



WILSON JUNIOR DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA  
FOLHA DE MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.)  
UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, ÁGUA E ETANOL**

CAMPINAS

2013





UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ

WILSON JUNIOR DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA  
FOLHA DE MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.)  
UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, ÁGUA E ETANOL**

Orientador: Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto

Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio Da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELO ALUNO WILSON JUNIOR DOS SANTOS  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. OSVALDIR PEREIRA TARANTO  
Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Santos, Wilson Junior dos, 1988-  
Sa59e        Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, água e etanol / Wilson Junior dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Osvaldir Pereira Taranto.

Coorientador: Edson Antonio da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração (Química). 2. Antioxidantes. 3. Folhas. 4. Modelagem matemática. 5. Árvores frutíferas. I. Taranto, Osvaldir Pereira, 1963-. II. Silva, Edson Antonio da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extraction of antioxidant compounds from mango (*Mangifera indica* L.) leaves using supercritical CO<sub>2</sub>, water and ethanol

**Palavras-chave em inglês:**

Extraction (chemistry)

Antioxidants

Leaves

Mathematical modeling

Fruit trees

**Área de concentração:** Engenharia de Processos

**Titulação:** Mestre em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Osvaldir Pereira Taranto [Orientador]

Mariana Altenhofen da Silva

Mary Ann Foglio

**Data de defesa:** 10-07-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS (DEPro)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

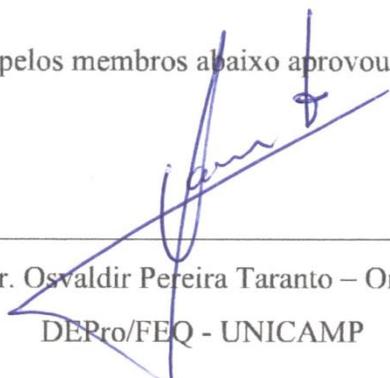
**Extração de compostos antioxidantes da folha da mangueira  
(*Mangifera Indica* L.) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, água e  
etanol**

Autor: Wilson Junior Dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto

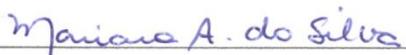
Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio Da Silva

A banca examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta dissertação:



---

Prof. Dr. Osvaldir Pereira Taranto – Orientador  
DEPro/FEQ - UNICAMP



---

Dra. Mariana Altenhofen da Silva  
DEMBio/FEQ - UNICAMP



---

Dra. Mary Ann Foglio  
CPQBA - UNICAMP

Campinas, 10 de julho de 2013.



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha namorada e aos meus queridos pais pelo incentivo e apoio em todas minhas escolhas e decisões.*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Carmem Luiza Carletto e Wilson Alves Dos Santos, pelo apoio incondicional e compreensão durante todo esse período, mesmo a distância.

À minha namorada, Karine Zanella, pelo companheirismo e paciência, estando presente em todos os momentos difíceis e alegres durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Osvaldir Pereira Taranto pela sua dedicação na orientação deste trabalho, ensinamento, paciência e apoio.

Ao professor Dr. Edson Antonio da Silva, pela coorientação e amizade fortalecida ao longo deste trabalho e durante a graduação.

Ao Dr. Fernando Frederico pela paciência e ajuda nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos doutorandos Janclei Coutinho e Danilo Souza pela ajuda nas análises químicas dos extratos.

Aos meus amigos de longa data, Mayara Cereja, Alan Butzke, Tiago Bogler, Luciano Kaibers e Adriel Batista, pelo companheirismo, parceria e por todos os bons momentos de alegria compartilhados.

Aos meus amigos de laboratório, José Júnior, Carlos, Rosi, Kaci e Harrison, pela amizade, apoio, companhia e pelos momentos de confraternização.

Também agradeço a CAPES pelo suporte financeiro, a Unicamp e ao programa de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se concretizasse.



## Epígrafe

*“Deixe-me te dar um conselho, bastardo. Nunca esqueça o que você é. Pois o resto do mundo não esquecerá. Use como se fosse uma armadura, assim nunca poderão usar isso para te ferir”.*

Tyrion Lannister

Personagem da saga As Crônicas do Gelo e do Fogo de George R. R. Martin



## RESUMO

A folha da mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma fonte potencial de antioxidantes naturais, os quais possuem efeitos benéficos na saúde humana e evitam a deterioração de alimentos. No entanto, os métodos tradicionais para extração desses compostos bioativos têm com principal desvantagem o uso de solventes tóxicos, como o metanol e a acetona. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a extração de antioxidantes da folha da mangueira utilizando técnicas de extrações em uma e duas etapas com solventes *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*). A extração em uma etapa foi realizada com dióxido de carbono supercrítico, água e etanol. As temperaturas e pressões do dióxido de carbono supercrítico variaram entre 40 e 60 °C e 150 e 250 bar, respectivamente. As extrações com água e etanol foram feitas a 40 °C por 24 horas. A extração em duas etapas foi empregada através da combinação da extração supercrítica com a extração convencional. Neste caso, os resíduos das extrações supercríticas a 40 °C foram submetidos a uma nova extração com água ou etanol. Todos os extratos foram caracterizados quanto ao rendimento de fenólicos totais e a quantidade de mangiferina. A atividade antioxidante de todos os extratos foi determinada pelos métodos ORAC e DPPH. O solvente mais eficiente na extração dos compostos antioxidantes foi o etanol. Os resultados obtidos com o CO<sub>2</sub> supercrítico foram superiores aos reportados na literatura, no entanto, foram baixos quando comparados às demais técnicas utilizadas neste trabalho. Na extração aquosa, o pré-tratamento da matriz vegetal com CO<sub>2</sub> supercrítico a 40 °C e 150 bar aumentou em 65% o rendimento de fenólicos totais e 25% o rendimento de mangiferina, enquanto que o pré-tratamento a 40 °C e 250 bar propiciou um aumento de 30 e 75% (método ORAC e DPPH, respectivamente) na atividade antioxidante. No entanto, na extração etanólica, o pré-tratamento com CO<sub>2</sub> não apresentou nenhuma influência significativa nos resultados. Finalmente, em todos os extratos, a atividade antioxidante apresentou correlação positiva com o rendimento de fenólicos totais, indicando que os fenóis são os principais antioxidantes da folha da mangueira.



## ABSTRACT

The mango (*Mangifera indica* L.) leaf is a potential source of natural antioxidants, which have beneficial effects on human health and prevent food deterioration. However, the traditional methods to extract these bioactive compounds have as main drawback the use of toxic solvents, such as methanol or acetone. In this context, this work aimed at the antioxidants extraction of mango leaves using extraction techniques in one and two steps with GRAS (Generally Recognized As Safe) solvents. Single step extractions were performed with supercritical carbon dioxide, water and ethanol. Temperatures and pressures of supercritical carbon dioxide were between 40 and 60 °C and 150 and 250 bar, respectively. The extractions with water and ethanol were carried out in batches at 40 °C for 24 hours. Two-step extraction was applied combining supercritical extraction with conventional extraction. In this case, residues of supercritical extraction at 40 °C were submitted to an another extraction with water or ethanol. All extracts were analyzed for phenolic compounds content and the amount of mangiferin. The antioxidant activity was determined by ORAC and DPPH methods. The most efficient solvent in the antioxidant extraction was ethanol. The results obtained with supercritical CO<sub>2</sub> were higher than those reported in literature, however, were low when compared to other techniques used in this study. In aqueous extraction, the pre-treatment of the vegetable matrix with supercritical CO<sub>2</sub> at 40 °C and 150 bar increased approximately 65% the yield of the total phenolics and 25% the yield of mangiferin, whereas pre-treatment at 40 °C and 250 bar resulted in an increased of 30 and 75% (method ORAC and DPPH, respectively) in antioxidant activity. However, in ethanolic extraction, pre-treatment with CO<sub>2</sub> showed no significant influence on the results. Finally, in all extracts, the antioxidant activity was positively correlated with the yield of total phenolics, indicating that phenols are the main antioxidants of the mango leaves.



# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Antioxidantes.....	7
3.1.1 Mecanismo da oxidação dos lipídios.....	7
3.1.2 Classificação dos antioxidantes.....	9
3.1.3 Compostos fenólicos como antioxidantes.....	10
3.1.4 Antioxidantes naturais e sintéticos.....	15
3.2 Análises dos extratos naturais.....	18
3.2.3 Fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu (FC).....	18
3.2.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	19
3.2.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC.....	20
3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	21
3.3 Extração de antioxidantes.....	22
3.3.1 Extração convencional.....	23
3.3.2 Extração supercrítica.....	24
3.3.3 Extração em duas etapas.....	25
3.4 Modelagem matemática da extração supercrítica.....	26
3.4.1 Solubilidade.....	26
3.4.2 Cinética de extração.....	28
3.4.2.1 Modelo de Tan e Liou (1989).....	28
3.4.2.2 Modelo de Sovová (1994).....	30



3.4.2.3 Modelo de De Souza, Benazzi et al.(2008).....	33
3.5 A mangueira ( <i>Mangifera indica</i> L.) .....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Matéria-prima .....	39
4.2 Reagentes.....	39
4.3 Caracterização da matéria-prima .....	40
4.3.1 Umidade .....	40
4.3.2 Teor de voláteis e umidade.....	41
4.3.3 Densidade real .....	41
4.3.4 Microestrutura .....	41
4.4 Caracterização do leite de extração supercrítica .....	42
4.4.1 Densidade do leite .....	42
4.4.2 Porosidade .....	42
4.5 Obtenção dos extratos.....	42
4.5.1 Extração convencional.....	43
4.5.2 Extração supercrítica .....	44
4.6 Análise dos extratos.....	47
4.6.1 Método Folin-Ciocalteu.....	48
4.6.2 Método DPPH .....	49
4.6.3 Método ORAC.....	49
4.6.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	50
4.6.5 Análise Estatística .....	51
4.8 Modelagem matemática da extração supercrítica.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1 Caracterização da matéria-prima .....	53
5.2 Extração supercrítica .....	54



5.2.1	Rendimento global.....	54
5.1.2	Solubilidade.....	56
5.1.3	Curvas cinéticas da extração supercrítica.....	60
5.1.4	Análises dos extratos supercríticos.....	68
5.1.4.1	<i>Fenólicos Totais</i> .....	69
5.1.4.2	<i>Atividade Antioxidante</i> .....	71
5.3	Extração convencional.....	74
5.3.1	Fenólicos Totais.....	74
5.3.2	Mangiferina .....	80
5.3.3	Atividade Antioxidante .....	84
5.3.3.1	<i>DPPH</i> .....	84
5.3.3.2	<i>ORAC</i> .....	87
5.3.4	Relação entre o rendimento de Fenólicos Totais, mangiferina e atividade antioxidantes pelos métodos DPPH e ORAC .....	90
6	CONCLUSÃO.....	95
6.1	Sugestões para trabalhos futuros .....	97
	REFERÊNCIAS .....	98



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Mecanismo de oxidação lipídica. Adaptado de Berdahl, Nahas <i>et al.</i> (2010).....	8
Figura 3.2 - Funcionamento dos antioxidantes. Adaptado de Berdahl, Nahas <i>et al.</i> (2010).....	10
Figura 3.3 - Estrutura típica dos compostos fenólicos.....	11
Figura 3.4 - Mecanismo de ressonância que mantém um composto fenólico estável.....	12
Figura 3.5 - Mecanismo que um composto fenólico pode inativar dois radicais livres .....	12
Figura 3.6 - Estrutura básica dos flavonóides.....	13
Figura 3.7 - Estrutura de alguns flavonóides.....	14
Figura 3.8 - Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos. ....	15
Figura 3.9 - Reação de sequestro do radical livre DPPH•.....	20
Figura 3.10 - Estrutura química da mangiferina.....	36
Figura 4.1 - Procedimento experimental para a extração em uma e duas etapas. ....	43
Figura 4.2 - Fluxograma da extração convencional. ....	44
Figura 4.3 - Módulo experimental utilizado nas extrações com fluídos supercríticos temperatura. .....	46
Figura 5.1 - Rendimento global (%) do extratos da folha da mangueira obtidos utilizando CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	56
Figura 5.2 - Curvas de extração para a determinação da solubilidade experimental. ....	57
Figura 5.3 - Modelagem das isotermas de solubilidade do extrato da folha da mangueira em dióxido de carbono supercrítico. ....	60
Figura 5.4 - Curvas de extração supercrítica para os ensaios 1, 2, 3 e 4.....	61
Figura 5.5 - Curvas de extração supercrítica para o ponto central (ensaios 5, 6 e 7).....	61
Figura 5.6 - Curvas de extração supercrítica para o segundo ensaio (40 °C e 250 bar) com os períodos CER, FER e DCR. ....	62



Figura 5.7 - Ceras cuticulares da folha da mangueira obtida na etapa inicial da extração supercrítica.....	62
Figura 5.8 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das folhas da mangueira ( <i>Mangifera indica</i> L.).....	63
Figura 5.9 - Curvas ajustadas aos ensaios 1 e 2. ....	66
Figura 5.10 - Curva ajustadas aos ensaios 3 e 4. ....	67
Figura 5.11 - Atividade antioxidante dos extratos supercríticos determinada pelos métodos DPPH e ORAC. ....	73
Figura 5.12 - Imagens de MEV (5000 x) da matriz vegetal.....	78
Figura 5.13 - Imagem de MEV (250 x) da matriz vegetal. ....	79
Figura 5.14 - Rendimento de fenólicos totais dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.....	80
Figura 5.15 - Cromatograma do padrão e dos extratos aquosos no comprimento de onda de 254 nm. ....	83
Figura 5.16 - Cromatogramas dos extratos etanólicos no comprimento de onda de 254 nm.....	84
Figura 5.17 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração. ....	86
Figura 5.18 - Atividade antioxidante pelo método ORAC dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração. ....	88
Figura 5.19 - Relação entre os fenólicos totais e atividade de sequestro medida pelo método DPPH para os extratos aquosos.....	92
Figura 5.20 - Relação entre os fenólicos totais e atividade de sequestro medida pelo método DPPH para os extratos etanólicos.....	93



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais classes de compostos fenólicos em função do peso molecular. ....	11
Tabela 3.2 - Algumas substâncias antioxidantes encontrados em plantas. ....	17
Tabela 4.1 - Condições experimentais dos ensaios de extração supercrítica. ....	45
Tabela 5.1 - Resultado da caracterização da matéria-prima. ....	53
Tabela 5.2 - Condições experimentais para a extração supercrítica.....	55
Tabela 5.3 - Efeitos e análise de variância da extração supercrítica. ....	55
Tabela 5.4 - Solubilidade experimental do extrato da folha da mangueira em CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	57
Tabela 5.5 - Parâmetros ajustados para os modelos de solubilidade.....	59
Tabela 5.6 - Características do leite de extração supercrítica e da matéria-prima. ....	64
Tabela 5.7 - Parâmetros ajustados na modelagem da extração supercrítica das folhas da mangueira com os modelos de Sovová (1994), De Souza <i>et al.</i> (2008) e Tan e Liou (1989).....	65
Tabela 5.8 - teor e rendimento de fenólicos totais dos extratos supercríticos da folha da mangueira. ....	69
Tabela 5.9 - Atividade antioxidante dos extratos supercríticos.....	72
Tabela 5.10 - Correlação linear entre os métodos de atividade antioxidante utilizados e o teor de fenólicos totais.....	74
Tabela 5.11 - Rendimento de fenólicos totais no extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.....	75
Tabela 5.12 - Rendimento de mangiferina no extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.....	81
Tabela 5.13 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração. ....	85
Tabela 5.14 - Atividade antioxidante pelo método ORAC dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração. ....	88



Tabela 5.15 - Coeficiente de correlação linear ( $r$ ) entre os métodos de atividade antioxidante utilizados, rendimento de fenólicos totais e de mangiferina dos extratos aquosos e etanólicos. ...90



## LISTA DE SÍMBOLOS

### Letras latinas

$a_0$	Área superficial do sólido relativo ao volume do leito	$L^2/L^3$
$a_1, a_2$ e $a_3$	Parâmetros ajustáveis dos modelos de solubilidade	-
$C$	Concentração do extrato no solvente	$M/L^3$
$DAM$	Desvio médio absoluto	-
$H$	Altura do extrator	$L$
$h$	Coordenada na direção axial do leito	$L$
$J(X,Y)$	Taxa de transferência de massa	$M/L^3T$
$K$	Massa de soluto depositado no interior do sólido	$M$
$k$	Constante cinética do modelo de segunda ordem	$L^3/MT$
$k_1, k_2$ e $k_3$	Parâmetros ajustáveis dos modelos de solubilidade	-
$k_d$	Coefficiente de desorção do soluto	$T^{-1}$
$k_f$	Coefficiente de transferência de massa no filme externo	$M/T$
$k_s$	Coefficiente de transferência de massa no sólido	$M/T$
$m(t)$	Massa de extrato obtida em função do tempo	$M$
$m_{alim}$	Massa da amostra alimentada na célula de extração (leito)	$M$
$m_{amostra}$	Massa da amostra	$M$
$m_{amostra\_seca}$	Massa da amostra seca (após estufa)	$M$
$m_{ES}$	Massa total de extrato supercrítico	$M$
$m_{exp}$	Massa extraída obtida experimentalmente	$M$
$m_{extrato}$	Massa total de extrato obtido apenas na parte inicial (linear) da curva de extração	$M$
$m_i$	Massa de inerte no leito	$M$
$m_{mod}$	Massa extraída calculada pelo modelo	$M$
$m_{solvente}$	Massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva de extração.	$M$
$O$	Massa de soluto no leito	$M$
$P$	Massa de soluto de fácil extração na superfície do sólido	$M$
$Q_{CO2}$	Vazão mássica de solvente	$M/T$



$SQE$	Soma quadrática dos erros	-
$T$	Temperatura	$\Theta$
$t$	Tempo	T
$t_{CER}$	Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito	T
$t_{FER}$	Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito	T
$t_r$	Tempo de residência do solvente na célula de extração	T
$u$	Velocidade superficial do fluido	L/T
$v$	Velocidade intersticial	L/T
$V_{leito}$	Volume total da célula de extração (leito)	L <sup>3</sup>
$VU$	Teor de voláteis e umidade	-
$W$	Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa no interior do sólido	-
$w$	Vazão volumétrica do solvente	L <sup>3</sup> /T
$X$	Razão entre massa de soluto e massa de sólido inerte	M/M
$X_0$	Razão entre a massa inicial de soluto e a massa de sólido inerte	M/M
$X_k$	Razão entre a massa de soluto depositado no interior do sólido e a massa de soluto disponível no leito	M/M
$X_p$	Razão entre a massa de soluto de fácil extração na superfície do sólido e a massa de soluto disponível no leito	M/M
$Y$	Razão entre massa de soluto e massa de solvente	M/M
$Y^*$	Solubilidade do soluto no solvente	M/L <sup>3</sup>
$Y_{exp}$	Solubilidade do extrato no CO <sub>2</sub> , obtida experimentalmente.	M/L <sup>3</sup>
$Y_{mod}$	Solubilidade do extrato no CO <sub>2</sub> , calculada pelo modelo.	M/L <sup>3</sup>
$Y_r$	Solubilidade do soluto no solvente	M/M
$Z$	Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa na superfície do sólido	-



### Letras gregas

$\rho_{leito}$	Densidade do leito	M/L <sup>3</sup>
$\varepsilon$	Porosidade do leito de extração supercrítica	-
$\rho$	Massa específica do solvente	M/L <sup>3</sup>
$\rho_s$	Massa específica do sólido	M/L <sup>3</sup>



## 1 INTRODUÇÃO

O contato entre uma molécula de oxigênio e um composto lipídico pode iniciar uma reação em cadeia responsável pela formação de radicais livres, os quais são altamente instáveis e reagem rapidamente provocando o surgimento de diversos produtos secundários indesejáveis (Frankel, 1980; 1984; Horton e Fairhurst, 1987). Nos alimentos, principalmente em óleos e gorduras, esses produtos secundários estão relacionados ao aparecimento de características organolépticas indesejáveis (rancidez), à perda de valores nutricionais e à diminuição da vida de prateleira (Shahidi, 1997), enquanto que, no corpo humano, a presença desses radicais livres contribui para o envelhecimento e o desenvolvimento de várias doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, aterosclerose, diabetes e doenças neurológicas (Ames, 1983; Ferrari e Torres, 2003).

Na tentativa de reduzir ou inibir a atuação dos radicais livres, o uso de compostos com propriedades antioxidantes tem recebido atenção especial nos últimos anos. Na indústria de alimentos os antioxidantes sintéticos, incluindo o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG), são utilizados a cerca de 60 anos para controlar e/ou evitar os processos oxidativos. Entretanto, devido a questões de segurança, a utilização desses compostos vem sofrendo algumas restrições. Estudos sobre a toxicologia dos antioxidantes sintéticos concluíram que esses compostos possuem efeitos patogênicos, tóxicos e cancerígenos (Ito *et al.*, 1986; Vanesch, 1986). Dessa forma, há uma tendência na utilização dos antioxidantes naturais, uma vez que esses são considerados seguros e são consumidos pelos seres humanos há séculos através de frutas e verduras (Frankel, 1996).

Em geral, o benefício para a saúde atribuído a frutas e verduras está associado à presença de substâncias com propriedades antioxidantes: os compostos fenólicos (Dimitrios, 2006). Esses compostos são produtos do metabolismo secundário das plantas, exercendo funções essenciais na reprodução e no seu crescimento. Frutas, folhas, sementes, cascas e raízes são excelentes fontes de compostos fenólicos (Ramarathnam, Ochi e Takeuchi, 1997).

Krishnaiah, Sarbatly *et al.* (2011) publicaram um trabalho de revisão sobre o potencial antioxidante dos extratos dos caules, cascas, raízes, folhas, frutas e sementes de diversas espécies de plantas medicinais e concluíram que muitas dessas espécies têm atividade antioxidante similar

aos antioxidantes sintéticos. Entretanto, apesar de existirem diversos trabalhos avaliando o potencial antioxidante dos extratos das plantas, os métodos de extração utilizados são bastante heterogêneos.

Usualmente, a extração com solventes polares é a técnica mais utilizada para obtenção de extratos com compostos fenólicos e atividade antioxidante. Acetona, metanol, etanol e água são os solventes mais empregados (Abdalla *et al.*, 2007; Ajila *et al.*, 2007; Arabshahi-Delouee e Urooj, 2007; Ling *et al.*, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011). Processos que empregam o dióxido de carbono supercrítico podem ser uma alternativa para se obter extratos com compostos bioativos, tendo em vista que o dióxido de carbono produz extratos limpos, é inerte, não tóxico, é livre de microrganismos patogênicos e a ausência de oxigênio previne a oxidação (Pokorny e Korczak, 2001). No entanto, o dióxido de carbono é um solvente apolar e a extração fica restrita a compostos apolares ou de baixa polaridade (Shi *et al.*, 2011).

Diversos extratos de frutas tropicais obtidos com diferentes solventes têm sido investigados quanto a sua capacidade antioxidante e concentração de compostos fenólicos (Aymoto Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2009; Contreras-Calderon *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2012; El Monfalouti *et al.*, 2012). A manga (*Mangifera indica* L.) é uma das frutas tropicais mais estudadas quanto a sua atividade antioxidante, pois é abundante e uma fonte potencial de compostos fenólicos. Matsusaka e Kawabata (2010) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos da polpa, casca e semente de oito frutas tropicais e concluíram que as partes não comestíveis (casca e semente) da manga obtiveram os melhores resultados. Outros pesquisadores também confirmaram o potencial antioxidante da casca e semente da manga (Soong e Barlow, 2006; Abdalla *et al.*, 2007; Ajila *et al.*, 2007; Dorta, Gloria Lobo e Gonzalez, 2012).

Estudos recentes também sugerem que a folha da mangueira é uma fonte significativa de polifenóis, onde o principal componente é a mangiferina, um composto com atividade antioxidante comprovada (Garrido *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006). Ling, Yap *et al.* (2009), por exemplo, verificaram que os extratos das folhas da mangueira possuíam capacidade antioxidante significativamente superior ao extrato da semente de uva, o qual tem atividade similar ao antioxidante sintético butil-hidroxi-anisol (BHA) (Jayaprakasha, Singh e Sakariah, 2001). Portanto, para tornar um antioxidante natural comercialmente vantajoso, é importante identificar os métodos de extração apropriados visando aumentar o rendimento dos componentes bioativos com potencial antioxidante nos extratos.

