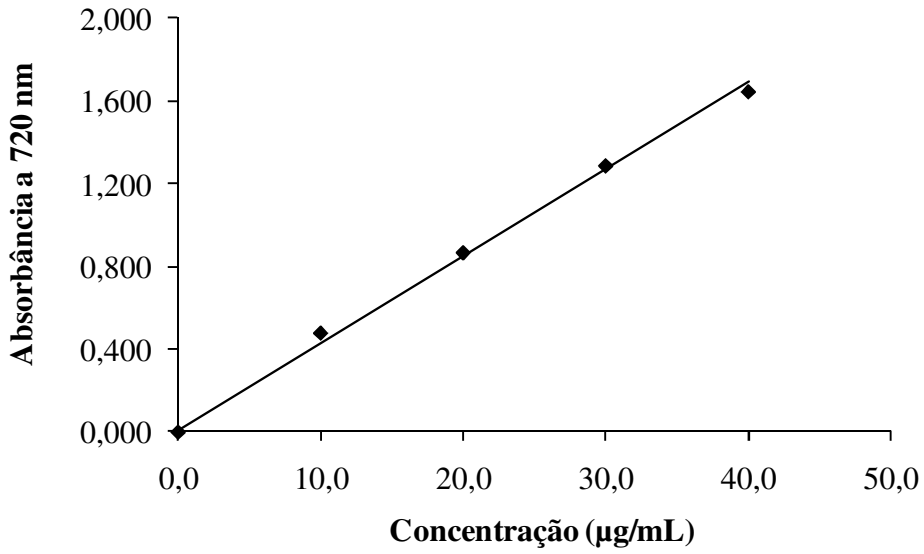


Figura A.2: Curva padrão para determinação da concentração de compostos fenólicos pelo método de Price e Butler.