---

Os métodos tradicionais mais eficazes para obtenção de extratos com potencial antioxidantes têm como principal desvantagem a utilização de solventes tóxicos (*e.g.* metanol e acetona) e, por isso, há um grande interesse no desenvolvimento de novos processos baseado no uso de solventes reconhecidos como seguros pela indústria de alimentos (*GRAS – Generally Recognized As Safe*), como a água, etanol e dióxido de carbono supercrítico.

Algumas pesquisas mostraram que se podem obter extratos com alto teor de compostos fenólicos quando combinadas sequencialmente a extração com dióxido de carbono supercrítico e um solvente convencional (Ribeiro, Bernardo-Gil e Esquivel, 2001; Vatai, Skerget e Knez, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011). Nesses casos, na primeira etapa, o dióxido de carbono supercrítico extrai os compostos pouco polares e, conseqüentemente, altera a interação dos solutos remanescentes (principalmente os compostos fenólicos polares) com a matriz vegetal, que serão extraídos com maior eficiência numa segunda etapa com um solvente polar (água ou etanol).

Dessa forma, torna-se importante investigar a técnica de extração adequada (com uma ou duas etapas extração) no intuito de maximizar a atividade antioxidante dos extratos das folhas de mangueira utilizando solventes sem restrições ao uso (*e.g.* água, etanol e dióxido de carbono supercrítico). Na literatura, não há relatos da aplicação da extração supercrítica combinada com a extração convencional para obtenção dos extratos das folhas de mangueira.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes técnicas de obtenção do extrato da folha da mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando métodos de extração convencional (com água e etanol), extração supercrítica (com CO<sub>2</sub>) e extração em duas etapas (extração supercrítica combinada com a extração convencional) com o intuito de se obter extratos bioativos ricos em compostos fenólicos e com elevada atividade antioxidante.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos estão listados a seguir:

- Obter extratos da folha da mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando água, etanol e dióxido de carbono supercrítico (extração em uma etapa);
- Obter extratos etanólicos e aquosos do resíduo sólido resultante da extração supercrítica (extração em duas etapas);
- Estudar a alteração na estrutura da matriz vegetal antes e depois do processo de extração supercrítica através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos através do método de inibição do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e do método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*).
- Determinar o teor de compostos fenólicos dos extratos utilizando o método Folin-Ciocalteu;
- Quantificar o rendimento do composto fenólico mangiferina dos extratos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Verificar a influência das condições da extração supercrítica (temperatura e pressão) no rendimento de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos.

- Verificar a relação entre o teor de compostos fenólicos dos extratos e da quantidade de mangiferina com a atividade antioxidante;
- Obter as curvas cinéticas e as isotermas de solubilidade da extração supercrítica da folha de manga (*Mangifera indica* L.); e
- Modelar a cinética de extração supercrítica e as isotermas de solubilidade da extração supercrítica.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Antioxidantes

Antioxidantes são compostos que significativamente inibem ou retardam processos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Quando presentes em pequenas concentrações comparadas ao substrato oxidável, os antioxidantes são capazes de prevenir a deterioração de alimentos (Shahidi, 1997) e de proteger o corpo humano contra danos causados por espécies reativas de oxigênio (Ames, 1983). Essas espécies reativas ou radicais livres são intermediários associados a doenças do envelhecimento, como inflamações crônicas, aterosclerose, catarata, diabetes e doenças neurológicas (Ferrari e Torres, 2003). Além disso, a ação dos antioxidantes está relacionada também com a redução dos riscos de câncer e doenças cardiovasculares (Gaziano, 1996; Hercberg *et al.*, 1998; Palace *et al.*, 1999). Portanto, a presença de antioxidantes nos alimentos possui benefícios claros: eles minimizam o desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, aumentam a vida de prateleira, mantêm os valores nutricionais (Sims e Fioriti, 1977) e, quando ingeridos, inibem reações de oxidação nocivas ao corpo humano.

#### 3.1.1 Mecanismo da oxidação dos lipídios

Auto-oxidação ou peroxidação lipídica ocorre quando um lipídio, em geral um ácido graxo, é atacado por um oxigênio alterando a sua estrutura química. Essa alteração é responsável pela perda da qualidade de diversos produtos e pela formação de substâncias tóxicas.

O mecanismo básico desse processo está bem estabelecido (Frankel, 1984; Horton e Fairhurst, 1987). A reação da molécula de lipídio com a molécula de oxigênio envolve uma reação em cadeia de um radical livre e pode ser separada em 3 etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 3.1).

Na etapa inicial, os radicais livres são formados por processos envolvendo a retirada de um hidrogênio de um lipídio insaturado (LH) mediante a ação de íons metálicos, luz, radiação, calor ou outros meios. O intermediário formado é um radical lipídico ( $L\bullet$ ), o qual apresenta um

par de elétrons não emparelhados. Ele é considerado uma estrutura instável e tende a reagir rapidamente para formar compostos sem radicais livres (Jadhav *et al.*, 1996).

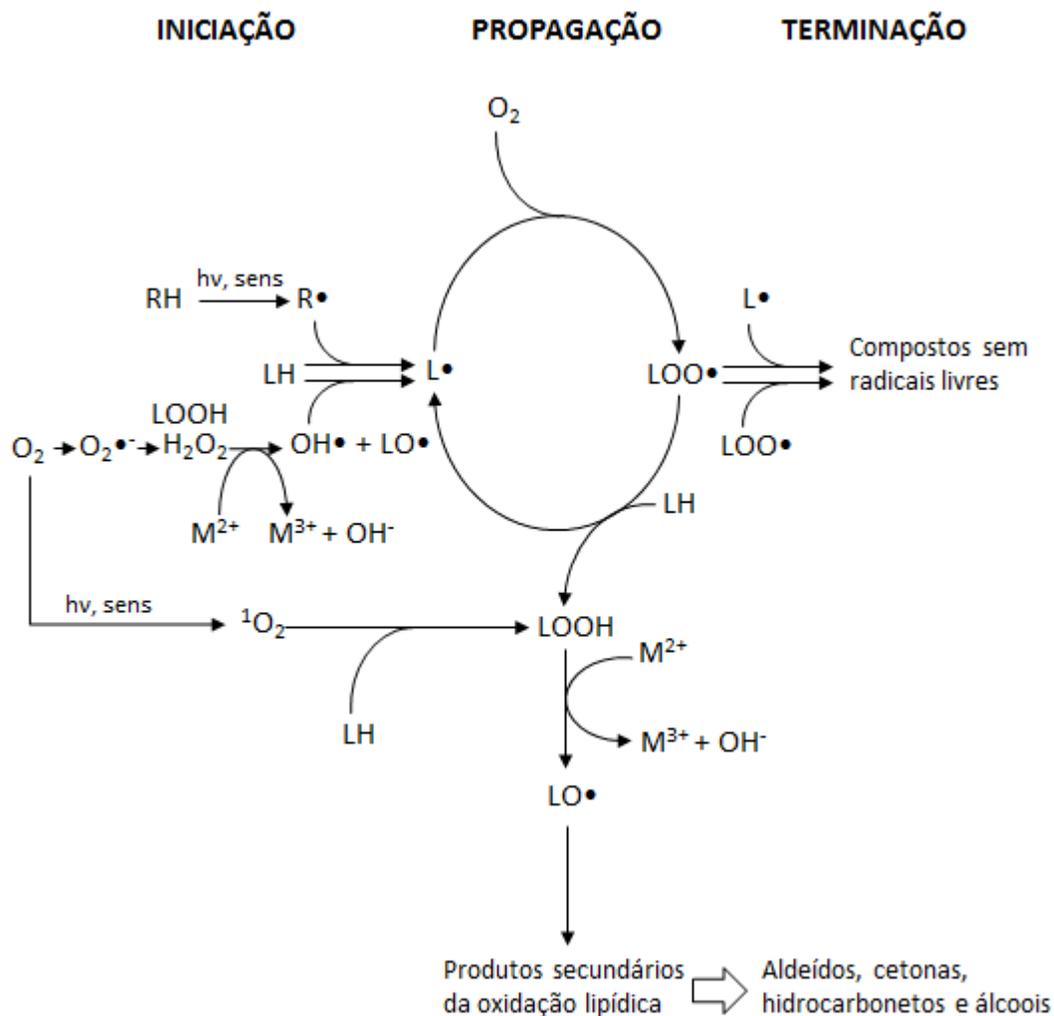


Figura 3.1 - Mecanismo de oxidação lipídica. Adaptado de Berdahl, Nahas *et al.* (2010).

Na etapa de propagação, a molécula de oxigênio reage com o radical lipídico ( $L\bullet$ ) e forma radicais peróxidos lipídicos ( $LOO\bullet$ ), o qual reage com um lipídio insaturado ( $LH$ ) e inicia uma reação em cadeia, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ) e novos radicais livres ( $L\bullet$ ). Os hidroperóxidos lipídicos podem reagir com um íon metálico e formar uma nova fonte de radicais livres, os radicais alcoxi ( $LO\bullet$ ). Esses radicais podem promover a formação de produtos secundários (cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e aldeídos), os quais são responsáveis pela rancidez dos alimentos (formação de odores e sabores indesejáveis) e por diversas doenças (Jacobsen, 2010; Skibsted, 2010)

Na terminação, os radicais livres reagem entre si e formam compostos estáveis. No entanto, ainda que a associação de radicais esteja relacionada a uma baixa energia de ativação, a ocorrência da terminação é controlada pela concentração de radicais livres, a qual é responsável pela frequência de encontro entre radicais (Berdahl, Nahas e Barren, 2010).

### 3.1.2 Classificação dos antioxidantes

Tradicionalmente, os antioxidantes eram definidos como compostos que sequestravam radicais livres, inativando-os. Entretanto, atualmente, é comum definir antioxidante como qualquer composto que inibe o processo de deterioração de lipídios (Decker *et al.*, 2010). Dessa forma, segundo Berdahl, Nahas *et al.* (2010), os antioxidantes podem ser classificados como:

- a) Antioxidantes primários: compostos que doam hidrogênio ou elétrons para os radicais lipídicos ( $LOO\bullet$  ou  $LO\bullet$ ) e formam um radical antioxidante ( $A\bullet$ ) de baixa energia que evita oxidações adicionais (Bolland e Ten Have, 1947):



- b) Antioxidantes secundários: substâncias que reagem com os hidroperóxidos ( $LOOH$ ), convertendo-os em formas mais estáveis. Essa ação evita que os hidroperóxidos interajam com metais e formem novos radicais livres alcóxi;
- c) Quelantes: os antioxidantes desse grupo impendem a atividade catalisadora dos metais na formação de radicais livres;
- d) Supressores: substâncias que desativam espécies com alta energia, como oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) ou compostos fotoativos;
- e) Sequestradores de oxigênio: substâncias que reagem com oxigênio removendo-o do sistema para evitar possíveis processos oxidativos;
- f) Regeneradores (ou sinergistas): compostos que reduzem os radicais que são formados quando um antioxidante primário doa um átomo de hidrogênio ou um elétron a um radical livre.

Todos esses antioxidantes agem em diferentes partes do processo oxidativo de acordo com a Figura 3.2.

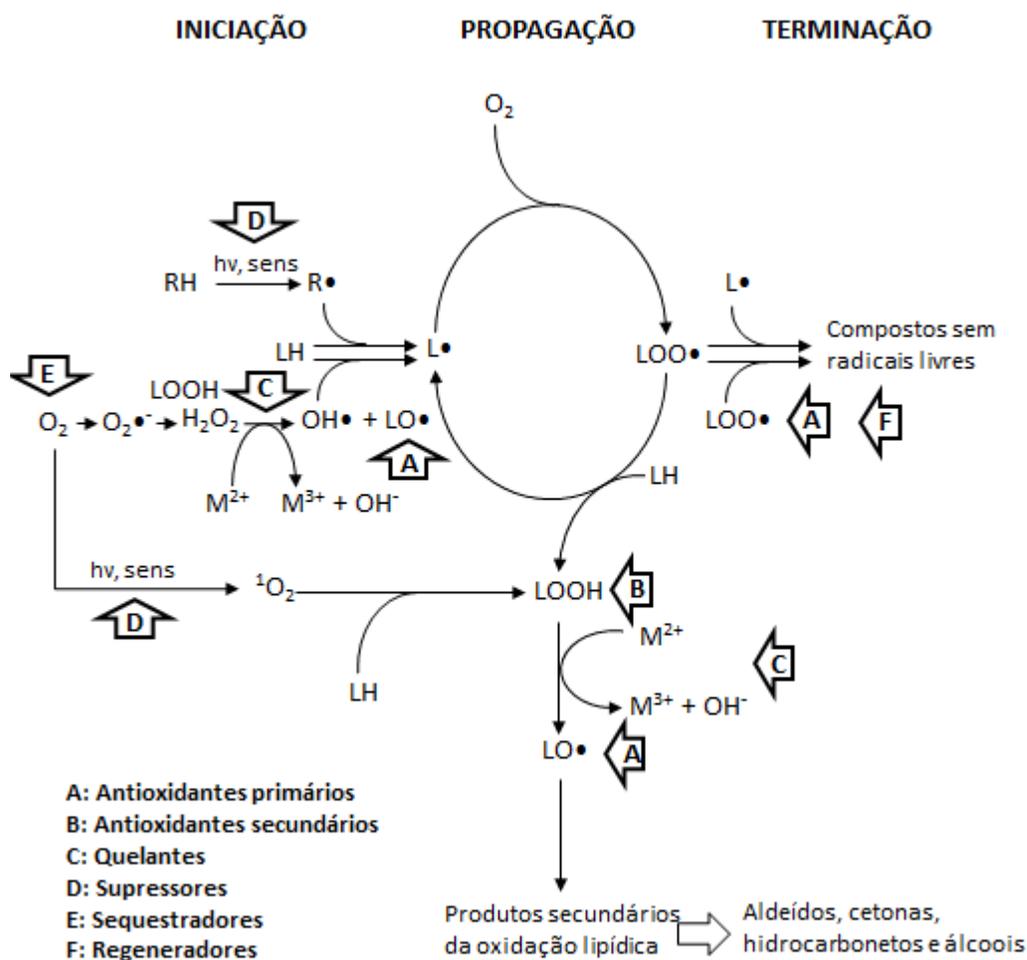


Figura 3.2 - Funcionamento dos antioxidantes. Adaptado de Berdahl, Nahas *et al.* (2010).

### 3.1.3 Compostos fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos são moléculas orgânicas que apresentam pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Sua estrutura básica é apresentada na Figura 3.3. Eles compreendem mais de oito mil espécies e podem ser classificados seguindo diferentes critérios. No entanto, para uma melhor compreensão, as principais classes dos compostos fenólicos são divididas de acordo com o peso molecular, como mostra a Tabela 3.1.

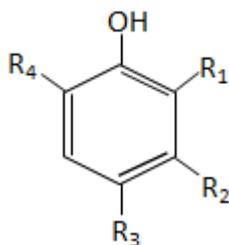


Figura 3.3 - Estrutura típica dos compostos fenólicos.

Tabela 3.1 - Principais classes de compostos fenólicos em função do peso molecular.

Peso molecular	Estrutura	Classe	Subclasse	Exemplos
Baixo	$C_6-C_1$	Ácidos hidroxibenzoicos		Vanílico, gálico, elágico, salicílico
	$C_6-C_3$	Ácidos hidroxicinâmicos		Cumárico, caféico, ferúlico, sinápico.
Intermediário	$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides	Antocianidinas Flavonóis Flavanóis Flavononas Flavonas Isoflavonas Chalconas	Apigenidina, cianidina Quercetina, miricetina (+)-catequina Naringenina Apigenina, luteolina Genisteína, daidzeína
Alto	$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizáveis		
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninhos condensados		

Fonte: Escarpa e Gonzalez (2001)

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está estritamente relacionada com a ressonância do anel aromático. O grupo hidroxila doa um átomo hidrogênio ao radical livre e, então, o radical antioxidante formado é estabilizado pela ressonância do anel aromático (Figura 3.4) (Hall III, 2000).

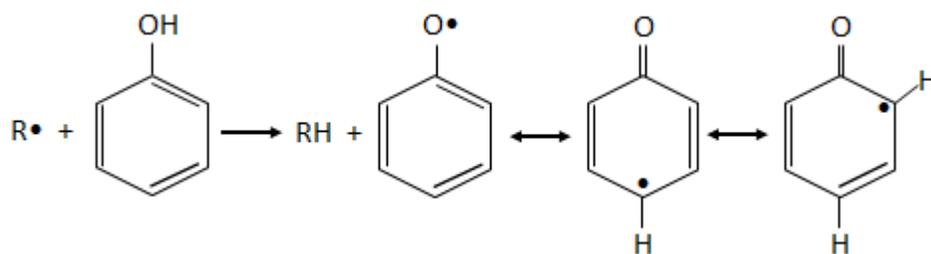


Figura 3.4 - Mecanismo de ressonância que mantém um composto fenólico estável.

Assim sendo, um composto fenólico é capaz de inativar pelo menos dois radicais livres: o primeiro é inativado quando o antioxidante reage com o radical alcóxi ou peróxido e o segundo quando o radical antioxidante reage na etapa de terminação com outro radical formando um composto sem radicais (Figura 3.5). Porém, alguns antioxidantes fenólicos são capazes de inativar mais de um radical livre. Isso ocorre quando o composto possui outro átomo de hidrogênio que também pode ser doado (Decker *et al.*, 2010), como é o caso de muitos flavonóides.

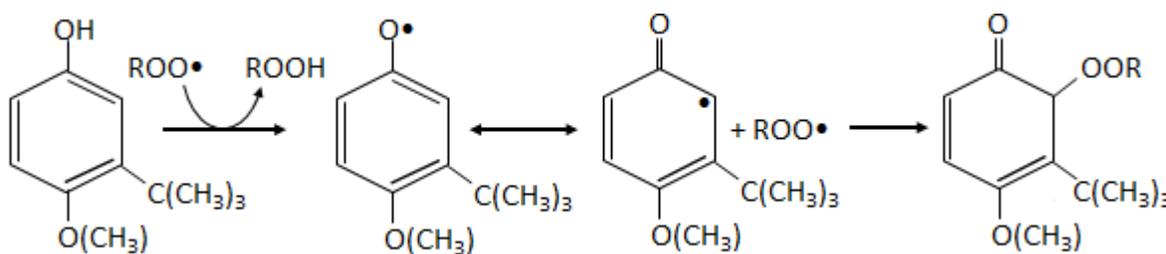


Figura 3.5 - Mecanismo pelo qual um composto fenólico pode inativar dois radicais livres.

### 3.1.3.1 Flavonóides

Os flavonóides são o maior grupo de compostos fenólicos de ocorrência natural distribuído entre o reino vegetal. Sua estrutura básica é conhecida como difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ) em referência aos dois anéis aromáticos ligados por meio de três carbonos que usualmente formam um heterociclo oxigenado (Figura 3.6) (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002).

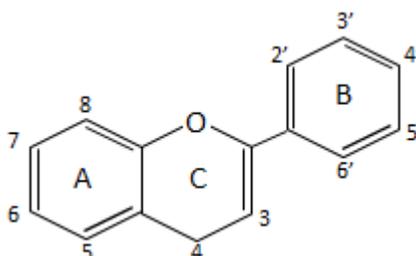
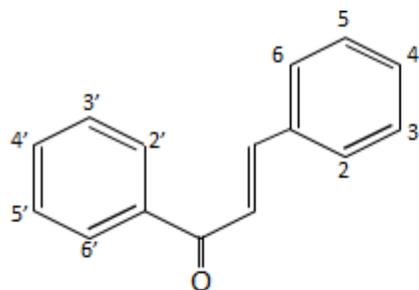


Figura 3.6 - Estrutura básica dos flavonóides.

Diversos subgrupos são classificados de acordo com a mudança dos padrões do anel C e da posição do anel B. Os maiores grupos são flavonóis, flavonas, isoflavonas, catequinas, proantocianidinas, e antocianinas (Figura 3.7). Chalconas, flavononas, leucoantocianinas, dihidroflavonóis são os precursores comuns dos diferentes subgrupos. A maioria desses compostos possui atividade antioxidante. Em geral, eles agem como sequestradores de radicais livres (antioxidantes primários). A presença de grupos hidroxilas nas posições 3', 4' e 5' no anel B aumenta a atividade antioxidante comparado com os compostos que possuem apenas um único grupo hidroxila. Além disso, a presença na hidroxila na posição 3 e as duplas ligações entre as posições 2 e 3 no anel C também tem um efeito positivo nas propriedades antioxidantes desses compostos (Rajalakshmi e Narasimhan, 1996).

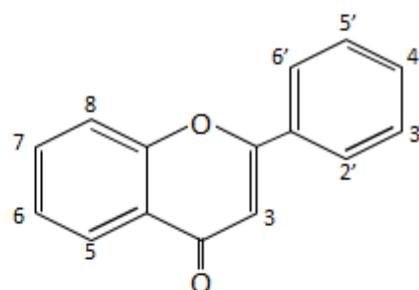
Os flavonóides estão amplamente distribuídos em folhas, sementes, cascas de árvores e flores (Harborne e Williams, 2000). Eles ocorrem na forma de glicosídeo, isto é, com alguma molécula de açúcar ligada à sua estrutura (Kandaswami e Middleton Jr., 1997). A unidade glicosídica mais comumente encontrada é a glicose, mas outros açúcares também podem ser encontrados, tais como glicoramnose, galactose, arabinose e ramnose. Os flavonóides que não se encontram ligados a uma molécula de açúcar são chamados de agliconas (Cook e Samman, 1996).



## Chalconas

Buteína 2'=4'=3=4=OH

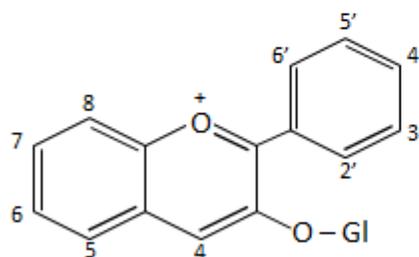
Okanina 2'=3'=4'=3=4=OH



## Flavonas

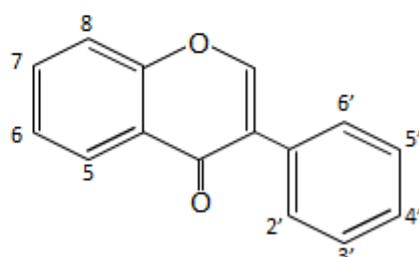
Luteolina 5=7=3'=4'=OH

Isovitexina 4'=5=7=OH, 6=Glucose



## Antocianinas

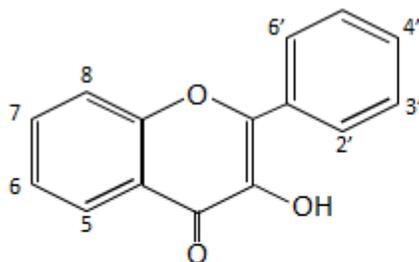
Ciadina-3-glucosídeo 5'=4'=5=7=OH

Malvidina-3-glucosídeo 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH<sub>3</sub>

## Isoflavonas

Daidzeína 7=4'=OH

Genisteína 5=7=4'=OH

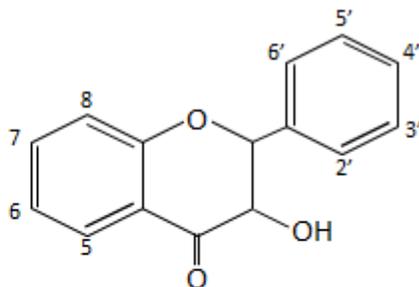


## Flavonóis

Queretina 3=5=7=3'=4'=OH

Miricetina 3=5=7=3'=4'=5'=OH

Gossipetina 3=5=7=8=4'=5'=OH



## Dihidroflavonóis

Dihidroquercetina 3=5=7=3'=4'=OH

Figura 3.7 - Estrutura de alguns flavonóides.

### 3.1.4 Antioxidantes naturais e sintéticos

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são principalmente compostos fenólicos e incluem o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) (Figura 3.8) (Velioglu *et al.*, 1998). Eles são amplamente utilizados no controle da oxidação em alimentos, pois apresentam baixo custo, elevada pureza e atividade constante (Berdahl, Nahas e Barren, 2010). Entretanto, estudos mostram que esses antioxidantes possuem efeitos patogênicos, tóxicos e cancerígenos (Ito *et al.*, 1986; Vanesch, 1986).

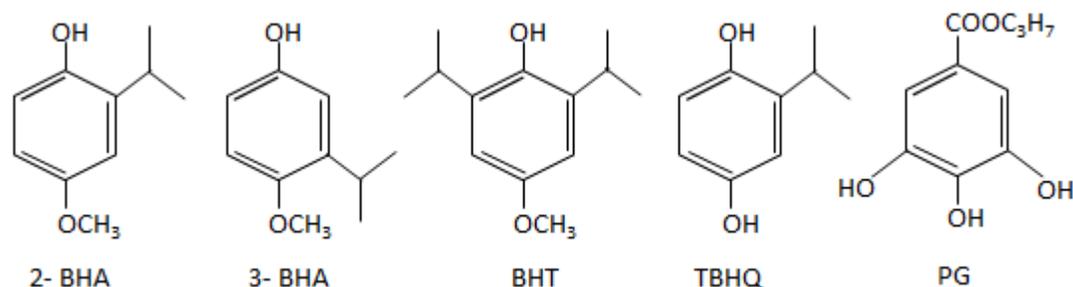


Figura 3.8 - Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos.

Além disso, antioxidantes sintéticos derivados do petróleo, como o BHA e BHT, foram utilizados inicialmente na proteção de polímeros contra oxidação (Rajalakshmi e Narasimhan, 1996) antes de sua introdução em produtos alimentícios e estão na dieta humana por apenas 60 anos, enquanto que antioxidantes naturais são consumidos há milhares de anos (Frankel, 1996; Berdahl, Nahas e Barren, 2010).

Em diversos países, regulamentações limitam a quantidade de antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT e TBHQ, em cada aplicação na indústria de alimentos e impõem vários testes de segurança obrigatórios. Este não é o caso dos antioxidantes naturais. Nos Estados Unidos, por exemplo, o uso de antioxidantes naturais derivados de plantas é considerado seguro e, automaticamente, nenhum teste de segurança é requerido (German, 2002).

Por esses motivos, e também devido há uma forte tendência dos consumidores darem preferência aos aditivos naturais em alimentos, pesquisas na área dos antioxidantes naturais vêm aumentando. Possíveis fontes naturais de antioxidantes têm sido pesquisadas em diversas partes de plantas, como frutas, folhas, flores, sementes, cascas e raízes (Ramarathnam, Ochi e Takeuchi,

1997). Kahkonen, Hopia *et al.* (1999), por exemplo, avaliaram a atividade antioxidante de 92 extratos de partes comestíveis e não comestíveis de plantas.

Segundo Rajalakshmi e Narasimhan (1996), os compostos naturais com atividade antioxidante, em geral, são: compostos fenólicos (carnosol, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido carnósico, ácido ferúlico, eugenol, flavonóides, entre outros), aminoácidos, ácidos orgânicos (cítrico, tartárico e ascórbico), lecitina, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), ácidos fílicos, proteínas, saponinas, vitamina E,  $\beta$ -caroteno, curcumina, ligninas, hidrolisados proteicos, esteróis e ácido úrico. No entanto, os antioxidantes naturais mais ativos são os compostos fenólicos (Karpinska, Borowski *et al.*, 2001). A Tabela 3.2 apresenta diversos antioxidantes naturais encontrados em plantas.

Tabela 3.2 - Algumas substâncias antioxidantes encontrados em plantas.

<b>Matéria-prima</b>	<b>Substâncias</b>	<b>Referência</b>
Folhas de oliveira ( <i>Olea europaea</i> )	Hidroxitirosol, tirosol, luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido e oleuropeína	Hayes, Allen <i>et al.</i> (2011)
Folhas de ameixa ( <i>Eriobotrya japonica</i> )	Ácido 3-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico e ácidos 5-feruloilquínicos	Ferreres, Gomes <i>et al.</i> (2009)
Sementes de Romã ( <i>Punica granatum</i> )	Fenóis derivados de ácidos, flavan-3-óis, flavonóides glicosídeos e taninos hidrolisáveis.	He, Xu <i>et al.</i> (2011)
Folhas de bardana ( <i>Arctium lappa</i> )	Quercetina, cinarina, ácido benzóico, quercitrina, ácido caféico, luteolina, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, arctina e rutina	Lou, Wang <i>et al.</i> (2010)
Folhas de alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), manjerona ( <i>Origanum majorana</i> ) e orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Ácido rosmarínico, ácido caféico, luteiolina-7-O-glicosídeo, apigenina-7-glicosídeo, ácido gálico, ácido carnósico, carnosol e melanoidina	Hossain, Barry-Ryan <i>et al.</i> , (2011)
Folhas de erva doce ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	Ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido clorogênico, eriocitrina, rutina, miquelianina e ácido rosmarínico.	Faudale, Viladomat <i>et al.</i> (2008)
Polpa, semente e folha de ameixa ( <i>Eriobotrya japonica</i> ), figueira ( <i>Ficus carica</i> ) e mamão ( <i>Asimina triloba</i> )	Ácido gálico, catequina, ácido elágico, ácido caféico, ácido p-cumárico, quercetina e ácido ferúlico.	Pande e Akoh (2010)

## 3.2 Análises dos extratos naturais

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para analisar o potencial antioxidante de extratos naturais. Entretanto, não há um método universal para medir a atividade antioxidante de todos os extratos de forma precisa e quantitativa (Prior, Wu e Schaich, 2005). Nesse contexto, os métodos de inibição de radicais livres (DPPH e ORAC) são os mais utilizados. O método Folin-Ciocalteu é amplamente empregado na análise do teor de fenólicos totais dos extratos naturais, enquanto que, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizada na análise quantitativa de componentes específicos.

### 3.2.3 Fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu (FC)

O ensaio de fenóis total originalmente foi designado para a análise de proteína por reação entre o reagente e a tirosina (que contém um grupo fenol) em proteínas. O reagente Folin-Ciocalteu oxida fenóis e produz um produto colorido com um máximo de absorção à 745-750 nm (Folin e Ciocalteu, 1927). Singleton, Orthofer *et al.* (1999) adotaram esse ensaio para a análise de compostos fenólicos no vinho. Desde então, esse método vem sendo utilizado em muitos estudos para medir a quantidade de compostos fenólicos em diversos tipos de extratos.

A natureza química exata do reagente Folin-Ciocalteu é desconhecida, mas admite-se que é composto por uma solução ácida de polímeros complexos dos ácidos fosfomolíbdico e fosfotungstístico. Este reagente de cor amarela reage com os compostos fenólicos e é reduzido a um complexo azul de molibdênio-tungstênio, o qual pode ser detectado em 750-765 nm (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999). Habitualmente, o ácido gálico é utilizado como padrão de referência e os resultados são expressos como ácido gálico equivalente (mg/L).

O método FC se tornou um ensaio comum no estudo dos antioxidantes fenólicos, pois é simples, reprodutível, conveniente e o reagente está comercialmente disponível (Magalhaes *et al.*, 2008). No entanto, diversas outras substâncias, particularmente açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, Cu(I), Fe(II), entre outras, podem interferir nesse método e, em algumas situações, esse ensaio pode não ser adequado para a determinação do conteúdo fenólico total, a menos que espécies interferentes sejam consideradas ou removidas (Prior, Wu e

Schaich, 2005). Portanto, recentemente, o método FC também vem sendo utilizado para avaliar a capacidade de redução de extratos.

### 3.2.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH

O método DPPH foi primeiramente descrito por Blois (1958) e depois foi modificado por diversos pesquisadores. É um dos métodos mais utilizados devido sua simplicidade, estabilidade e reprodutibilidade (Kitts, Wijewickreme e Hu, 2000).

O DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre estável, vendido comercialmente e não precisa ser gerado previamente. Nesse método, os compostos antioxidantes reduzem os radicais DPPH• e a mudança de cor da solução (de violeta escuro para amarelo claro) indica a ocorrência da reação (Figura 3.9).

A capacidade de sequestro do DPPH• é avaliada numa solução contendo um solvente orgânico (metanol ou etanol) monitorando a queda de absorvância em 517 nm. Ao contrário do que se acreditava inicialmente, o mecanismo de reação com o radical DPPH• é baseado na transferência de um elétron (SET – *Single Eletron Transfer*), enquanto que a transferência do átomo de hidrogênio (HAT – *Hydrogen Atom Transfer*) é uma reação marginal, pois ocorre lentamente em solventes que possuem fortes ligações de hidrogênios, como o metanol e o etanol (Huang, Ou e Prior, 2005; Magalhaes *et al.*, 2008). A Figura 3.9 mostra a reação do antioxidante com o radical DPPH•.

Os resultados desse ensaio têm sido apresentados de muitas maneiras diferentes, tais como porcentagem de inibição do radical DPPH•, porcentagem de DPPH• residual, atividade antirradical, capacidade antioxidante equivalente de ácido ascórbico ou de algum antioxidante natural como o ácido gálico ou sintético como o Trolox™. Mas a maioria dos estudos expressa os resultados como valor de IC<sub>50</sub>, definida como a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH• em 50%. Dessa forma, quanto mais baixo o valor de CE<sub>50</sub>, mais eficiente o antioxidante (Brandwilliams, Cuvelier e Berset, 1995).

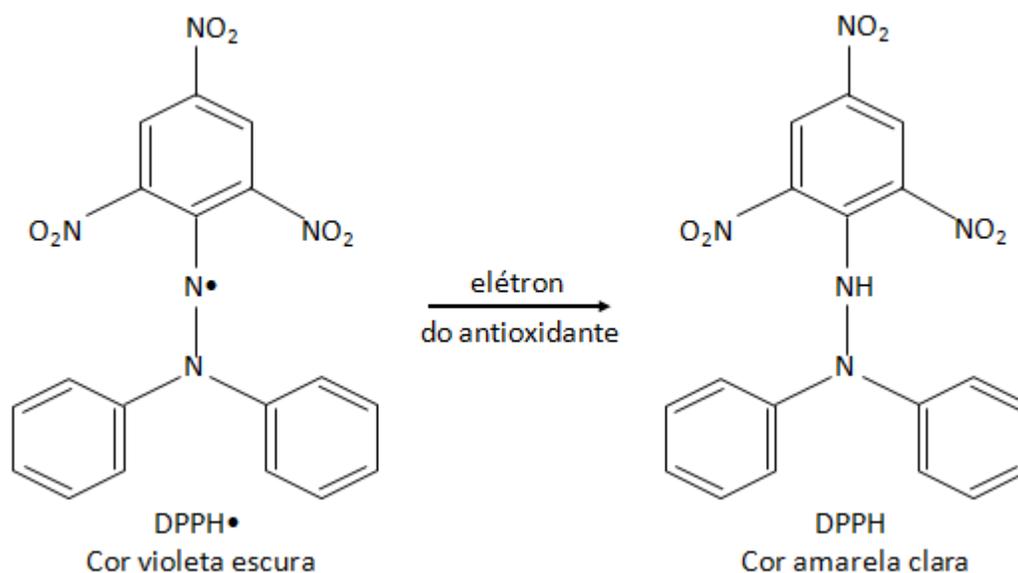


Figura 3.9 - Reação de sequestro do radical livre DPPH•.

Apesar do método do DPPH ser muito utilizado, a falta de padronização dos resultados torna difícil comparar a atividade antioxidante de diferentes extratos e compostos puros.

### 3.2.2 Atividade antioxidante pelo método ORAC

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

O teste ORAC é realizado em espectrofotômetro e consiste na medida da proteção exercida pelas moléculas contra a oxidação da fluoresceína pelo radical livre AAPH (2,2'-azobis(2-amidino)propano diidrocloreto). Os resultados são dados referentes à proteção exercida por um composto de referência, o Trolox (Ou, Hampsch-Woodill e Prior, 2001).

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



O radical AAPH reage com o oxigênio para formar um radical peroxil mais estável:



A perda da fluorescência da fluoresceína é uma indicação da extensão da sua reação com o radical peroxil. Neste caso, o antioxidante reage pelo mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) e doa um átomo de hidrogênio para formar um hidroperóxido (ROOH) e um radical antioxidante estável (A•), em consequência, os danos à fluoresceína induzidos pelo radical peroxil são inibidos.



Ou, Hampsch-Woodill *et al.* (2001) mostraram que, sob circunstâncias experimentais de ORAC, a diminuição da fluorescência independe das concentrações de fluoresceína, mas depende da concentração de AAPH. Assim, a taxa de reação é limitada pelo AAPH. A maioria das amostras não afeta a taxa de decomposição do AAPH, e o AAPH não reage diretamente com o antioxidante. Em consequência, o ensaio de ORAC mede diretamente a atividade antioxidante pelo mecanismo de quebra de corrente dos radicais peroxil.

### 3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cromatografia é um método de separação no qual os componentes a serem separados estão seletivamente distribuídos entre duas fases imiscíveis: uma fase estacionária que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (Niessen, 1992; Jardim, Collins e Guimarães, 2006; Lanças, 2009). Em geral, a CLAE é utilizada para separar compostos que possuem uma ou mais das características a seguir: alta polaridade, alto peso molecular, instabilidade térmica, pouca volatilidade e tendência em formar íons em solução (Niessen, 1992). Dessa forma, como os compostos fenólicos antioxidantes são, em geral, polares, termicamente sensíveis e com alto peso molecular, a CLAE é a técnica mais empregada para análise quantitativa dessas substâncias.

A coluna C18 é a mais comumente usada em CLAE devido à sua vasta aplicabilidade analítica. Essa coluna serve para separações em fase reversa: os componentes da amostra são

separados com base nas suas diferenças de polaridade, as quais criam forças de interação específicas entre o gel, a fase móvel e os analitos. A Fase Reversa é mais adequada para separação dos compostos fenólicos, enquanto que, os solventes (fase móvel) mais empregados são acetonitrila, metanol e água em mistura ácida com ácido acético (Selles *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Cetkovic *et al.*, 2012; Irakli *et al.*, 2012; Rodriguez-Rojo *et al.*, 2012).

O recheio das colunas de Fase Reversa é, tipicamente, feito de gel de sílica modificado com diversos grupos funcionais hidrofóbicos. Entre esses modificadores, o grupo funcional mais comum é o octadecil. Por isso, as colunas C18 de sílica são também chamadas, frequentemente, de ODS (do inglês, *octadecyl silica*). O grupo funcional octadecil é uma cadeia linear com 18 átomos de carbono. Um grande número de cadeias desse hidrocarboneto é ligado à superfície do gel de sílica, bem como ao interior dos seus poros.

Nos extratos derivados das folhas e casca da mangueira, a mangiferina é composto fenólico majoritário e, usualmente, é quantificado pela CLAE. Ling, Yap *et al.* (2009) utilizaram a CLAE em modo reversa com coluna C18 para quantificação da mangiferina nos extratos das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.) obtidos com água e etanol. Os solventes utilizados foram água com 3% de ácido acético e acetonitrila. A detecção foi feita no comprimento de onda 254 nm.

Selles, Castro *et al.* (2002) também utilizaram a CLAE em fase reversa com uma coluna de C<sub>18</sub> e uma fase móvel constituída de água com 2% de ácido acético e acetonitrila para identificação de diversos compostos fenólicos dos extratos da casca do caule da mangueira (*Mangifera indica* L.). Eles identificaram que a mangiferina era o composto predominante do pó obtido e sua detecção foi feita em 278 nm.

### 3.3 Extração de antioxidantes

O objetivo geral da extração de antioxidantes é liberar os compostos fenólicos da estrutura da matriz vegetal a fim de se obter extratos com elevada atividade antioxidante. Os compostos fenólicos antioxidantes estão presentes em pequenas quantidades na matriz sólida natural e, conseqüentemente, os extratos não concentrados deveriam ser utilizados em grandes quantidades para melhorar a estabilidade dos produtos contra a oxidação. No entanto, isso poderia ter um efeito negativo nas características organolépticas e nas propriedades funcionais dos produtos.

Deste modo, a escolha da técnica de extração adequada e do solvente é um dos procedimentos mais importantes para melhorar o rendimento da extração dos antioxidantes.

### 3.3.1 Extração convencional

A extração convencional utilizando um solvente orgânico e/ou água é a técnica mais empregada para a obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos de diversas matrizes vegetais. Os extratos obtidos são sempre uma mistura de diferentes classes de fenóis (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, antocianinas, taninos, entre outros), pois a natureza química dos compostos encontrados em plantas é heterogênea (Naczki e Shahidi, 2004). A solubilidade desses compostos depende diretamente da polaridade do solvente empregado. Água, metanol, etanol e acetona são os solventes mais utilizados (Chirinos *et al.*, 2007; Lafka, Sinanoglou e Lazos, 2007; Spigno, Trarnelli e De Faveri, 2007; Proestos e Komaltis, 2008; Mussatto *et al.*, 2011; Wijekoon, Bhat e Karim, 2011).

Em geral, as angliconas (compostos fenólicos sem moléculas de açúcar) altamente hidroxiladas são solúveis em álcoois. Solventes menos polares, como a acetona, são utilizados para obtenção de componentes com baixa polaridade e os mais polares são extraídos utilizando água. Sendo assim, combinar solventes com diferentes polaridades é uma estratégia útil para aumentar a eficiência do processo de extração (Gonzalez e Gonzalez, 2010). No entanto, estudos recentes têm voltado à atenção para a utilização de apenas água e/ou etanol, pois esses solventes são considerados seguros e, conseqüentemente, são amplamente aceitos pela indústria de alimentos (Chen, Lin e Hsieh, 2007; Shukla *et al.*, 2009; Rodriguez-Rojo *et al.*, 2012).

Chen, Lin *et al.* (2007) avaliaram a atividade antioxidantes dos extratos aquosos das folhas de *Psidium guajava* L. (PE), *Camellia sinensis* (CE), *Toona sinensis* Roem. (TE) e *Rosemarinus officinalis* L. (RE). O extrato de PE apresentou o maior potencial antioxidante e exibiu mais de 95% de inibição do radical livre DPPH• em uma concentração de 50 µg/mL. Todas as folhas foram consideradas fontes potenciais de antioxidantes naturais.

Shukla, Mehta *et al.* (2009) estudaram o potencial antioxidante dos extratos etanólicos das sementes da *Caesalpinia bonducella*. A inibição do radical livre DPPH• do extrato em uma concentração de 50 µg/mL foi de 58,85%, apenas 13,52% a menos que o ácido ascórbico (padrão comercial) na mesma concentração. Segundo os autores, os resultados obtidos indicam que as

sementes de *Caesalpinia bonducella* têm um grande potencial para ser utilizada com um antioxidante natural.

Rodriguez-Rojo, Visentin *et al.* (2012) investigaram a utilização de água e etanol para obtenção de extratos da folha de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.) empregando várias técnicas de extração (extração convencional, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom) e dois diferentes pré-tratamentos (extração dos óleos essenciais e extração dos óleos essenciais combinada com moagem da matriz vegetal). Em geral, os extratos aquosos mostraram melhor atividade antioxidante pelo método de inibição do radical livre DPPH•.

### 3.3.2 Extração supercrítica

A extração supercrítica de matrizes sólidas ocorre tipicamente em leito fixo e regime transiente utilizando um fluido acima da sua pressão e temperatura crítica. A matéria-prima permanece dentro de um leito cilíndrico e o solvente percola o leito na direção axial, dissolvendo os componentes solúveis da matriz vegetal. A etapa de separação entre solvente supercrítico e soluto requer apenas uma diminuição na pressão, tornando soluto-solvente insolúveis e promovendo a separação (Williams, 1981; Sovová, 1994).

O fluido supercrítico mais utilizado para a extração de compostos fenólicos é o dióxido de carbono (Piantino *et al.*, 2008; Gelmez, Kincal e Yener, 2009), pois possui algumas características ideais ao uso: é inerte, atóxico, não inflamável e de baixo custo (Pokorny e Korczak, 2001). Além disso, a utilização do CO<sub>2</sub> supercrítico remove as etapas de evaporação necessárias no processo convencional, onde o calor aplicado para remover o solvente pode promover a degradação de alguns antioxidantes termolábeis (Shi *et al.*, 2011). Em contrapartida, a solubilidade de substâncias polares, como alguns compostos fenólicos, no CO<sub>2</sub> supercrítico (pouco polar) pode ser baixa e esses compostos podem não ser extraídos com a eficiência desejada (Gonzalez e Gonzalez, 2010; Shi *et al.*, 2011).

Piantino, Aquino *et al.* (2008) obtiveram extratos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* utilizando dióxido de carbono supercrítico, etanol e metanol. A extração supercrítica foi realizada a temperaturas de 40, 50 e 60 °C e a pressões de 20, 30 e 40 MPa. Quatro compostos fenólicos foram analisados nos extratos: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 4-hidroxicinâmico (*p*-cumárico) e 4-metoxi-3,5,7-

trihydroxyflavone (kaempferide). Os rendimentos globais de extração obtidos com etanol e metanol foram melhores. No entanto, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico a 60 °C e 40 MPa, os rendimentos individuais da extração de kaempferide, DHCA e PHCA foram 156%, 98% e 64% maiores, respectivamente, que os extratos etanólicos. Apenas o rendimento do *p*-cumárico foi melhor quando extraído utilizando metanol e etanol.

Gelmez, Kincal *et al.* (2009) avaliaram o efeito da pressão (148-602 bar), temperatura (40-60 °C) e tempo de extração (10-60 min) do CO<sub>2</sub> supercrítico na atividade antioxidante e no teor de compostos fenólicos dos extratos de germe de trigo torrado. As condições ótimas de extração que maximizaram as variáveis de resposta foram 336 bar, 58 °C e 10 min, onde o rendimento global foi de 5,3%.

### 3.3.3 Extração em duas etapas

Alguns pesquisadores empregaram a extração em duas etapas utilizando solventes com polaridades diferentes para a obtenção de extratos naturais. Foi observado, por exemplo, que o pré-tratamento da matriz vegetal com solventes orgânicos apolares (*e.g.* hexano) aumenta a eficiência da extração de compostos fenólicos (Ruberto *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2009). No entanto, devido aos problemas de toxicidade destes solventes, o dióxido de carbono supercrítico é uma boa alternativa para ser utilizado na primeira etapa de extração, uma vez que as condições severas de pressão podem afetar a estrutura da matriz sólida. Nesses casos, a extração ocorre em duas etapas, combinando a extração supercrítica e a extração convencional. A extração dos componentes pouco polares pelo CO<sub>2</sub> supercrítico durante a primeira etapa e a despressurização do leito após a extração supercrítica pode alterar a estrutura da matriz vegetal e sua interação com os solutos remanescentes. Dessa forma, o teor de fenóis nos extratos resultantes da segunda etapa de extração pode ser superior comparado a aqueles obtidos utilizando apenas uma única etapa (Ribeiro, Bernardo-Gil e Esquivel, 2001; Vatai, Skerget e Knez, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011).

Ribeiro, Bernardo-Gil *et al.* (2001) estudaram o extratos das folhas de erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) nas pressões de 10 até 18 MPa e nas temperatura entre 308 e 313 K. Os extratos obtidos dos resíduos sólidos da extração supercrítica a 10 MPa e 323 K tiveram maior concentração de fenóis e atividade antioxidante.

Vatai, Skerget *et al.* (2009) investigaram as condições ótimas para extração dos compostos fenólicos do bagaço da uva utilizando dióxido de carbono supercrítico e solventes orgânicos. Uma única etapa de extração com etanol, acetato de etila e acetona em diferentes proporções de água foi empregada. A extração em duas etapas (extração supercrítica seguida da extração convencional) também foi investigada. Por fim, esses autores reportaram que a extração em duas etapas apresentou maiores rendimentos de polifenóis.

Martinez-Correa, Magalhaes *et al.* (2011) avaliaram a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato da folha de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) obtido com uma ou duas etapas de extração. Os solventes utilizados foram água, etanol e dióxido de carbono supercrítico. Para o processo em duas etapas, os resultados mostram que a água foi mais eficiente na extração dos compostos fenólicos quando a matriz vegetal foi previamente tratada com CO<sub>2</sub> supercrítico. Em relação à atividade antioxidante, os extratos etanólicos de ambos processos (uma ou duas etapas de extração) apresentaram maior capacidade de inibição do radical livre DPPH•.

### **3.4 Modelagem matemática da extração supercrítica**

#### **3.4.1 Solubilidade**

No processo de extração supercrítica é crucial obter a solubilidade do extrato no dióxido de carbono no intuito de determinar as condições operacionais ótimas. A determinação experimental da solubilidade dos componentes no CO<sub>2</sub> supercrítico em várias temperaturas e pressões é dispendiosa. Portanto, a correlação e a predição da solubilidade são essenciais.

Em geral, há dois tipos de modelos utilizados para correlacionar e prever a solubilidade: modelos teóricos baseados nas equações de estado e modelos semi-empíricos. Modelos teóricos como equações de estado cúbicas precisam de procedimentos computacionais complexos e do conhecimento das propriedades críticas do soluto, fator acêntrico e pressão de vapor. No entanto, os modelos semi-empíricos, os quais são baseados na minimização de uma função objetivo, precisam apenas da temperatura, pressão, densidade do solvente e os dados de solubilidade. A maioria das equações semi-empíricas são em função da densidade do solvente.

Chrastil (1982) assumiu que as moléculas de um sólido se associam com as moléculas do solvente, formando um complexo, que está em equilíbrio com o fluido. Com uma análise deste equilíbrio ele chegou à primeira equação semi-empírica da solubilidade em função da densidade do solvente:

$$Y^* = \rho^{k_1} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T}\right) \quad (3.6)$$

Em que:

$Y^*$  = solubilidade do soluto no solvente (M/L<sup>3</sup>);

$\rho$  = densidade do solvente (M/L<sup>3</sup>);

$k_1$  = parâmetro ajustável associado ao número de associação médio;

$a_1$  = parâmetro ajustável que é função do número de associação médio e dos pesos moleculares do soluto e solvente;

$a_2$  = parâmetro ajustável que é função da entalpia de solvatação  $r$  da entalpia de vaporização;

Adachi e Lu (1983) correlacionaram o número de associação médio com um polinômio de segunda ordem, obtendo menores erros na correlação das isotermas de solubilidade dos solutos. O modelo de Adachi e Lu (1983) é apresentado a seguir:

$$Y^* = \rho^{k_1 + k_2\rho + k_3\rho^2} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T}\right) \quad (3.7)$$

Em que:

$k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  = são parâmetros ajustáveis do modelo.

Ainda com base no modelo de Chrastil (1982), Del Valle e Aguilera (1988) levaram em consideração a mudança na entalpia de vaporização com a temperatura e obtiveram a equação modificada a seguir:

$$Y^* = \rho^{k_1} \exp\left(a_1 + \frac{a_2}{T} + \frac{a_3}{T^2}\right) \quad (3.8)$$

### 3.4.2 Cinética de extração

A modelagem matemática do processo de extração supercrítica permite que experimentos em escala laboratorial, responsáveis pela determinação de alguns parâmetros cinéticos, sejam aplicados no âmbito industrial. Dessa forma, a principal vantagem da modelagem é a predição das curvas de extração (massa de soluto extraída *versus* tempo) em um processo em larga escala, pois experimentos nesse nível são dispendiosos (Martinez e Martinez, 2008).

Na literatura, há diversos modelos matemáticos de extração supercrítica em leito fixo. Esses modelos baseiam-se na resolução dos balanços de massa da fase sólida e fluida. Entre os mais importantes temos os modelos de Tan e Liou (1989) e Sovová (1994).

Outro modelo que vem se mostrando eficiente na modelagem da cinética de extração supercrítica é o modelo de segunda ordem, o qual é usualmente empregado para representar a dinâmica de adsorção em colunas de leito fixo. De Souza, Benazzi *et al.* (2008) adaptaram o modelo empírico de segunda ordem para escrever a cinética de extração do óleo de candeia, e o modelo se mostrou bastante apropriado.

#### 3.4.2.1 Modelo de Tan e Liou (1989)

O modelo de Tan e Liou (1989) descreve a transferência de massa interfacial como uma cinética de primeira ordem. Esses autores consideram que a difusão não influencia a cinética de extração. Os balanços de massa para a fase líquida e sólida, respectivamente, são descritas pelas seguintes Equações 3.9 e 3.10.

$$\varepsilon\rho \frac{\partial Y}{\partial t} + u\rho \frac{\partial Y}{\partial h} = -(1-\varepsilon)\rho_s \frac{\partial X}{\partial t} \quad (3.9)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -k_d X \quad (3.10)$$

Em que:

$\varepsilon$  = porosidade do leito;

$\rho$  = massa específica do fluido (M/L<sup>3</sup>);

$\rho_s$  = massa específica do sólido (M/L<sup>3</sup>);

$u$  = velocidade superficial do fluido (L/T);

$t$  = tempo (T);

$Y$  = Razão entre massa de soluto e massa de solvente (M/M);

$X$  = Razão entre massa de soluto e massa de sólido inerte (M/M);

$k_d$  = coeficiente de dessorção do soluto (T<sup>-1</sup>).

Para resolução dessas equações as condições iniciais e de contorno são as seguintes:

$$Y(h, t = 0) = 0 \quad (3.11)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (3.12)$$

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (3.13)$$

Em que:

$X_0$  = Razão entre a massa inicial de soluto e a massa de sólido inerte (M/M).

Resolvendo os balanços de massas, as condições iniciais e a condição de contorno obtém-se uma expressão que representa a razão mássica do extrato no solvente na saída do extrator em função do tempo do processo:

$$Y(h = H, t) = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \left[ \exp\left(\frac{k_d \varepsilon H}{u}\right) - 1 \right] \exp(-k_d t) \quad (3.14)$$

Uma restrição desse modelo é que a condição inicial (Equação 3.11) não é satisfeita na Equação 3.14, indicando um possível erro na resolução dos balanços de massa. A cinética da extração (massa extraída em função do tempo) é obtida através da resolução da Equação 3.15.

$$m(t) = \int_0^t Y(h = H, t) Q_{CO_2} dt \quad (3.15)$$

Em que:

$Q_{CO_2}$  = vazão mássica de fluido (M/T);

Dessa forma, substituindo a Eq. 3.14 na Eq. 3.15 e resolvendo tem-se:

$$m(t) = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(k_d B)] [\exp(-k_d t) - 1] \quad (3.16)$$

$$A = Q_{CO_2} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \quad (3.17)$$

$$B = \frac{\varepsilon H}{u} = \frac{\varepsilon H a_0 \rho}{Q_{CO_2}} \quad (3.18)$$

Em que:

$H$  = altura do leito (L);

$a_0$  = área superficial do sólido relativo ao volume do leito (L<sup>2</sup>/L<sup>3</sup>).

### 3.4.2.2 Modelo de Sovová (1994)

No modelo de Sovová (1994), a massa inicial de soluto ( $O$ ) pode ser representada por:

$$O = P + K \quad (3.19)$$

Em que:

$P$  = é a massa de soluto de fácil extração na superfície do sólido (M);

$K$  = é a massa de soluto depositado no interior do sólido (M).

Durante toda a extração a massa de inerte  $m_i$  permanece constante e a fração de óleo pode ser relacionada da seguinte forma:

$$\frac{O}{m_i} = \frac{P}{m_i} + \frac{K}{m_i} = X_0 = X_p + X_k \quad (3.20)$$

Os balanços de massa do sólido e do solvente para um elemento do leito são representados, respectivamente, por:

$$-\rho_s(1-\varepsilon)\frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (3.21)$$

$$\rho\varepsilon\frac{\partial Y}{\partial t} + \rho u\frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (3.22)$$

Em que:

$\varepsilon$  = porosidade do leito;

$\rho$  = massa específica do fluido supercrítico (M/L<sup>3</sup>);

$\rho_s$  = massa específica do sólido (M/L<sup>3</sup>);

$u$  = velocidade superficial do fluido (L/T);

$t$  = tempo (T);

$Y$  = razão entre massa de soluto e massa de solvente (M/M);

$X$  = razão entre massa de soluto e massa de sólido inerte (M/M);

$J(X,Y)$  = taxa de transferência de massa (M/L<sup>3</sup>T).

Segundo Sovová (1994), o primeiro termo da Equação 3.22 pode ser negligenciado e, dependendo da localização do soluto nas células, a taxa de transferência de massa  $J(X,Y)$  pode ser representada por duas equações:

$$J(X > X_k, Y) = k_f a_0 \rho (Y_r - Y) \quad (3.23)$$

$$J(X \leq X_k, Y) = k_s a_0 \rho_s X (1 - Y/Y_r) \quad (3.24)$$

Em que:

$Y_r$  = solubilidade do soluto no solvente (M/M);

$k_f$  = coeficiente de transferência de massa no filme externo (M/T);

$k_s$  = coeficiente de transferência de massa no sólido (M/T);

$a_0$  = área superficial do sólido relativo ao volume do leito (L<sup>2</sup>/L<sup>3</sup>).

Quando ocorre a extração do soluto nas superfícies das células  $X_p$ , a resistência a transferência de massa é a difusão no filme externo e, então, utiliza-se a Equação 3.23. Enquanto que, durante a extração do soluto do interior das células  $X_k$ , a resistência predominante para a transferência de massa é a difusão do soluto no interior do sólido, e, portanto, usa-se a Equação 3.24.

Na resolução das Equações 3.21-3.24, Sovová (1994) considerou que a condição inicial da fase sólida (Equação 3.25) é igual à concentração inicial de soluto  $X_0$ , enquanto que a condição de contorno é dada pela Equação 3.27.

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (3.25)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (3.26)$$

A resolução das Equações 3.21-3.26 em conjunto com a Equação 3.15 resulta na curva cinética do modelo:

Para  $t \leq t_{CER}$ :

$$m(t) = Q_{CO_2} Y_r [1 - \exp(-Z)]t \quad (3.27)$$

Para  $t_{CER} < t < t_{FER}$ :

$$m(t) = Q_{CO_2} Y_r [t - t_{CER} \exp(Z_w(t) - Z)] \quad (3.28)$$

Para  $t \geq t_{FER}$ :

$$m(t) = m_i \left[ X_0 - \frac{Y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[ \exp\left(\frac{WX_0}{Y_r}\right) - 1 \right] \exp\left[\frac{WQ_{CO_2}}{m_i}(t_{CER} - t)\right] \left(\frac{X_p}{X_0}\right) \right\} \right] \quad (3.29)$$

Em que:

$$Z_w(t) = \frac{ZY_r}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \exp\left[\frac{WQ_{CO_2}(t - t_{CER})}{m_i}\right] - X_k}{(X_0 - X_k)} \right\} \quad (3.30)$$

$$W = \frac{k_s a_0 m_i}{Q_{CO_2} (1 - \varepsilon)} = \frac{kZY_r}{X_k} \quad (3.31)$$

$$Z = \frac{k_f a_0 m_i \rho}{\rho_s Q_{CO_2} (1 - \varepsilon)} \quad (3.32)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_i}{WQ_{CO_2}} \ln \left[ \frac{X_k + X_p \exp[WX_0 / Y_r]}{X_0} \right] \quad (3.33)$$

$$X_p = \frac{t_{CER} Y_r Z Q_{CO_2}}{m_i} \quad (3.34)$$

No tempo  $t_{CER}$  esgota-se o soluto presente na superfície das células no início do leito e inicia-se uma fronteira móvel  $Z_w(t)$  que divide o leito em duas partes. O soluto na superfície do sólido é extraído na parte acima dessa fronteira móvel, enquanto que na outra parte ocorre a extração do soluto presente no interior das células  $X_k$ . Essa fronteira móvel é dada pela Equação 3.30. Ela percorre o leito entre  $t_{CER}$  e  $t_{FER}$ . Depois de  $t_{FER}$ , a extração em todo o leito é governada pela difusão no interior do sólido.

### 3.4.2.3 Modelo de De Souza, Benazzi *et al.* (2008)

O modelo de extração de segunda ordem de De Souza, Benazzi *et al.* (2008) assume que a taxa de extração é proporcional à capacidade residual de extração dos solutos pelo solvente ( $Y^* - C$ ) e a concentração dos solutos na matriz sólida ( $X$ ). As taxas de transferência de massa obedecem às seguintes equações:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\rho_{bed}}{\varepsilon} \frac{\partial X}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (3.35)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -kX(Y^* - C) \quad (3.36)$$

Em que:

$k$  = constante cinética ( $L^3/MT$ );

$Y^*$  = solubilidade do extrato no solvente ( $M/L^3$ );

$v$  = velocidade intersticial ( $L/T$ );

$X$  = concentração de extrato na matriz sólida ( $M/M$ );

$C$  = concentração do extrato no solvente ( $M/L^3$ );

$\rho_{leito}$  = densidade do leito ( $M/L^3$ );

$\varepsilon$  = porosidade do leito;

$z$  = coordenada na direção axial do leito ( $L$ ).

As condições iniciais e de contorno são as seguintes:

$$\begin{aligned} C(0, h) &= Y^* \\ X(0, h) &= X_0 \\ C(t, 0) &= \begin{cases} Y^* & t = 0 \\ C_0 & t > 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (3.37)$$

A solução analítica deste modelo é dado por:

$$\frac{C}{Y^*} = \begin{cases} 1 & t < t_r \\ 1 - \frac{1}{(e^A + e^{-B} - 1)e^B} & t > t_r \end{cases} \quad (3.38)$$

Onde:

$$\begin{aligned}
 A &= \frac{h}{u} \beta \\
 B &= \frac{(-tu + h) \beta}{\alpha u} \\
 \beta &= KY^* \alpha \\
 \alpha &= \frac{\rho_{leito} X_0}{\varepsilon Y^*}
 \end{aligned}
 \tag{3.39}$$

Em que:

$t_r$  = tempo de residência do CO<sub>2</sub> no leito.

O parâmetro  $K$  da taxa de extração pode ser estimado a partir dos dados experimentais. A massa de extrato obtida em função do tempo foi calculada pela seguinte equação:

$$m(t) = \int_0^t C(t, h = H) w dt = \begin{cases} Y^* w t & t < t_r \\ Y^* t w + \frac{w}{K} \ln \left( \frac{\exp(z\beta/v) + \exp(t_r v - Z)\alpha - 1}{\exp(z\beta/v) + \exp(tv - Z)\alpha - 1} \right) & t > t_r \end{cases}
 \tag{3.40}$$

Onde:  $w$  representa a vazão volumétrica do solvente e  $C(t, h = H)$  é a concentração de óleo na fase fluída na saída da coluna.

### 3.5 A mangueira (*Mangifera indica* L.)

A mangueira (*Mangifera indica* L.) pertence à família Anarcadiaceae e é a segunda espécie frutífera tropical mais importante depois da bananeira. É nativa do sul da Ásia e tem sido cultivada desde tempos antigos. No entanto, se espalhou em todo o mundo nos últimos séculos (Singh e Singh, 2012).

Sua fruta, a manga, está entre as frutas tropicais mais apreciadas em todo o mundo, sendo considerada uma das frutas mais popular e economicamente importante devido suas excelentes características sensoriais (brilho, cor, sabor e aroma) e composição química (vitaminas, minerais, fibras e fitoquímicos) (Kim, Lounds-Singleton e Talcott, 2009).

Há anos a mangueira tem sido objeto de pesquisa. Ribeiro, Barbosa *et al.* (2008) mostraram que os extratos aquoso-metanólicos da polpa, semente e casca (pele) de diversos tipos de manga apresentam atividade antioxidante superior a dois padrões comerciais (BHA e ácido gálico),

fato atribuído ao seu alto teor de compostos fenólicos. Nesse trabalho, os antioxidantes comerciais foram testado na concentração de 100 ppm, a qual corresponde a concentração máxima permitida pela legislação brasileira nos alimentos.

Palafox-Carlos, Yahia *et al.* (2012) estudaram o efeito do amadurecimento da manga na sua composição e identificaram que variações no teor fenóis totais estão diretamente relacionadas com a alteração na atividade antioxidante medida pelo método de inibição do radical livre DPPH•.

Matusaka e Kawabata (2010) também obtiveram um relação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (medida pelo método de inibição do radical livre DPPH•) dos extratos aquosos-etanólicos da polpa, semente e casca (pele) da manga. Além disso, entre as oito frutas analisadas, eles concluíram que as partes não comestíveis (casca e semente) da manga (fruta) apresentam atividade antioxidante significativamente superior às demais. Diversos outros pesquisadores também confirmaram o alto poder antioxidante dessas partes não comestíveis e sua relação com o teor de compostos fenólicos (Soong e Barlow, 2006; Abdalla *et al.*, 2007; Ajila *et al.*, 2007; Dorta, Gloria Lobo e Gonzalez, 2012). Dessa forma, os subprodutos da manga podem ser uma alternativa segura aos antioxidantes sintéticos em biscoitos, óleos vegetais e salgadinhos de batata (Puravankara, Boghra e Sharma, 2000; Ajila *et al.*, 2007).

Além das partes comestíveis e não comestíveis da fruta, outras partes da mangueira também estão sendo estudadas. O extrato aquoso da casca do caule da mangueira, a qual tem sido utilizada em formulações farmacêuticas em Cuba com o nome de Vimang®, tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias (Garrido *et al.*, 2004), antialérgicas (Garcia *et al.*, 2003) e antioxidantes (Martinez *et al.*, 2000). O componente fenólico majoritário desse extrato é a mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C<sub>2</sub>-β-D-glucosídeo) (Figura 3.10), ainda que outros componentes, como ácidos fenólicos, ésteres fenólicos e flavonóis, tenham sido identificados (Rodriguez *et al.*, 2006).

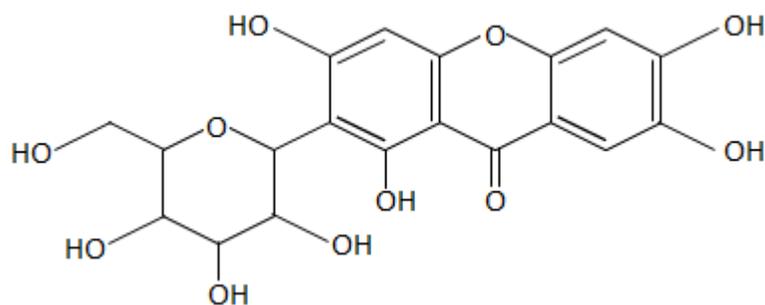


Figura 3.10 - Estrutura química da mangiferina.

Pereira e Meireles (2007) estudaram a atividade antioxidante do extrato da folha da mangueira obtido com dióxido de carbono supercrítico. Eles avaliaram a influência da pressão (100-300 bar) do dióxido de carbono na atividade antioxidante do extrato da folha, e concluíram que apenas nas condições de extração de 250 bar e 45 °C os extratos obtidos tinham poder antioxidante. Isto mostra a alta seletividade do dióxido de carbono na extração dos compostos antioxidantes.

Recentemente, Ling, Yap *et al.* (2009) obtiveram extratos aquosos e etanólicos das folhas de mangueira com capacidade antioxidante (através dos métodos de inibição dos radicais livre DPPH• e ABTS•<sup>+</sup>) significativamente superior ao extrato da semente de uva, o qual tem atividade similar ao antioxidante sintético BHA (Jayaprakasha, Singh e Sakariah, 2001). Novamente, a alta atividade antioxidante está relacionada ao alto teor de fenóis totais e à presença da mangiferina.

A mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C<sub>2</sub>-β-D-glucosídeo) é uma xantona derivada da C-glicosilxantona (Aritomi e Kawasaki, 1970) que está distribuída em plantas superiores, tais como as famílias Anacardiaceae e Gentianaceae. Nos extratos da casca e da folha da mangueira, a mangiferina é o principal componente e o mais ativo (Yoshimi *et al.*, 2001). Além de seu potencial antioxidante (Garrido *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2006), esse flavonóide possui atividade anti-tumoral (Guha, Ghosal e Chattopadhyay, 1996; Yoshimi *et al.*, 2001), anti-viral (Guha, Ghosal e Chattopadhyay, 1996; Leiro *et al.*, 2003), imunoprotetora (Leiro *et al.*, 2003; Muruganandan, Lal e Gupta, 2005) e atividade vascular modulatória (Beltran *et al.*, 2004).

Dessa forma, devido à ação benéfica de diversos fenóis (*e.g.* mangiferina) dos extratos das partes da mangueira (casca do tronco, fruto e folhas), o consumo dos derivados da mangueira deve ser estimulado para uma melhoria na qualidade de vida, principalmente devido sua

---

abundância nas regiões tropicais, o que torna acessível à população, independente da classe social.

Além disso, com base na revisão bibliográfica, verificou-se a importância dos compostos fenólicos e da busca de fontes e métodos de extração que resultem em extratos com elevada capacidade antioxidante. Particularmente, na obtenção de extratos das folhas da mangueira, foram encontrados relatos de trabalhos que avaliaram a atividade antioxidante dos extratos obtidos com água, etanol (Ling *et al.*, 2009) e com dióxido de carbono supercrítico (Pereira e Meireles, 2007). No entanto, a combinação de métodos (CO<sub>2</sub> supercrítico seguida da extração convencional) tem se mostrado eficiente, obtendo maior rendimento na extração dos compostos fenólicos quando comparado com a extração em uma única etapa. A escassez de informações da literatura a respeito do uso desse método de extração combinado é o foco principal deste trabalho.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram avaliados a atividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e a quantidade de mangiferina dos extratos das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.) obtidos pela extração convencional (com água e etanol), supercrítica e pela combinação dessas duas metodologias (extração em duas etapas).

### 4.1 Matéria-prima

As folhas da mangueira (*Mangifera indica* L., variedade Carabao) foram coletadas nas plantações experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas, São Paulo) em setembro de 2012. Todo material foi inicialmente armazenado em sacos plásticos e transportado até o Laboratório de Processos Termofluidodinâmicos na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LPTF/FEQ/UNICAMP).

Em seguida, o material foi desidratado através da secagem natural (em temperatura ambiente) por sete dias e, então, triturado em um liquidificador comercial (Philco, modelo PH5000CL). As folhas trituradas foram acondicionadas em sacos plásticos herméticos e armazenadas em um refrigerador doméstico (Consul, modelo CVU20) à *ca.* -18 °C.

O material triturado foi classificado de acordo com a série padrão de peneiras Tyler de 16 a 100 mesh utilizando um agitador de peneiras (Bertel, série 302 tipo Magnético) no Laboratório de Processos Termofluidodinâmicos na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LPTF/FEQ/UNICAMP). O material retido entre as peneiras de 28 e 32 mesh foi utilizado nas extrações.

### 4.2 Reagentes

Dióxido de carbono 99,9% (Linde, Brasil), etanol P.A. (Nuclear, Brasil) e água destilada foram empregados como solventes nos processos de extração.

Solução de Karl Fischer P.A. (Fmaia, Brasil) e nitrogênio (White Martins Gases Industriais, Brasil) foram utilizados para determinação do teor de umidade através do método de Karl Fisher.

DPPH (Sigma-Aldrich, USA), Trolox<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, USA), AAPH (Sigma-Aldrich, USA), metanol grau analítico (Synth, Brasil) e a fluorescência sódica (Synth, Brasil) foram utilizados nas metodologias DPPH e ORAC para avaliação da atividade antioxidante.

Reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica, Brasil), padrão ácido gálico (Sigma-Aldrich, USA) e carbonato de sódio anidro (Synth, Brasil) foram utilizados no método Folin-Ciocalteu para determinação do teor de fenóis totais.

Mangiferina (padrão HPLC, 99%, Sigma-Aldrich, USA), ácido acético glacial (padrão HPLC, Êxodo, Brasil) e acetonitrila (padrão HPLC, Êxodo, Brasil) foram utilizados na análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### **4.3 Caracterização da matéria-prima**

#### **4.3.1 Umidade**

A determinação da umidade das folhas desidratadas foi feita pelo método de Karl Fischer no Laboratório de Processos Termofluidodinâmicos na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LPTF/FEQ/UNICAMP). O titulador Karl Fischer (Metrohm, modelo 758 KFD Titrino) foi utilizado em conjunto com um forno (Metrohm, modelo 768 KF Ove) conectado a um cilindro de nitrogênio.

Cerca de 0,2 g de material foi inserido no forno onde nitrogênio a 105 °C e 80 mL/min carregou a água presente na amostra até o frasco onde ocorre a reação de Karl Fischer. A utilização do forno em conjunto com o fluxo de nitrogênio foi justificável visto que as amostras sólidas eram insolúveis na solução de Karl Fischer.

### 4.3.2 Teor de voláteis e umidade

A determinação do teor de voláteis e umidade das amostras foi feita através do método gravimétrico com o uso de uma estufa com circulação de ar forçada (Fanem, modelo 520) e de uma balança analítica (Shimadzu, AUY220) pertencentes ao Laboratório de Processos Termofluidodinâmicos na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LPTF/FEQ/UNICAMP).

O método emprega 3 g de material submetido à secagem em estufa a 105 °C por 24 horas. O teor de voláteis e umidade (VU) é calculado em base úmida pela Equação 4.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$VU(\%) = \frac{m_{amostra} - m_{amostra\_seca}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (4.1)$$

Em que:

$m_{amostra}$  = massa da amostra (M);

$m_{amostra\_seca}$  = massa da amostra seca (M);

### 4.3.3 Densidade real

A densidade real da amostra foi determinada por picnometria de gás hélio (Micromeritics, modelo Accu Pyr 1330) no Laboratório de Análise e Caracterização de Produtos e Processos na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP (LCP/FEQ/UNICAMP). Os ensaios foram realizados a 25 °C. O resultado final foi uma média da determinação da densidade real de 10 amostras.

### 4.3.4 Microestrutura

As folhas desidratadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEICA, modelo LEO 440i) antes e depois da extração supercrítica. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LRAC/FEQ/UNICAMP).

## 4.4 Caracterização do leito de extração supercrítica

### 4.4.1 Densidade do leito

A densidade aparente do leito  $\rho_{leito}$  foi obtida pela Equação 4.2.

$$\rho_{leito} = \frac{m_{alim}}{V_{leito}} \quad (4.2)$$

Em que:

$m_{alim}$  = massa da amostra alimentada no leito (M);

$V_{leito}$  = volume total do leito (L<sup>3</sup>).

### 4.4.2 Porosidade

A porosidade do leito  $\varepsilon$  foi calculada pela Equação 4.3.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{leito}}{\rho_s} \quad (4.3)$$

Em que:

$\rho_{leito}$  = densidade do leito (M/L<sup>3</sup>);

$\rho_s$  = densidade real da matéria-prima (M/L<sup>3</sup>).

## 4.5 Obtenção dos extratos

Os extratos da folha da mangueira (*Mangifera indica* L.) foram obtidos pela extração convencional com solventes líquidos (água e etanol) e com dióxido de carbono supercrítico, e pela combinação destes dois métodos (extração em duas etapas).

As extrações em duas etapas foram feitas utilizando as matrizes sólidas residuais das extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico realizadas a 150 e 250 bar, ambas a 40 °C. Neste caso, os solventes empregados (na segunda etapa) foram água e etanol. Os extratos foram rotulados como

mostra o diagrama na Figura 4.1. Para uma ou duas etapas, as condições operacionais da extração com água ou etanol foram as mesmas. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.

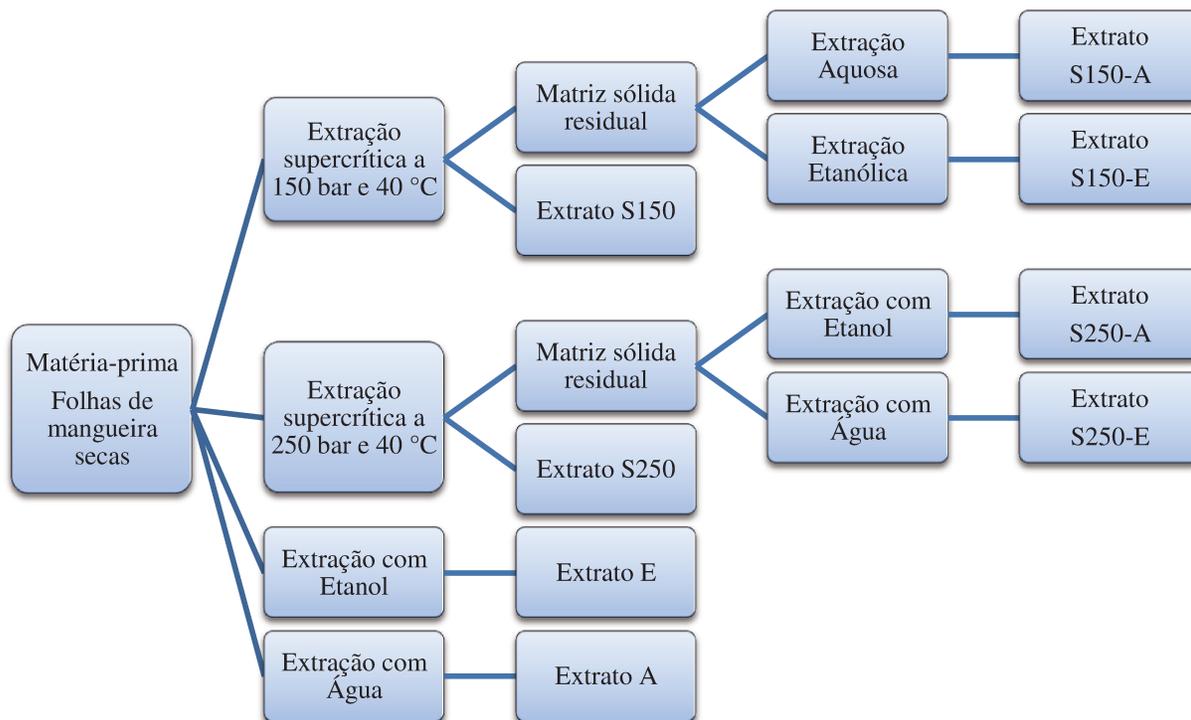


Figura 4.1 - Procedimento experimental para a extração em uma e duas etapas.

#### 4.5.1 Extração convencional

As extrações convencionais com água e etanol foram realizadas no Laboratório de Processos Termofluidodinâmicos na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LPTF/FEQ/UNICAMP).

Os extratos (A, E, S150-A, S150-E, S250-A e S250-E) foram obtidos pela metodologia proposta por Ling, Yap *et al.* (2009), os quais obtiveram bons resultados em relação à atividade antioxidante dos extratos das folhas da mangueira. Água ou etanol foram adicionados às folhas desidratadas em uma proporção de 10:1 (volume de solvente/massa de sólido). A extração foi realizada a 40 °C por 24 horas em um erlenmeyer acoplado a um *shaker* orbital a 150 RPM, hermeticamente fechado para evitar a evaporação do solvente. A suspensão obtida foi centrifugada (centrifuga Quimis, modelo 222T216) a 10.000 RPM por 5 min e, então, filtrada sob

vácuo (bomba Fisatom, modelo 825T) utilizando um kitasato e uma membrana de acetado de celulose (Sartorius Stedim) com  $0,45\ \mu\text{m}$  de diâmetro. Os extratos (aquosos e etanólicos) foram armazenados em um refrigerador doméstico (Consul, modelo CVU20) à *c.a.*  $-18\ ^\circ\text{C}$ . A Figura 4.2 mostra o fluxograma geral no qual foram obtidos os extratos aquosos e etanólicos.

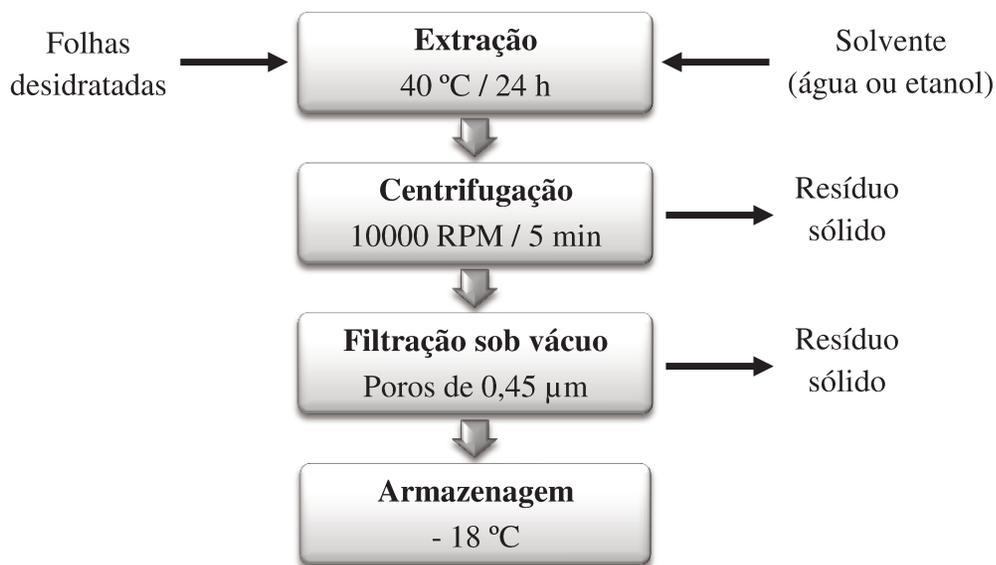


Figura 4.2 - Fluxograma da extração convencional.

#### 4.5.2 Extração supercrítica

Os experimentos para obtenção do extrato das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.) utilizando dióxido de carbono supercrítico foram realizados no Laboratório de Processos de Separação no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* Toledo. Foi feito um planejamento fatorial com ponto central do tipo  $2^2$  (Tabela 4.1), no qual buscou-se avaliar os efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento da extração.

Tabela 4. 1 - Condições experimentais dos ensaios de extração supercrítica.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão (bar)</b>
1	40	150
2	40	250
3	60	150
4	60	250
5	50	200
6	50	200
7	50	200

O módulo experimental é constituído pelos seguintes itens: reservatório para o solvente (cilindro de CO<sub>2</sub>), uma bomba seringa (Isco, modelo 500D) e dois banhos termostáticos. O primeiro (Julabo, modelo FP-50) é utilizado para resfriar o solvente antes de entrar na bomba seringa e o segundo (Marconi, modelo MA-184) para manter o extrator aquecido na temperatura desejada, conforme ilustrado na Figura 4.3.

Cerca 20 g de folhas desidratadas foram introduzidas no extrator de 2 cm de diâmetro e 17 cm de altura, com capacidade de 53,4 mL. Antes de entrar na bomba, o solvente era resfriado a 0 °C para prevenir sua vaporização. Uma vez resfriado e na fase líquida, o solvente foi bombeado e introduzido no sistema, entrando no extrator. Inicialmente o sistema era pressurizado (aproximadamente em intervalos de pressão de 20 bar) até alcançar a pressão desejada. Esse procedimento foi feito com a válvula de expansão fechada. Após a temperatura do banho de aquecimento alcançar o equilíbrio térmico, iniciou-se a extração pelo acionamento da bomba seringa e abertura das válvulas de expansão. A vazão volumétrica para o dióxido de carbono foi de 3 mL/min e era regulada a partir do ajuste da válvula micrométrica na saída do extrator. A bomba seringa tem acoplado um sistema de monitoramento das seguintes variáveis: pressão e volume de solvente gasto. A temperatura na saída do extrator foi mantida a 105 °C pelo temoregulador (Tholz, modelo MSC-04E) e, devido à despressurização, ocorria a separação entre o extrato e o solvente. O extrato foi coletado através de um recipiente de vidro âmbar e pesado a cada 10-20 minutos até atingir peso constante.

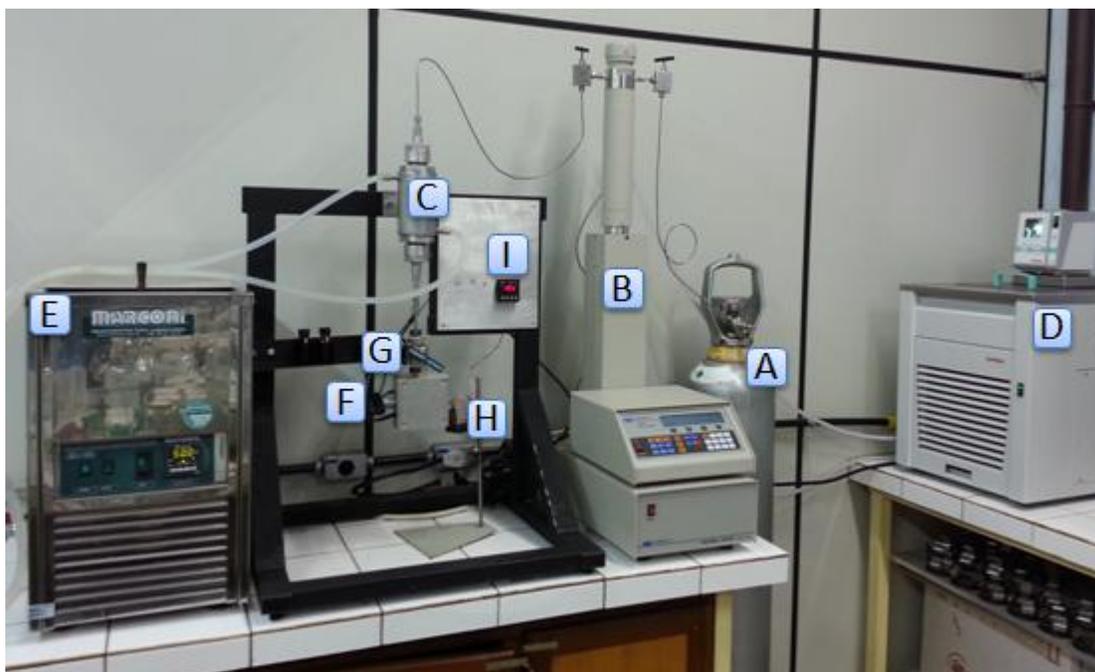


Figura 4.3 - Módulo experimental utilizado nas extrações com fluídos supercríticos. Legenda: a) cilindro de CO<sub>2</sub>, b) bomba seringa, c) extrator, d) e e) banhos termostáticos, f) válvula micrométrica, g) válvula de expansão, h) frasco coletor e i) controlador de temperatura .

#### 4.5.2.1 Densidade do CO<sub>2</sub> supercrítico

A densidade do dióxido de carbono supercrítico foi obtida nas tabelas termodinâmicas internacionais do dióxido de carbono (Angus, Dereuck e Armstrong, 1976) adotadas pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

#### 4.5.2.2 Solubilidade do extrato no CO<sub>2</sub> supercrítico

A solubilidade do extrato da folha da mangueira no dióxido de carbono supercrítico foi obtida através da curva cinética da extração. Inicialmente o solvente foi pressurizado no leito e aguardou-se um intervalo de 10 min para que o sistema alcançasse o equilíbrio. Desta forma, na parte inicial da curva de extração o solvente estava saturado, isto é, a concentração na saída era

igual à concentração de equilíbrio. Portanto, a solubilidade  $Y_r$  foi calculada pela equação abaixo:

$$Y_r = \frac{m_{extrato}}{m_{solvente}} \quad (4.4)$$

Em que:

$m_{extrato}$  = massa total de extrato obtido apenas na parte inicial (linear) da curva de extração;

$m_{solvente}$  = massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva de extração.

No modelo de segunda ordem, a solubilidade foi calculada pela Equação 4.5.

$$Y^* = Y_r \rho \quad (4.5)$$

Em que:

$\rho$  = massa específica do fluido supercrítico (M/L<sup>3</sup>).

#### 4.5.2.3 Rendimento global das extrações supercríticas

O rendimento global da extração supercrítica é um parâmetro que relaciona a quantidade de extrato supercrítico obtido e de matéria-prima utilizada (Equação 4.6). O extrato residual remanescente no extrator não foi contabilizado.

$$R(\%) = \frac{m_{ES}}{m_{alim}} \times 100 \quad (4.6)$$

Em que:

$m_{ES}$  = massa total de extrato seco (M);

$m_{alim}$  = massa de matéria prima alimentada no extrator (M).

## 4.6 Análise dos extratos

Todos os extratos (A, E, S, S150-A, S150-E, S250-A e S250-E) foram avaliados quanto ao teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH e pelo método ORAC. Todos esses ensaios foram realizados no Laboratório de

Análise de Alimentos na Faculdade de Engenharia Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP). As análises foram realizadas em triplicata.

A análise quantitativa de mangiferina de todos os extratos foi realizada através da técnica de cromatografia de alta eficiência (CLAE) no Laboratório GPC/HPLC da Faculdade Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (FEQ/UNICAMP).

#### 4.6.1 Método Folin-Ciocalteu

A determinação dos fenólicos totais dos extratos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu de acordo com os procedimentos de Singleton, Orthofer *et al.* (1999) com algumas modificações.

As análises foram realizadas em uma leitora de microplacas (BMG Labtech, modelo Fluostar Omega) com comprimento de onda fixado em 760 nm. Os extratos supercríticos foram pesados, diluídos e tiveram seus volumes ajustados com etanol. Os extratos líquidos foram diluídos nos respectivos solventes de extração. O fator de diluição utilizado foi de 1:200. A avaliação foi efetuada misturando o reagente de Folin-Ciocalteu, solução de carbonato de sódio 7,5% com amostra ou padrão em uma proporção de 5:4:1. Inicialmente, o reagente de Folin-Ciocalteu foi misturado com a amostra e, após 5 minutos, foi adicionado o carbonato de sódio. Essa mistura foi mantida por 2 horas ao abrigo de luz e calor e, então, foi realizada a leitura da absorbância.

Uma curva padrão com ácido gálico foi elaborada da mesma maneira como foi descrito para as amostras com as concentrações variando entre 6 a 60  $\mu\text{g/mL}$ . O valor da absorbância dos extratos foi interpolado na curva padrão de ácido gálico e o teor de fenólicos totais dos extratos foi expresso em miligramas equivalente de ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ) por grama de extrato ( $\text{g}_{\text{ext}}$ ), enquanto que o rendimento de fenólicos totais foi expresso em miligramas equivalente de ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ) por grama de matéria-prima utilizada na extração ( $\text{g}_{\text{mp}}$ ). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.6.2 Método DPPH

O ensaio de DPPH foi realizado em uma leitora de microplacas (BMG Labtech, modelo Fluostar Omega) com comprimento de onda fixado em 517 nm. Os extratos supercríticos foram pesados, diluídos e tiveram seus volumes ajustados com etanol. Os extratos líquidos foram diluídos nos respectivos solventes de extração com um fator de diluição de 40:1.

Em cada poço da microplaca foram adicionados 243  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de DPPH• 0,06 mM e 7  $\mu\text{L}$  de amostra. Essa solução foi mantida ao abrigo de luz e calor (para evitar a degradação de compostos bioativos) por um período de 30 minutos e, então, realizou-se a leitura da absorbância. Utilizou-se um “branco” com 243  $\mu\text{L}$  de solução DPPH 0,06 mM e 7  $\mu\text{L}$  de metanol.

Novamente, uma curva padrão com ácido gálico foi elaborada da mesma maneira como foi descrito para as amostras com as concentrações variando entre 8 a 68  $\mu\text{g/mL}$ . O valor da absorbância dos extratos foi interpolado na curva padrão de ácido gálico e a atividade antioxidante do extrato foi expressa em miligramas equivalente de ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ) por grama de extrato ( $\text{g}_{\text{ext}}$ ) ou por grama de matéria-prima utilizada na extração ( $\text{g}_{\text{mp}}$ ). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.6.3 Método ORAC

Os ensaios foram realizados conforme o método descrito por Davalos, Gomez-Cordoves *et al.* (2004) com algumas modificações.

As análises foram realizadas em uma leitora de microplacas (BMG Labtech, modelo Fluostar Omega) com comprimento de onda de excitação fixado em 485 nm e comprimento de onda de emissão fixado em 520 nm. Os extratos supercríticos foram pesados, diluídos e tiveram seus volumes ajustados com etanol. Os extratos líquidos foram diluídos nos respectivos solventes de extração em um fator de diluição de 200:1.

Para a reação foram preparados uma solução tampão fosfato 75 mM com pH 7,4, uma solução de fluoresceína sódica 70 mM (concentração dentro do poço de reação) e uma solução de AAPH (2,2-azobis-(2-metilpropionamida)-diidrocloreto) em uma concentração de 12 mM (concentração final dentro do poço de reação).

O sistema de reação foi montado misturando-se 120 µL de solução de fluoresceína, 60 µL de solução de AAPH e 20 µL de solução de amostra ou padrão (Trolox<sup>TM</sup>). Após, a mistura foi encubada a 37 °C por 15 minutos ao abrigo de luz. O controle positivo foi realizado com 120 µL de fluoresceína, 60 µL de AAPH e 20 µL de solução tampão e o controle negativo foi feito com 200 µL de fluoresceína.

Os resultados foram obtidos após a realização de 80 leituras com intervalos de um minuto entre cada leitura, as quais foram convertidas em unidades de área sob a curva (AUC) através da equação abaixo:

$$AUC = 1 + \sum_1^{80} f_{i+1} / f_i \quad (4.7)$$

Em que:

$f_i$  = leitura da fluorescência no tempo  $i$  min.

O AUC foi calculado para todas as amostras, diferentes concentrações do Trolox<sup>TM</sup> e para o branco. O AUC do branco foi subtraído do AUC de todas as amostras.

Foi construída uma curva padrão de Trolox<sup>TM</sup> nas mesmas condições das amostras com concentrações variando entre 9,6 e 96 µM. A partir daí substituiu-se o AUC de cada amostra na curva padrão. Dessa forma, o resultado final foi expresso em micromol equivalente de Trolox<sup>TM</sup> ( $\mu\text{mol}_{\text{ET}}$ ) por grama de extrato ( $g_{\text{ext}}$ ) ou por grama de matéria-prima utilizada na extração ( $g_{\text{mp}}$ ).

#### 4.6.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação da mangiferina foi feita através da comparação do tempo de retenção das amostras e do padrão comercial. A mangiferina foi preparada em metanol na concentração de 0,8 mg/mL. A curva analítica (área sobre a curva, AU, *versus* concentração) foi construída pela injeção em duplicata das soluções padrão em cinco concentrações diferentes (0,16 – 0,8 mg/mL), baseadas nas faixas esperada dos extratos.

Para análise foi utilizado o cromatógrafo composto pelos seguintes equipamentos: bomba Waters (modelo 515), auto-amostrador Waters (modelo 717), detector de absorvância Waters (modelo 486), acoplados ao software controle do sistema Empower 2 da Waters.

Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Waters C<sub>18</sub> (modelo Nova-Pak, 3,9 x 150 mm) mantida a temperatura de 20 °C. A fase móvel utilizada seguiu a descrita por Schieber, Ullrich e Carle (2000) com algumas modificações e consistiu de 0,5% (v/v) de ácido acético em água e acetonitrila (5:1, v/v), utilizando sistema de bombeamento isocrático, com taxa de vazão de 1 mL/min. O volume da injeção para todas as amostras foi de 4 µL. Os cromatogramas foram obtidos a 254 nm.

#### 4.6.5 Análise Estatística

Os dados obtidos do rendimento da extração supercrítica foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para identificar os métodos de extração com as melhores respostas foram realizadas comparações entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nesta etapa foi empregado o software Statistica® versão 7.0 (StatSoft, EUA).

#### 4.8 Modelagem matemática da extração supercrítica

A estimação dos parâmetros dos modelos cinéticos de extração supercrítica e dos modelos das isotermas de solubilidade do dióxido de carbono, por envolverem equações não lineares, requerem o emprego de um algoritmo de otimização, o qual ajusta os parâmetros dos modelos de forma a minimizar uma função objetivo. Além disto, geralmente a solução destes problemas apresentam vários pontos de mínimos locais, desta forma é importante o emprego de um algoritmo de otimização global.

Nesse trabalho, foi desenvolvido um programa em Fortran® utilizando o algoritmo de otimização global *Simulated Annealing* (Goffe, Ferrier e Rogers, 1994) para estimação dos parâmetros dos modelos cinéticos (Tan e Liou, 1989; Sovová, 1994; De Souza *et al.*, 2008) a partir das curvas cinéticas de extração (massa extraída *versus* tempo) e, bem como, dos modelos de solubilidade (Chrastil, 1982; Adachi e Lu, 1983; Del Valle e Aguilera, 1988) a partir das isotermas de solubilidade (solubilidade *versus* densidade do CO<sub>2</sub>).

As funções objetivos empregadas foram a soma quadrática dos erros (SQE) e o desvio médio absoluto (DAM) para modelagem das curvas cinéticas e das isotermas de solubilidade, respectivamente (Equações 4.8 e 4.9).

$$SQE(m_{\text{mod}}, m_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^n (m_{\text{mod}}(t_i) - m_{\text{exp}}(t_i))^2 \quad (4.8)$$

Em que:

$m_{\text{mod}}(t_i)$  = é a massa extraída no instante  $t_i$  calculada pelo modelo;

$m_{\text{exp}}(t_i)$  = é a massa extraída no instante  $t_i$  obtida experimentalmente.

$$DAM(Y_{\text{mod}}, Y_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^n \frac{|Y_{\text{mod}}(\rho_i) - Y_{\text{exp}}(\rho_i)|}{Y_{\text{exp}}(\rho_i)} \quad (4.9)$$

Em que:

$Y_{\text{mod}}(\rho_i)$  = é a solubilidade (calculada pelo modelo) do extrato no dióxido de carbono supercrítico com densidade  $\rho_i$ ;

$Y_{\text{exp}}(\rho_i)$  = é a solubilidade (obtida experimentalmente) do extrato no dióxido de carbono supercrítico com densidade  $\rho_i$ .

No modelo cinético de Sovová (1994) os parâmetros estimados são  $t_{\text{CER}}$ ,  $W$  e  $X_p$ , enquanto que, nos modelos de Tan e Liou (1989) e De Souza, Benazzi *et al.* (2008) apenas um parâmetro é ajustado: o coeficiente de dessorção  $k_d$  e o parâmetro da taxa de extração  $K$ , respectivamente.

Com relação aos modelos de isotermas de solubilidade, os parâmetros estimados são  $k_1$ ,  $a_1$  e  $a_2$  no modelo de Chrastil (1982),  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $a_1$  e  $a_2$  no modelo de Adachi e Lu (1983) e, finalmente,  $k_1$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$  no modelo de De Valle e Aguilera (1988).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da matéria-prima

A Tabela 5.1 apresenta as propriedades que caracterizam as folhas da mangueira (*Mangifera indica* L., variedade Carabao) após o processo de secagem natural.

Tabela 5.1 – Resultado da caracterização da matéria-prima.

Propriedade	Folhas da <i>Mangifera indica</i> L.
Umidade <sup>a</sup> (%)	10,84 ± 0,21
Teor de Voláteis + Umidade <sup>a</sup> (%)	10,86 ± 0,15
Densidade real <sup>b</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	1,4813 ± 0,0006
Diâmetro das partículas (mm)	0,5 – 0,6

<sup>a</sup>Média de 3 ensaios ± desvio padrão.

<sup>b</sup>Média de 10 ensaios ± desvio padrão.

Os resultados reportados na Tabela 5.1 mostram que, estatisticamente, não houve diferenças entre o valor da umidade determinada pelo método Karl Fischer e valor obtido pela determinação termogravimétrica em estufa (teor de voláteis + umidade). Estes resultados sugerem que, após a secagem natural, a quantidade de compostos voláteis (com exceção da água) presentes na folha da mangueira foi insignificante e, portanto, o método gravimétrico poderia ter sido utilizado para quantificação do conteúdo de umidade da amostra.

O teor de umidade obtido (aproximadamente 10,84%) foi considerado relativamente baixo caso levamos em consideração o processo de secagem (à sombra e temperatura ambiente, que na época variava entre 30 e 35 °C), visando à 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, no freezer mantido a – 18 °C.

## 5.2 Extração supercrítica

Neste tópico são apresentados os resultados das etapas experimentais da obtenção dos extratos das folhas da mangueira utilizando dióxido de carbono supercrítico. Foi realizado o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> da extração supercrítica com o objetivo de determinar a influência das condições experimentais de extração (pressão e temperatura) no rendimento global, na solubilidade, no teor de fenólicos totais e na atividade antioxidante dos extratos.

A modelagem matemática das curvas cinéticas da extração supercrítica e das isotermas de solubilidade dos extratos no solvente supercrítico também foi realizada a fim de verificar a capacidade de alguns modelos em predizer os dados experimentais.

### 5.2.1 Rendimento global

Uma das vantagens da extração supercrítica é a manipulação do poder de solvatação do CO<sub>2</sub> através da mudança da pressão e/ou temperatura. Neste trabalho, os efeitos da temperatura e pressão no rendimento global de extração foram avaliados através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicata do ponto central.

A seleção das condições de temperatura e pressão levou em considerações as limitações do equipamento de extração e, além disto, elas foram escolhidas de modo a permitir uma ampla variação na densidade do solvente e conseqüentemente no poder de solvatação do mesmo. A Tabela 5.2 apresenta as condições experimentais e os resultados dos rendimentos globais da extração supercrítica da folha da mangueira.

Os resultados apresentados foram similares aos obtidos por Fernández-Ponce *et al.* (2012), os quais reportaram um rendimento global de 1,22% do extrato da folha da mangueira na condição de operação de 400 bar e 55 °C com CO<sub>2</sub>. Este valor é semelhante ao valor ótimo encontrado neste trabalho (1,20%).

Outros trabalhos de extração supercrítica de folhas de árvores frutíferas reportam rendimentos na mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos neste trabalho. Moura, Prado *et al.* (2012) obtiveram um rendimento de 2,8-3,1% na extração supercrítica das folhas de goiaba (*Psidium guajava*), enquanto que Cavalcanti, Navarro-Díaz *et al.* (2012) reportaram um

rendimento global de 0,21-0,67% do extrato supercrítico das folhas de romã (*Punica granatum* L.).

Tabela 5.2 – Condições experimentais para a extração supercrítica

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Densidade do CO<sub>2</sub> (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	40	150	0,781	0,69
2	40	250	0,911	1,20
3	60	150	0,607	0,59
4	60	250	0,831	1,10
5	50	200	0,785	1,16
6	50	200	0,785	1,18
7	50	200	0,785	1,13

Os efeitos das variáveis e a análise da variância são apresentados na Tabela 5.3. A pressão foi à única variável que teve efeito sobre o rendimento (considerando um valor de  $p$  de 5%). No entanto, a curvatura teve uma significativa influência estatística nos resultados, indicando que todas as variáveis, mesmo aquelas em que seus efeitos principais e de interação não foram significativos (*i.e.*, temperatura e temperatura/pressão), devem ser incluídas em experimentos subsequentes e um modelo quadrático deve ser utilizado. No entanto, os ensaios 1 e 2 a 40 °C e os ensaios 3 e 4 a 60 °C sugerem que o aumento da pressão em uma mesma temperatura aumenta o rendimento de extração (Figura 5.1). Esse comportamento pode ser explicado pelo aumento da densidade do solvente, o qual aumenta o seu poder de solvatação (Carvalho Jr *et al.*, 2005; Fernández-Ponce *et al.*, 2012).

Tabela 5.3 – Efeitos e análise de variância da extração supercrítica.

<b>Variável</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Pressão</b>	<b>Temperatura/Pressão</b>	<b>Curvatura</b>
<b>Efeito</b>	-0,10	0,51	-0,004	0,521
<b>Valor de <math>p</math></b>	0,0681	0,0030	0,8897	0,0067

O efeito da temperatura é mais complexo devido aos efeitos opostos da pressão de vapor dos solutos presentes na matriz sólida e da densidade do solvente. A pressão de vapor aumenta com o acréscimo da temperatura resultando em um poder de solvatação maior, enquanto que a

densidade do solvente diminuiu e, conseqüentemente, o poder de solvatação do CO<sub>2</sub> (Fernández-Ronco *et al.*, 2010; Fernández-Ponce *et al.*, 2012). A 150 bar (ensaios 1 e 3) e a 250 bar (ensaios 2 e 4) o acréscimo de 20 °C na temperatura diminui o rendimento global de extração (Figura 5.1). Esses resultados indicam que o efeito da temperatura na densidade do solvente é mais significativo que o efeito na pressão de vapor.

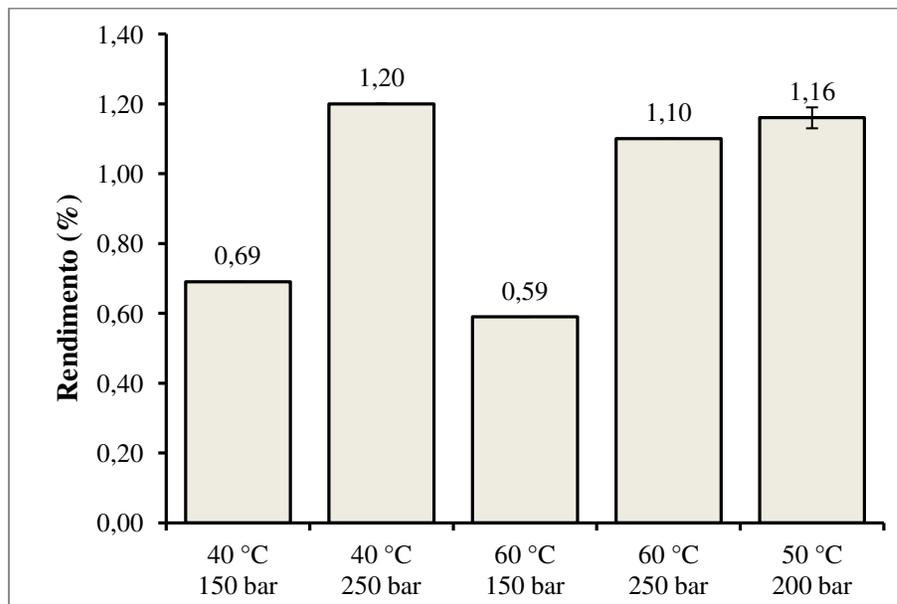


Figura 5.1 - Rendimento global (%) do extratos da folha da mangueira obtidos utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 5.1.2 Solubilidade

A solubilidade é um dado de equilíbrio que representa a máxima concentração de soluto na fase solvente e foi determinada pelo método dinâmico através do coeficiente angular da parte linear da curva de extração (Figura 5.2), onde a quantidade de extrato obtido é representada em função da quantidade de CO<sub>2</sub> consumida durante o processo de extração supercrítica. A Tabela 5.4 apresenta as solubilidades obtidas com a correspondente densidade do dióxido de carbono supercrítico.

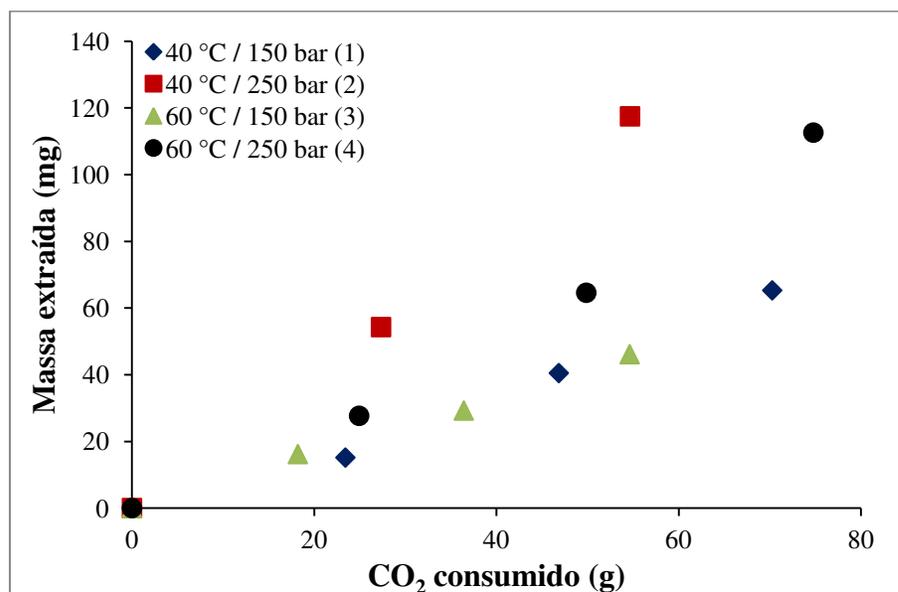


Figura 5.2 – Curvas de extração para a determinação da solubilidade experimental.

Tabela 5.4 – Solubilidade experimental do extrato da folha da mangueira em CO<sub>2</sub> supercrítico.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade do CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilidade (mg/cm <sup>3</sup> )
40	150	0,781	0,70
40	250	0,911	1,93
60	150	0,607	0,51
60	250	0,831	1,17
50 <sup>a</sup>	200	0,785	1,12 ± 0,02

<sup>a</sup>Média da triplicata no ponto central ± desvio padrão.

Nas duas temperaturas estudadas (40 e 60 °C), o efeito da pressão na solubilidade comportou-se como o esperado. A capacidade do solvente aumenta com a pressão devido ao acréscimo da densidade, o que significa que as distâncias intermoleculares diminuem e, conseqüentemente, a interação das moléculas de soluto e solvente aumenta (Pereira *et al.*, 2004). Em contrapartida, assim como mencionado no item anterior (5.1.1), a influência da temperatura depende de dois fatores: o acréscimo da temperatura diminui a densidade do CO<sub>2</sub> e aumenta a pressão de vapor dos solutos. Esses efeitos antagônicos ocasionam uma inversão na curva de solubilidade, fenômeno conhecido como *cross-over*. Neste ponto, o efeito da temperatura na

solubilidade muda. Acima do ponto de *cross-over*, a solubilidade diminui com o decréscimo da temperatura, contudo, abaixo desse ponto, a solubilidade aumenta com a diminuição da temperatura (Johnston e Eckert, 1981; Foster *et al.*, 1991).

Neste trabalho, analisando a Tabela 5.4, verifica-se que a solubilidade aumenta com o decréscimo da temperatura em ambas as pressões trabalhadas (150 e 250 bar). Portanto, pode-se afirmar que as isotermas de solubilidade estão abaixo do ponto de *cross-over*.

Em geral, as pressões em que ocorre o fenômeno de *cross-over* estão entre 250 e 350 bar, mas podem variar significativamente dependendo da composição dos extratos. Ozkal, Yener *et al.* (2006) reportaram uma pressão de *cross-over* de aproximadamente 250 bar para a solubilidade do extrato da semente de damasco em CO<sub>2</sub> supercrítico. Jokic, Svilovic *et al.* (2011) determinaram que a pressão de *cross-over* do óleo de soja era de 250 bar. E, por último, Goodrum e Kilgo (1987) encontraram uma pressão de *cross-over* de 350 bar para o óleo de amendoim em CO<sub>2</sub> supercrítico.

#### 5.1.2.1 Modelagem das isotermas de solubilidade

Os extratos supercríticos obtidos são misturas multicomponentes e, conseqüentemente, a modelagem do equilíbrio termodinâmico desses sistemas é uma tarefa difícil. Além disso, em muitos casos, para os componentes majoritários, há a falta de informações em relação aos parâmetros necessários (*e.g.*, constantes críticas e energia intermolecular) para utilização das equações de estado (De Lucas *et al.*, 2007). Por essas razões, alguns modelos semiempíricos são utilizados para correlacionar os resultados experimentais.

O modelo semiempírico mais utilizado na literatura é o modelo proposto por Chrastil (1982). No entanto, em algumas ocasiões, a equação de Chrastil (1982) é válida apenas para valores de solubilidade superiores a 100-200 mg/cm<sup>3</sup> (Del Valle e Aguilera, 1988) e, neste caso, a solubilidade do extrato da folha da mangueira em CO<sub>2</sub> supercrítico é baixa, entre 0,70 e 1,93 g/cm<sup>3</sup> (Tabela 5.4). Dessa forma, alguns autores propuseram algumas modificações na equação de Chrastil (1982). As modificações mais conhecidas foram propostas por Adachi e Lu (1983) e Del Valle e Aguilera (1988).

A Tabela 5.5 apresenta os valores dos parâmetros ajustados na modelagem da solubilidade nas isotermas de 40 e 60 °C utilizando os modelos semiempíricos de Chrastil (1982), Adachi e

Lu (1983) e Del Valle e Aguilera (1988). Não foi utilizado o valor da solubilidade no ponto central. Todas as constantes foram calculadas minimizando o desvio absoluto médio (DAM) entre a solubilidade experimental e a calculada pelos modelos.

Tabela 5.5 – Parâmetros ajustados para os modelos de solubilidade.

<b>Modelo Semiempírico</b>	<b>k<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>2</sub></b>	<b>k<sub>3</sub></b>	<b>a<sub>1</sub></b>	<b>a<sub>2</sub></b>	<b>a<sub>3</sub></b>	<b>DAM (%)</b>
Chrastil (1982)	2,66	-	-	6,24	-1860,53	-	11,4
Adachi e Lu (1983)	-4,33	13,70	2,78	4,80	-990,97	-	6,06×10 <sup>-8</sup>
De Valle e Aguilera (1988)	2,66	-	-	6,23	-1857,60	-471,84	11,4

As equações de Chrastil (1982) e de De Valle e Aguilera (1988) modelaram bem os dados experimentais comparando o valor do DAM (%) com outros ajustes de solubilidade na literatura (Ozkal, Yener e Bayindirli, 2006; Bian, Du e Tang, 2011; Jokic *et al.*, 2011). No entanto, o melhor ajuste para os dados experimentais foi obtido pela equação de Adachi e Lu (1983), visto que este modelo utiliza cinco parâmetros ajustáveis enquanto que na equação de De Valle e Aguilera (1988) são necessários quatro parâmetros e na equação de Chrastil (1982) apenas três. O valor de 6,06×10<sup>-8</sup>% do desvio médio absoluto (DAM) obtido na modelagem das isothermas de solubilidade utilizando a equação de Adachi e Lu (1983) é significativamente inferior aos valores encontrados na literatura. Ozkal, Yener *et al.* (2006), por exemplo, obtiveram um DAM de 6,48% na modelagem das isothermas de solubilidade do óleo da semente de damasco em CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando o modelo de Adachi e Lu (1983), enquanto que Jokic, Svilovic *et al.* (2011) reportaram valores de DAM entre 6 e 26% para as isothermas de solubilidade do óleo de soja em CO<sub>2</sub> supercrítico.

Alguns dos fatores que podem ter contribuído para o baixo valor do DAM obtido na modelagem matemática utilizando a equação de Adachi e Lu (1983) foram: o número baixo de dados experimentais (apenas duas isothermas foram utilizadas) e a utilização de um algoritmo de otimização global (*Simulated Annealing*) no ajuste dos cinco parâmetros do modelo. A Figura 5.3 mostra as isothermas de solubilidade obtidas pelo modelo de Adachi e Lu (1983) e seus respectivos dados experimentais.

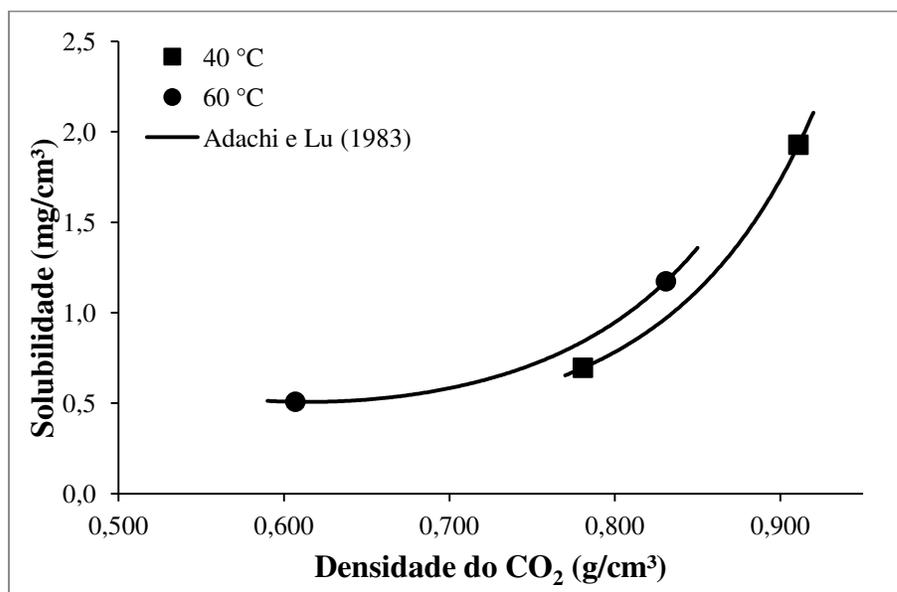


Figura 5.3 – Modelagem das isotermas de solubilidade do extrato da folha da mangueira em dióxido de carbono supercrítico.

Pela análise da Figura 5.3, verifica-se que as isotermas de solubilidade se comportam de uma maneira não linear em relação à densidade, a qual é função da temperatura e pressão do fluido. Portanto, sabendo que o rendimento global de extração é função da solubilidade do CO<sub>2</sub> supercrítico, a não validação de um modelo linear para o ajuste do rendimento em função de temperatura e pressão do fluido (item 5.1.1) foi esperado.

### 5.1.3 Curvas cinéticas da extração supercrítica

Típicas curvas de cinética de extração são apresentadas nas Figuras 5.4 e 5.5 em diferentes condições experimentais. De acordo com a Figura 5.5, que apresenta a curva cinética dos três ensaios no ponto central, o experimento mostrou-se reproduzível.

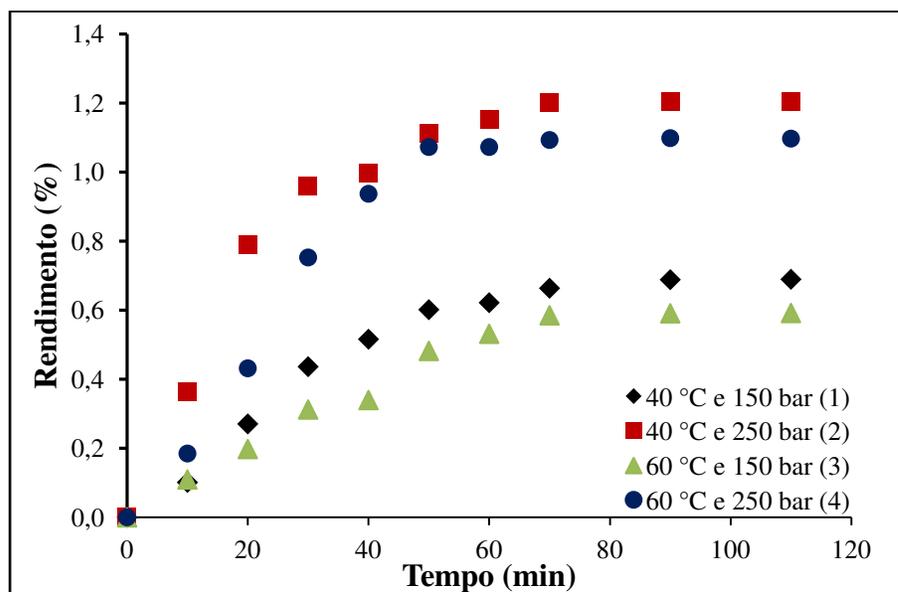


Figura 5.4 – Curvas de extração supercrítica para os ensaios 1, 2, 3 e 4.

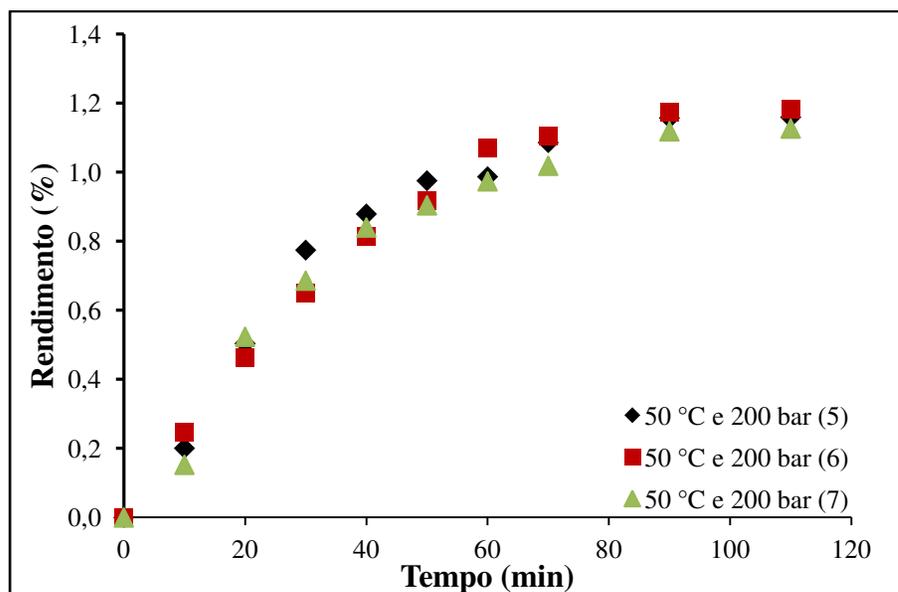


Figura 5.5 – Curvas de extração supercrítica para o ponto central (ensaios 5, 6 e 7).

O processo de extração supercrítica não é linear em relação ao tempo de extração e, em geral, possui três períodos: (1) período de taxa de extração constante (CER – *Constant Extraction Rate*), onde a transferência de massa é governada pelo mecanismo de convecção na interface entre o sólido e fluido; (2) período de queda na taxa de extração (FER – *Falling Extraction Rate*), onde a convecção na superfície e a difusão no interior do sólido são importantes; e (3) período

controlado pela difusão (DCR – *Diffusion Controlled Rate*), caracterizado pela transferência de massa no sólido (Christianson *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1986; Ferreira, Meireles e Cabral, 1993).

Utilizando como exemplo a curva cinética do segundo ensaio (250 °C e 40 bar), pode-se identificar visualmente os três períodos da extração supercrítica (Figura 5.6).

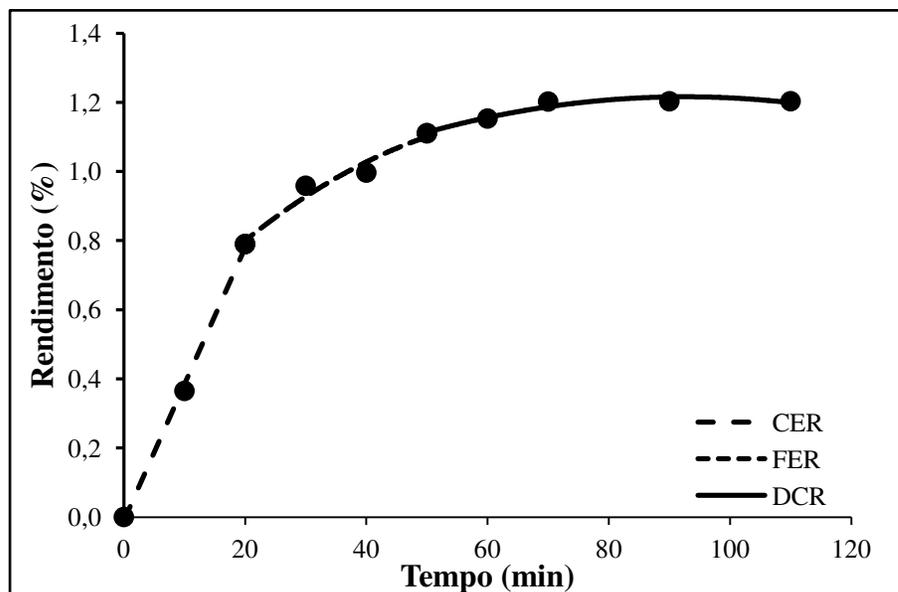


Figura 5.6 - Curvas de extração supercrítica para o segundo ensaio (40 °C e 250 bar) com os períodos CER, FER e DCR.

Durante o primeiro período (CER), as superfícies externas das folhas estão cobertas por ceras cuticulares (Figura 5.7) e por uma pequena camada de óleo essencial disponível, formada devido à ruptura das células durante o processo de moagem. A análise da imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das folhas da mangueira (Figura 5.8) mostra as células intactas e as células rompidas.

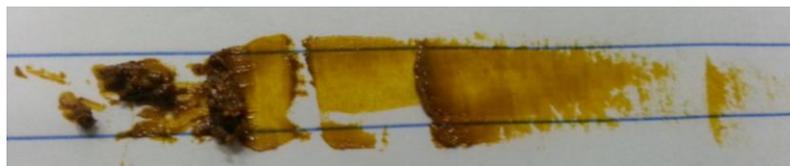


Figura 5.7 – Ceras cuticulares da folha da mangueira obtida na etapa inicial da extração supercrítica.

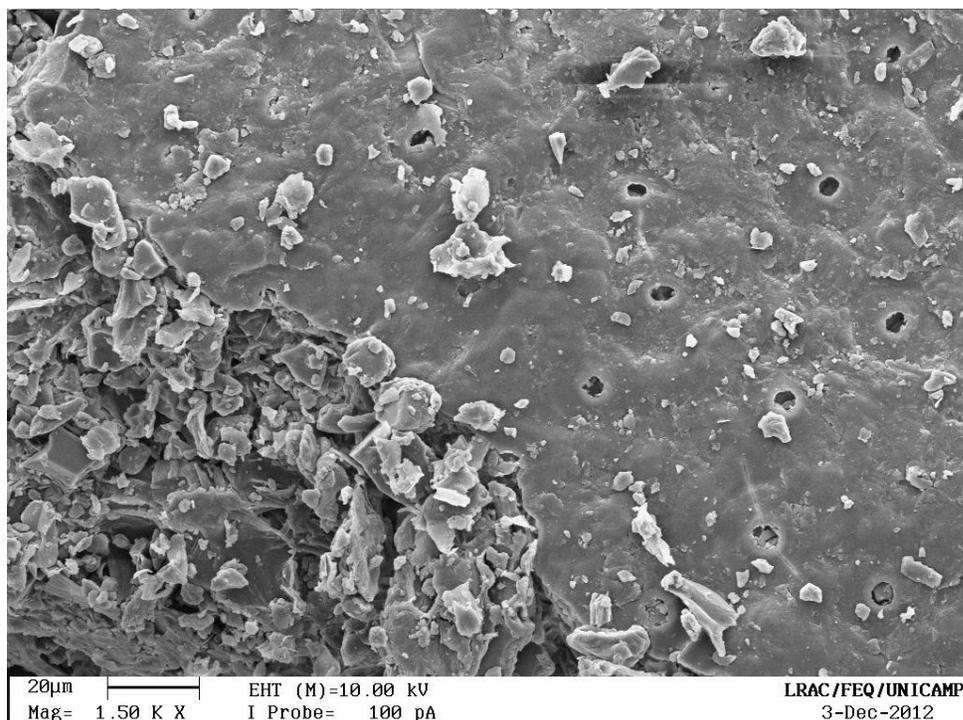


Figura 5.8 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.).

A presença de ceras cuticulares na superfície das folhas resulta no período de taxa constante (CER), uma vez que a extração desses compostos não é limitada pela difusão no interior do sólido (Reverchon, Donsi e Osseo, 1993).

No entanto, após o período de taxa constante (CER), inicia-se um período de transição (FER) na qual a taxa de extração muda com o tempo. Neste período, em uma parte do leito, o solvente dissolve o restante de extrato que ainda permanece na superfície do sólido enquanto que, na outra parte, o solvente extrai os solutos contidos no interior das células intactas e, neste caso, a extração é limitada pela resistência intraparticular devido à difusão no interior das células. Por fim, no período DCR, todo o extrato obtido é retirado do interior das folhas e, conseqüentemente, a taxa de transferência é baixa comparada com a taxa inicial. Nesta fase, o solvente difunde até o interior das partículas sólidas e uma mistura de solvente-solutos retorna por difusão até a superfície do sólido.

### 5.1.3.1 Modelagem das curvas cinéticas da extração supercrítica

A habilidade para prever as curvas cinéticas de extração é de fundamental importância na otimização e no projeto de extratores em escala industrial. A modelagem matemática é a principal ferramenta de predição, que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo. Existem diversos modelos na literatura onde, dependendo do modelo selecionado, diferentes informações experimentais são necessárias. Neste trabalho, os modelos de Tan e Liou (1989) e De Souza, Benazzi *et al.* (2008) foram escolhidos devido à simplicidade, enquanto que o modelo de Sovová (1994) foi selecionado pelo significado físico dos seus parâmetros.

Os parâmetros utilizados para a modelagem matemática da extração supercrítica das folhas da mangueira estão na Tabela 5.6. A solubilidade do extrato no solvente também é um parâmetro de entrada dos modelos e foi apresentada na Tabela 5.4.

Tabela 5.6 – Características do leito de extração supercrítica e da matéria-prima.

Ensaio	$T$ (°C)	$P$ (bar)	$\rho_{leito}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_s$ (g/cm <sup>3</sup> )	$X_0$ (mg/g)	$Y_r$ (mg/g)	$Q_{CO_2}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$m_{alim}$ (g)	$m_i$ (g)
1	40	150	1,481	0,748	6,94	0,891	2,244	14,965	14,862
2	40	250	1,481	0,886	12,17	2,041	2,658	14,873	14,694
3	60	150	1,481	0,562	5,95	0,867	1,686	14,775	14,687
4	60	250	1,481	0,775	11,09	1,505	2,325	14,961	14,796
5	50	200	1,481	0,764	11,72	1,527	2,292	14,749	14,578
6	50	200	1,481	0,764	11,96	1,585	2,292	14,783	14,608
7	50	200	1,481	0,764	11,39	1,483	2,292	14,761	14,595

Os parâmetros ajustados dos modelos testados e seus respectivos indicadores estatísticos (soma quadrática dos erros - SQE, o desvio médio absoluto - DAM e o coeficiente de determinação - R<sup>2</sup>) são apresentados na Tabela 5.7. Como pode ser observado nesta tabela, os modelos de Sovová (1994) e De Souza, Benazzi *et al.* (2008) são os que melhor representam os dados experimentais. Para ambos os modelos, bons R<sup>2</sup> foram obtidos, variando entre 0,984 e 0,998, enquanto que os valores do DAM ficaram entre 1,92 e 9,00%.

Tabela 5.7 – Parâmetros ajustados na modelagem da extração supercrítica das folhas da mangueira com os modelos de Sovová (1994), De Souza *et al.* (2008) e Tan e Liou (1989).

Modelo	Ensaio						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Sovová (1994)</b>							
$X_p$ (g/g)	0,0017	0,0055	0,0059	0,0102	0,0061	0,0010	0,0034
$t_{CER}$ (min)	0,120	0,022	19,510	2,224	2,162	0,006	0,189
$t_{FER}$ (min)	31,926	20,390	76,673	47,479	41,132	21,206	29,923
$k_{ya}$ (min <sup>-1</sup> )	5,841	35,889	0,165	1,093	0,700	44,847	4,343
$k_{xa}$ (min <sup>-1</sup> )	0,014	0,012	$2,5 \times 10^{-6}$	0,011	0,009	0,013	0,011
SQE ( $\times 10^{-4}$ )	0,50	1,59	0,59	1,43	1,48	0,50	4,05
DAM (%)	5,09	1,92	3,75	4,46	4,01	2,13	7,82
R <sup>2</sup>	0,996	0,997	0,993	0,996	0,995	0,998	0,990
<b>De Souza <i>et al.</i> (2008)</b>							
$k$ (cm <sup>2</sup> g/min)	137,71	40,60	180,59	268,88	69,26	67,75	66,92
SQE	0,81	2,83	0,80	1,54	3,02	0,63	5,01
DAM (%)	5,45	3,12	3,64	4,59	4,45	2,45	9,00
R <sup>2</sup>	0,994	0,992	0,991	0,996	0,993	0,998	0,984
<b>Tan e Liou (1989)</b>							
$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	0,0226	0,0262	0,0208	0,0248	0,0213	0,0208	0,0210
SQE	3,13	27,03	2,39	17,9	5,81	2,91	6,9
DAM (%)	11,13	8,43	8,60	13,46	6,58	3,12	11,16
R <sup>2</sup>	0,976	0,920	0,974	0,949	0,983	0,991	0,977

O modelo de dessorção proposto por Tan e Liou (1989) teve o pior desempenho na modelagem das curvas cinéticas, o que sugere que a capacidade residual de extração do extrato pelo solvente (não considerada neste modelo) tem influência significativa no processo de extração supercrítica da folha da mangueira. Outros autores também utilizaram o modelo de Tan e Liou (1989) e não reportaram bons resultados (Silva *et al.*, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011; Domingues *et al.*, 2012).

As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam a comparação entre os dados experimentais e o ajuste dos modelos testados. O modelo de Sovová (1994) comportou-se como o esperado uma vez que possui três parâmetros ajustáveis. Na literatura, este modelo vem sendo aplicado com sucesso para modelar as curvas de extração de diferentes produtos naturais (Mouahid *et al.*; Bernardo-Gil *et al.*, 2009; Jia, Li e Xiao, 2009; Martín, González-Coloma, *et al.*, 2011; Martín, Mainar, *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012), visto que estas cinéticas possuem um comportamento semelhante.

Com relação aos parâmetros ajustados do modelo de Sovová (1994), o período CER é rápido ( $t_{CER}$  entre 0,006 e 2,224 min, com exceção do ensaio 3) pois a quantidade de extrato na superfície das células ( $X_p$ ) é pequena (entre 0,0010 e 0,0102) e a taxa de extração referente a este período ( $k_{ya}$ ) é alta (entre 0,700 e 35,889  $\text{min}^{-1}$ ).

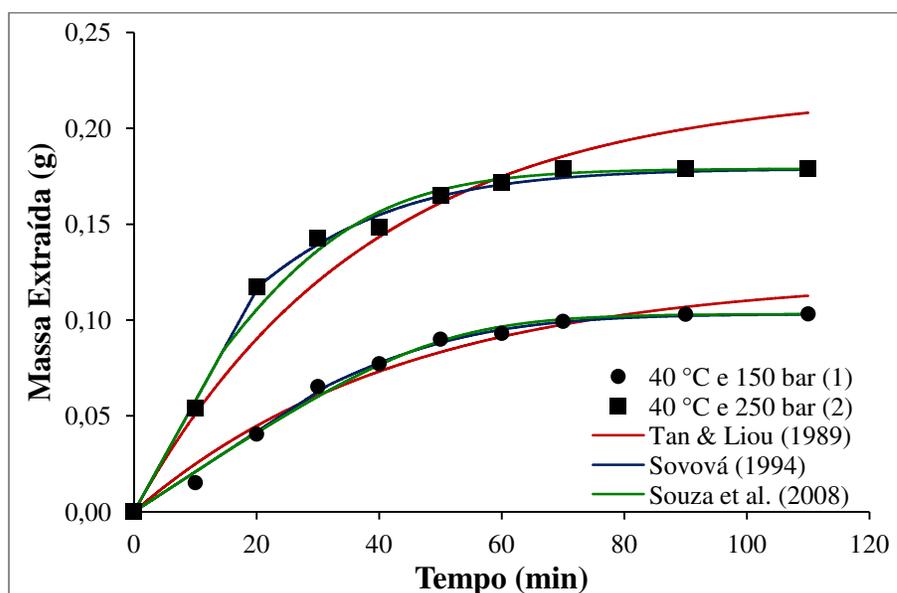


Figura 5.9 - Curvas ajustadas aos ensaios 1 e 2.

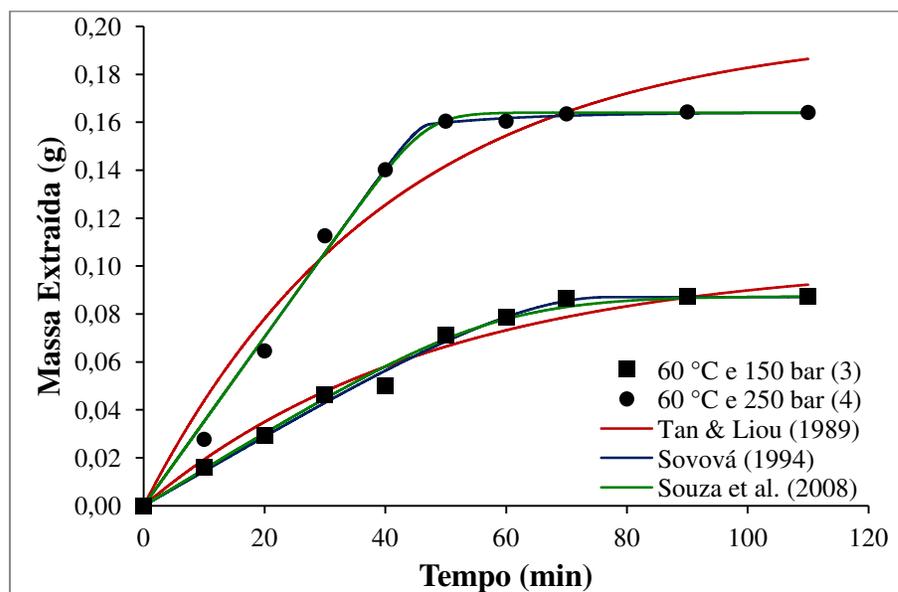


Figura 5.10 – Curva ajustadas aos ensaios 3 e 4.

Após o período CER, inicia-se o período FER (o qual prolonga-se até 20,39-76,67 min) e a curva cinética mantém-se linear (Figuras 5.9 e 5.10). Isso ocorre devido à solubilidade do extrato da folha da mangueira em dióxido de carbono ser baixa e os solutos remanescentes no leito serem suficientes para saturar o solvente (Ferreira, Meireles e Cabral, 1993). Além disso, o tempo de contato entre soluto e solvente no interior do leito pode ter sido longo o suficiente (devido à baixa velocidade superficial e/ou elevada altura do leito) para que o equilíbrio entre as duas fases fosse atingido. Este comportamento linear do período FER também foi observado por García-Risco, Hernández *et al.* (2011).

Ainda segundo o modelo de Sovová (1994), o período DCR inicia-se após  $t_{FER}$  (entre 20,39 e 76,67 min) e o parâmetro relacionado a transferência de massa deste período ( $k_{xa}$ ) é baixo (entre 0,009 e 0,014  $\text{min}^{-1}$ ), influenciado principalmente pela difusão no interior do sólido, a qual depende das propriedades da folha da mangueira, da permeabilidade da parede celular, e da eficiência do solvente em acessar a partes internas da matéria-prima.

Em comparação com outros trabalhos (Ozkal, Yener e Bayindirli, 2006; García-Risco *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012), os valores dos parâmetros de transferência de massa ( $k_{xa}$  e  $k_{ya}$ ) do modelo de Sovová (1994) obtidos neste trabalho são uma ou duas ordens de grandeza mais alta e, por isso, o fim da cinética de extração supercrítica das folhas da mangueira foi rápida (com duração de no máximo 110 min) em todas as condições estudadas. Estes resultados revelam que a

penetração do solvente na matriz vegetal é alta, provavelmente devido à estrutura física das folhas e da alta porosidade do leito.

No entanto, apesar de todas as vantagens do modelo do Sovová (1994) em relação à identificação das etapas do processo de extração e ao significado físico dos parâmetros cinéticos, este modelo torna-se inconsistente quando se analisa o ponto central (ensaios 5, 6 e 7). Neste ponto, os parâmetros ajustados são significativamente diferentes embora os dados cinéticos mostrem a reprodutibilidade do experimento (ver Figura 5.5, item 5.1.3). Além disso, o parâmetro  $X_p$ , que representa a quantidade de extrato na superfície da matriz vegetal (extrato de fácil acesso), é considerado um parâmetro fixo em diferentes condições experimentais devido ao seu significado físico (Povh, Marques e Meireles, 2001; Ozkal, Yener e Bayindirli, 2006) e, neste trabalho, o valor de  $X_p$  obtido foi significativamente diferente para cada ensaio (mesmo no ponto central).

Por esses motivos, o modelo de De Souza, Benazzi *et al.* (2008) com um parâmetro ajustável mostrou-se mais apropriado para a modelagem da extração supercrítica do que o modelo de Sovová (1994), pois no ponto central o valor de  $k$  (nos 3 ensaios) foi semelhante, apresentando um desvio médio de apenas  $0,85 \text{ cm}^2 \text{ g min}^{-1}$ .

Portanto, para o aumento de escala do processo de extração supercrítica das folhas da mangueira é desejável utilizar o modelo de De Souza, Benazzi *et al.* (2008), uma vez que este modelo representou bem os dados experimentais e o ajuste de seu parâmetro cinético mostrou-se mais confiável. Estes dois aspectos são de fundamental importância na estimativa dos custos de manufatura, pois conhecendo o melhor modelo que prediz a cinética de extração é possível calcular o número de ciclos que uma unidade de extração precisa executar por período (Rosa e Meireles, 2005).

#### 5.1.4 Análises dos extratos supercríticos

Em complementação ao estudo da modelagem do processo de extração supercrítica, os extratos também foram caracterizados quantitativamente com relação à presença de fenólicos totais e a atividade antioxidante utilizando os métodos DPPH e ORAC.

### 5.1.4.1 Fenólicos Totais

O teor e o rendimento de fenólicos totais são expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ) por grama de extrato seco ( $\text{g}_{\text{ext}}$ ) e por grama de matéria-prima ( $\text{g}_{\text{mp}}$ ) utilizada, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 5.8. A igualdade estatística dos resultados no ponto central (ensaios 5, 6 e 7) mostra que a procedimento experimental de extração supercrítica é reproduzível.

Tabela 5.8 – Teor e rendimento de fenólicos totais dos extratos supercríticos da folha da mangueira.

Extrato	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rend. Global (%)	Teor de Fenólicos Totais ( $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$ )*	Rendimento de Fenólicos Totais ( $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{mp}}$ )*
1	40	150	0,69	$80,5 \pm 2,0^a$	$0,555 \pm 0,014^a$
2	40	250	1,20	$29,9 \pm 5,1^b$	$0,360 \pm 0,061^{b,c}$
3	60	150	0,59	$10,2 \pm 2,0^c$	$0,059 \pm 0,012^e$
4	60	250	1,10	$42,1 \pm 5,0^b$	$0,462 \pm 0,056^{a,b}$
5	50	200	1,16	$20,8 \pm 4,1^{b,c}$	$0,241 \pm 0,048^{c,d}$
6	50	200	1,18	$20,0 \pm 4,1^{b,c}$	$0,237 \pm 0,051^d$
7	50	200	1,13	$20,5 \pm 2,6^{b,c}$	$0,233 \pm 0,029^d$

\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Na literatura não foram encontrados resultados de fenólicos totais dos extratos supercríticos da folha da mangueira. No entanto, em geral, o teor de fenólicos totais obtidos neste trabalho (entre 10,2 e 80,5  $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$ ) foram superiores em comparação com outras matérias-primas. Em contrapartida, os valores obtidos para o rendimento de fenólicos totais foram baixos (entre 0,059 e 0,555  $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{mp}}$ ), principalmente devido ao baixo rendimento global dos extratos das folhas da mangueira (entre 0,59 e 1,20%). Santos, Villaverde *et al.* (2012) estudaram a extração de compostos fenólicos da casca de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), obtendo um teor de fenólicos totais de 10,92  $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$  utilizando  $\text{CO}_2$  supercrítico a 70 °C e 300 bar. Gelmez, Kincal *et al.* (2009) reportaram um teor de fenólicos totais de 6,63  $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$  no extrato supercrítico de germe de trigo torrado obtido a 240 bar e 56 °C. Martinez-Correa, Cabral *et al.* (2012) estudaram os

extratos das folhas de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) obtidos a 400 bar e 60 °C e reportaram um teor e um rendimento de fenólicos totais de 69 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>ext</sub> e 5,5 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>, respectivamente. E, por último, Martinez-Correa, Magalhaes *et al.* (2011) observaram um teor e um rendimento de compostos fenólicos no extrato das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) de 51 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>ext</sub> e 1,7 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub> (obtidos a 400 bar e 60 °C), respectivamente.

Analisando a Tabela 5.8, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%, não houve diferença entre o teor e o rendimento de fenólicos totais dos extratos supercrítico obtidos a 250 bar em ambas as temperatura estudadas (40 e 60 °C), porém a 150 bar o aumento da temperatura teve um efeito negativo na extração dos compostos fenólicos, uma vez que o extrato obtido a 150 bar e 40 °C exibiu o maior rendimento e concentração destes constituintes (0,555 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub> e 80,5 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>ext</sub>) apesar do seu baixo rendimento global.

Com relação ao efeito da pressão, há uma tendência geral na literatura mostrando que o aumento da pressão resulta em um melhor rendimento na extração dos compostos polares e com alto peso molecular (incluindo os compostos fenólicos, os quais são os componentes majoritários das plantas) (Diaz-Reinoso *et al.*, 2006). No entanto, neste trabalho, verifica-se que a 40 °C a pressão teve um efeito negativo no teor e no rendimento de fenólicos totais dos extratos, ao contrário do que observado a 60 °C. Este comportamento também foi reportado para outras matérias-primas. Cavalcanti, Navarro-Díaz *et al.* (2012) estudaram as extrações supercríticas da folha de romã (*Punica granatum* L.) nas temperaturas de 40 e 50 °C e concluíram que, entre as pressões utilizadas (100, 150, 200 e 300 bar), a concentração de compostos fenólicos nos extratos atingiu o valor máximo na pressão de operação de 150 bar para ambas as temperaturas. Esses autores ainda observaram que o comportamento do teor de fenólicos totais em função da pressão não foi usual e sofre variações ascendentes e descendentes no intervalo de pressão estudado.

Mesomo, Scheer *et al.* (2012) reportaram que na extração supercrítica do gengibre (*Zingiber officinale* R.) a 20 °C o aumento da pressão de operação de 80 bar para 250 bar diminuiu o teor de fenólicos totais no extrato. Laroze, Diaz-Reinoso *et al.* (2010) também observaram na extração supercrítica de arando, mirtilo e framboesa que o rendimento de fenóis totais em função da pressão apresenta um comportamento aleatório com diversos picos máximos e mínimos no intervalo de pressão entre 80 e 300 bar. Finalmente, Fernández-Ponce, Casas *et al.* (2012) mostram que a pressão apresenta um efeito negativo no teor de alguns compostos fenólicos na extração supercritica das folhas da mangueira utilizando 20% de co-solvente (metanol ou etanol).

Uma explicação científica para esse tipo comportamento não é clara e ainda não foi descrita na literatura. Os casos mencionados acima, assim como os resultados apresentados neste trabalho, mostram que em algumas ocasiões a pressão pode ter um efeito negativo e/ou positivo no teor e no rendimento dos fenólicos totais do extrato supercrítico. Isso mostra que o dióxido de carbono supercrítico é altamente seletivo dependendo das condições experimentais de pressão e temperatura. Portanto, como os extratos supercríticos são constituídos de uma mistura de várias espécies, pode-se concluir que as condições experimentais de extração podem influenciar de forma diferente cada componente solúvel presente na matriz vegetal.

#### 5.1.4.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante de um extrato natural é fortemente influenciada pelo método de análise utilizado. Neste trabalho, a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH e ORAC, os quais são baseados em dois mecanismos de ação: Transferência de um Elétron (SET - *Single Electron Transfer*) e Transferência de Átomo de Hidrogênio (HAT - *Hydrogen Atom Transfer*), respectivamente. O ensaio do DPPH é amplamente utilizado para a determinação da capacidade antioxidante em diferentes extratos naturais. No entanto, o ORAC é o método mais indicado para avaliar a capacidade protetora de amostras de alimentos contra os radicais peróxila ROO• (Prior, Wu e Schaich, 2005).

A Tabela 5.9 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos supercríticos das folhas da mangueira determinada pelos métodos DPPH e ORAC. No método DPPH resultados são expressos em miligrama equivalente em ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ) por grama de extrato seco obtido ( $\text{g}_{\text{ext}}$ ), enquanto que no método ORAC os resultados são apresentados em micromol equivalentes de Trolox® ( $\mu\text{mol}_{\text{ET}}$ ) por grama de extrato seco ( $\text{g}_{\text{ext}}$ ). Novamente, a igualdade dos resultados no ponto central (ensaios 5, 6 e 7) mostra que o experimento é reprodutível.

Tabela 5.9 – Atividade antioxidante dos extratos supercríticos.

Extrato	Temp. (°C)	Pressão (bar)	DPPH (mg <sub>EAG</sub> /g <sub>ext</sub> )*	ORAC (μmol <sub>ET</sub> /g <sub>ext</sub> )*
1	40	150	37,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	217,8 ± 8,6 <sup>a</sup>
2	40	250	11,8 ± 1,1 <sup>d</sup>	144,8 ± 7,2 <sup>c</sup>
3	60	150	15,9 ± 1,6 <sup>c</sup>	104,8 ± 6,8 <sup>d</sup>
4	60	250	26,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	191,6 ± 5,4 <sup>b</sup>
5	50	200	11,7 ± 0,9 <sup>d</sup>	111,3 ± 2,4 <sup>d</sup>
6	50	200	12,7 ± 1,3 <sup>d</sup>	102,9 ± 7,8 <sup>d</sup>
7	50	200	11,4 ± 0,7 <sup>d</sup>	110,1 ± 4,3 <sup>d</sup>

\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados da Tabela 5.9 revelam que os efeitos da pressão e temperatura de extração afetam os resultados da atividade antioxidante obtidos por ambos os métodos (DPPH e ORAC). A pressão possui efeitos contrários que dependem da temperatura de operação: a 40 °C (ensaios 1 e 2) o efeito da pressão é negativo, enquanto que a 60 °C (ensaios 3 e 4) o acréscimo da pressão resulta em um aumento da atividade antioxidante dos extratos. Com relação à temperatura, o aumento de temperatura na pressão de 150 bar proporciona uma diminuição na atividade antioxidante do extrato, enquanto que a 250 bar o efeito da temperatura é oposto. Estatisticamente, a relação entre os métodos DPPH e ORAC foi bastante significativa ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,001$ ) e isto ocorre, possivelmente, porque as condições operacionais da extração influenciam, de maneira análoga, os compostos antioxidantes que agem pelos mecanismos HAT e SET. A Figura 5.11 mostra o comportamento semelhante de ambos os métodos.

É importante salientar que há poucos trabalhos na literatura que analisam a atividade antioxidante de extratos supercríticos e, além disso, os métodos existentes são bastante heterogêneos, o que dificulta uma comparação direta. Os resultados obtidos pelo método DPPH não foram passíveis de comparação com a literatura, pois a resposta em miligramas equivalentes de ácido gálico não é usual e os valores resultantes dessa análise foram utilizados apenas para verificar a influência das condições operacionais na atividade antioxidante. No entanto, com relação ao método ORAC, a atividade antioxidante dos extratos da folha da mangueira (102,9 – 217,8 μmol<sub>ET</sub>/g<sub>ext</sub>) foi comparável a outros trabalhos de extração supercrítica. Costa, Gonçalves *et al.* (2012), por exemplo, obtiveram valores entre 84,45 e 116,36 μmol<sub>ET</sub>/g<sub>ext</sub> de atividade

antioxidante para extrato supercrítico da erva-ursa (*Thymus lotocephalus*), enquanto que Serra, Seabra *et al.* (2010) reportaram uma atividade antioxidante de  $45 \mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{ext}}$  para o extratos supercrítico da cereja (*Prunus avium*).

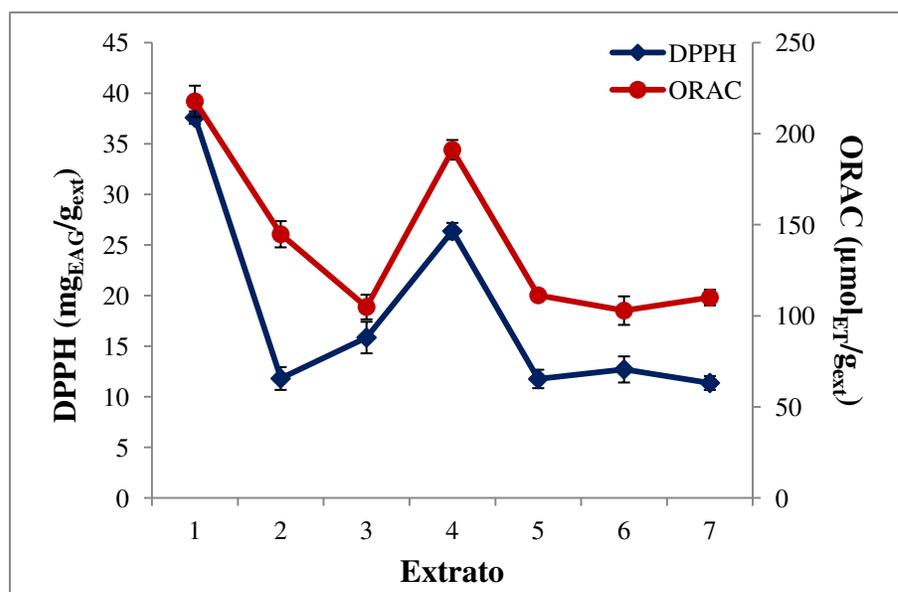


Figura 5.11 – Atividade antioxidante dos extratos supercríticos determinada pelos métodos DPPH e ORAC.

Devido à presença de diversos tipos de compostos que podem contribuir com a atividade antioxidante nos extratos, não é claro qual componente é responsável pela mudança observada nos resultados dos métodos DPPH e ORAC. Dessa forma, a fim de verificar a influência dos componentes fitoquímicos na atividade antioxidante dos extratos supercríticos, foi determinada uma correlação entre a atividade antioxidante e as principais substâncias antioxidantes presentes: os compostos fenólicos. A Tabela 5.10 mostra que a atividade antioxidante dos extratos supercríticos das folhas da mangueira é fortemente influenciada pelo teor de fenólicos totais, apresentando uma correlação linear positiva. Estes resultados estão de acordo com outros reportados na literatura: os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos. Thaipong, Boonprakob *et al.* (2006), por exemplo, observaram uma alta correlação entre os fenóis totais das goiabas e a atividade antioxidante obtida pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC ( $0,61 < r < 0,97$ ,  $p < 0,05$ ).

Tabela 5. 10 – Correlação linear entre os métodos de atividade antioxidante utilizados e o teor de fenólicos totais.

<b>Método</b>	<b>Teor de fenólicos totais</b>	
	Coeficiente de correlação $r$	Valor $p$
DPPH	0,90	< 0,001
ORAC	0,92	< 0,001

No entanto, o grande número de substâncias não identificadas nesses extratos sugere que outros compostos podem contribuir para a atividade antioxidante ou, até mesmo, inibir a ação dos antioxidantes. Os resultados obtidos neste trabalho revelam a considerável influência das condições operacionais na atividade antioxidante dos extratos. O extrato obtido a 40 °C e 150 bar (extrato 1) apresentou o maior teor de fenólicos totais e, conseqüentemente, melhor atividade antioxidante. Estas condições operacionais evitam a degradação térmica de alguns componentes bioativos e a extração de substâncias indesejáveis (Reverchon e De Marco, 2006).

### 5.3 Extração convencional

Neste tópico são apresentados os resultados das análises químicas dos extratos etanólicos e aquosos das folhas da mangueira obtidos através de uma e duas etapas de extração. Os resultados das análises dos extratos supercríticos obtidos a 40 °C serão apresentados no intuito de analisar o efeito de todos os solventes utilizados na extração dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante dos extratos.

#### 5.3.1 Fenólicos Totais

A obtenção de compostos fenólicos de matrizes vegetais é influenciada pela polaridade do solvente e pela solubilidade destas substâncias no solvente utilizado durante o processo de extração (Sulaiman *et al.*, 2011). Dessa forma, há um grande interesse em selecionar o solvente apropriado para extração de fenólicos de uma determinada matéria-prima.

Neste trabalho, diferentes solventes *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*), entre eles a água, o etanol e o dióxido de carbono supercrítico, foram utilizados na extração de compostos fenólicos das folhas da mangueira (extração em uma etapa). A extração em duas etapas, utilizando a extração supercrítica como um pré-tratamento para remoção dos compostos pouco polares, também foi investigada. Neste caso, os resíduos das extrações supercrítica realizadas na temperatura de 40 °C e nas pressões de 150 e 250 bar foram submetidos a uma nova extração com água ou etanol. O efeito da utilização desses solventes em uma e/ou duas etapas de extração é apresentado na Tabela 5.11.

Na extração em uma etapa (extratos S150, S250, A e E), os resultados mostram que o rendimento de compostos fenólicos variou significativamente entre 0,36 e 21,80 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>, dependendo do solvente utilizado. Entre todos os solventes, o etanol mostrou-se o mais eficiente na extração dos compostos fenólicos da folha da mangueira, em seguida foi a água, e por último, o dióxido de carbono supercrítico. A baixa eficiência da extração supercrítica pode ser atribuída ao fato de que os compostos fenólicos presentes na folha da mangueira são pouco solúveis no CO<sub>2</sub>, um solvente apolar (Vatai, Skerget e Knez, 2009; Shi *et al.*, 2011).

Tabela 5.11 – Rendimento de fenólicos totais no extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

<b>Tipo de Extração</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Solvente*</b>	<b>Designação</b>	<b>Rendimento de Fenólicos Totais (mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>)**</b>	
Uma Etapa	Folhas de mangueira secas	CO <sub>2</sub> (150 bar)	S150	0,56 ± 0,01	
		CO <sub>2</sub> (250 bar)	S250	0,36 ± 0,06	
		Água	A	8,46 ± 0,16 <sup>d</sup>	
		Etanol	E	20,33 ± 1,59 <sup>a</sup>	
Duas Etapas	Resíduo da ES a 150 bar e 40°C	Água	S150-A	13,97 ± 0,76 <sup>b</sup>	
		Etanol	S150-E	21,11 ± 0,31 <sup>a</sup>	
		Resíduo da ES a 250 bar e 40°C	Água	S250-A	11,39 ± 0,71 <sup>c</sup>
			Etanol	S250-E	21,80 ± 0,24 <sup>a</sup>

\*Todas as extrações foram realizadas a 40 °C.

\*\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os obtido por Ling, Yap *et al.* (2009), os quais observaram que o etanol é mais apropriado para extração de compostos fenólicos das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.) do que a água destilada. Essa ordem de rendimento de fenólicos totais dos extratos (extrato etanólico > extrato aquoso > extratos supercrítico) também foi observada Martinez-Correa, Magalhaes *et al.* (2011) na extração de compostos fenólicos das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

Conforme mencionado anteriormente, uma comparação direta dos resultados obtidos com os trabalhos existentes na literatura é uma tarefa difícil, uma vez que a preparação da matéria-prima e o procedimento experimental de extração variam significativamente de um trabalho para outro. Sultana, Hussain *et al.* (2012) reportaram um rendimento de fenólicos totais de aproximadamente 23,0 e 25,2 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>folhas</sub> para duas variedades de folhas de mangueiras (Langra e Chonsa, respectivamente) utilizando metanol 80% como solvente. Estes resultados foram comparáveis ao rendimento de fenóis dos extratos etanólicos obtidos neste trabalho (entre 20,33 e 21,80 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>) das folhas de mangueira da variedade Carabao. No entanto, é importante destacar que o metanol é considerado tóxico e apresenta potencial cancerígeno, diferentemente do etanol, o qual foi utilizado neste trabalho.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho do rendimento de fenólicos totais dos extratos das folhas da mangueira foram semelhantes aos extratos de outras matrizes vegetais. Nantitanon, Yotsawimonwat *et al.* (2010), por exemplo, reportaram um rendimento de fenólicos totais de aproximadamente 15,43 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub> em uma extração etanólica da folha de goiabeira (*Psidium guajava*) em temperatura ambiente com duração de 72 h e com agitação de 200 rpm. Pande e Akoh (2010) também analisaram o rendimento de fenólicos dos extratos obtidos utilizando folhas frescas da figueira (*Ficus carica*), nespereira (*Eriobotrya japonica*) e mamoeiro (*Asimina triloba*). Eles utilizaram como solvente uma mistura de acetona, água e ácido acético (70:28:2, v/v/v) e obtiveram os seguintes resultados 0,69, 1,78 e 0,78 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>folha</sub>, respectivamente.

Na extração em duas etapas, o rendimento de fenólicos totais dos extratos aquosos (S150-A e S250-A) foram significativamente superiores do que o procedimento em apenas em uma etapa (extrato A). Esse aumento no rendimento pode ser explicado através de dois motivos. Primeiro, a extração de compostos apolares e de alguns fenóis pelo CO<sub>2</sub> supercrítico altera a estrutura física dos solutos remanescente na matriz residual. Segundo, a despressurização do sistema depois da

---

extração supercrítica provoca o rompimento das células e facilita a liberação dos solutos (Vatai, Skerget e Knez, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011). A Figura 5.12 mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das folhas da mangueira antes e depois da extração supercrítica.

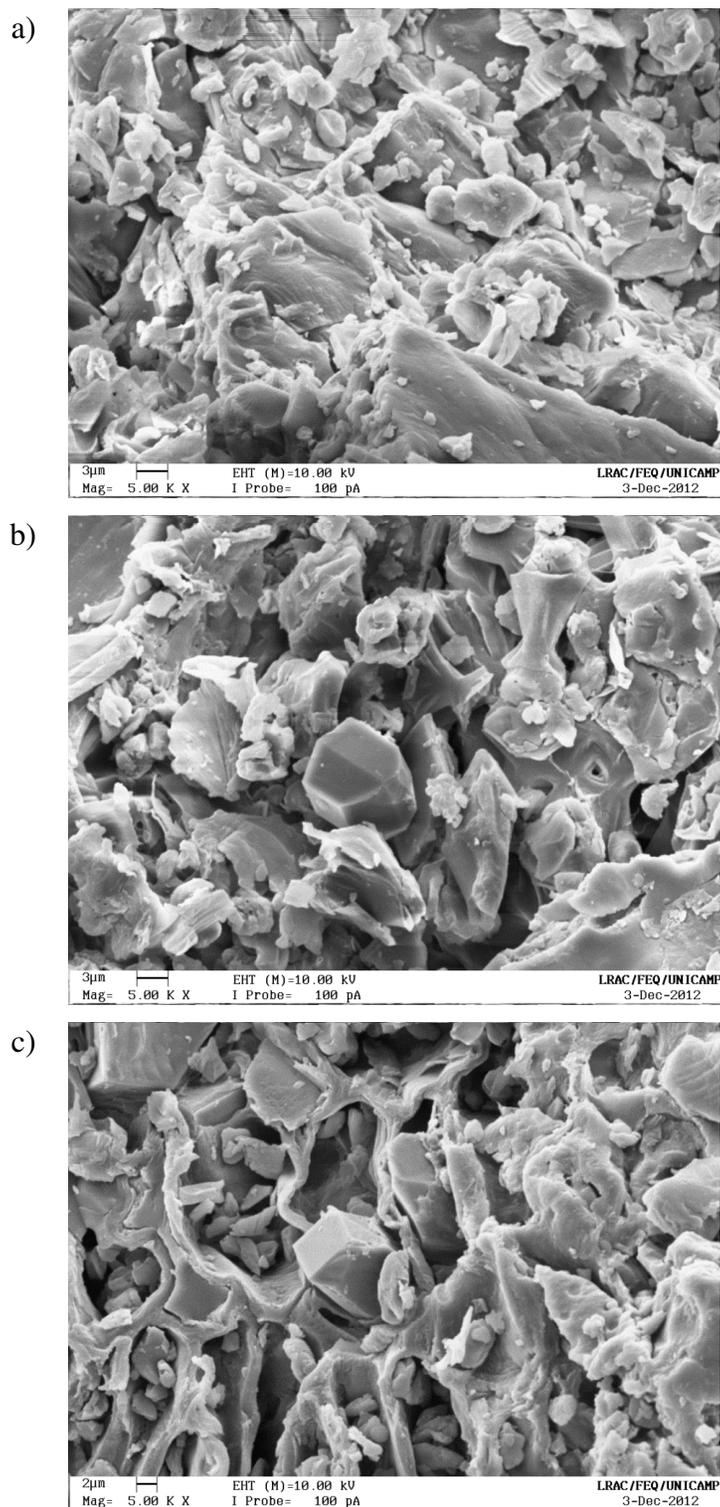


Figura 5.12 – Imagens de MEV (5000 X) da matriz vegetal: a) antes da extração supercrítica, b) depois da extração supercrítica a 40 °C e 150 bar e c) depois da extração supercrítica a 40 °C e 250 bar.

A análise do efeito do pré-tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico sobre a estrutura física da matriz vegetal (Figuras 5.12b e 5.12c) torna-se difícil, visto que as imagens obtidas pela MEV não foram fotografadas no mesmo local e, ainda, as estruturas das folhas são bastante heterogênea, como pode ser observado pela Figura 5.13.

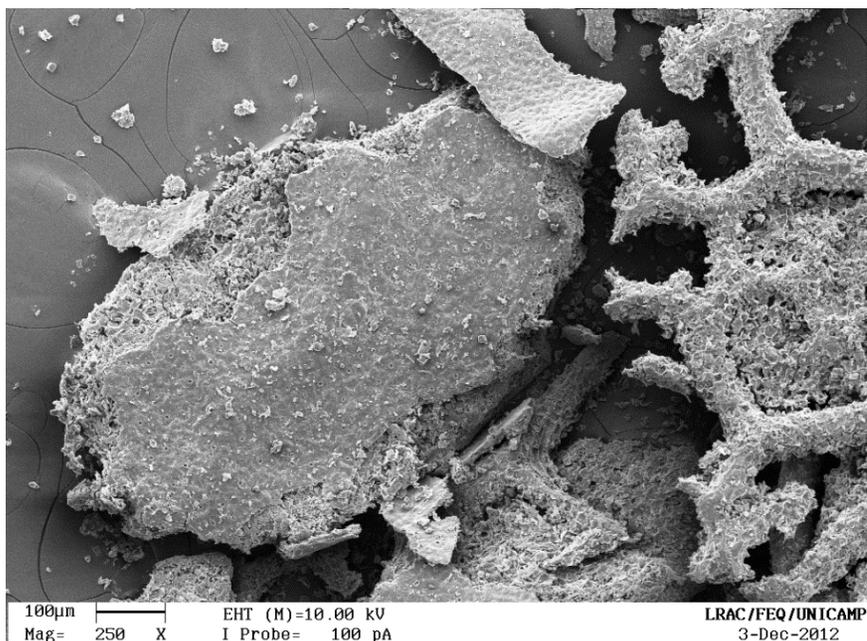


Figura 5.13 - Imagem de MEV (250 X) da matriz vegetal.

No entanto, de acordo a Figura 5.14, a influência do pré-tratamento com CO<sub>2</sub> na extração aquosa foi maior na condição de 40 °C e 150 bar, resultando em um aumento de aproximadamente 65% no rendimento de fenólicos totais (de 8,46 para 13,97 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>). Isto ocorre, provavelmente, devido à extração de uma quantidade maior de compostos fenólicos pelo CO<sub>2</sub> nessas condições (durante a primeira etapa, extrato S150), fato que provoca maiores alterações nas interações entre os fenóis remanescentes nas folhas da mangueira, os quais foram extraídos com maior eficiência na segunda etapa com a extração aquosa.

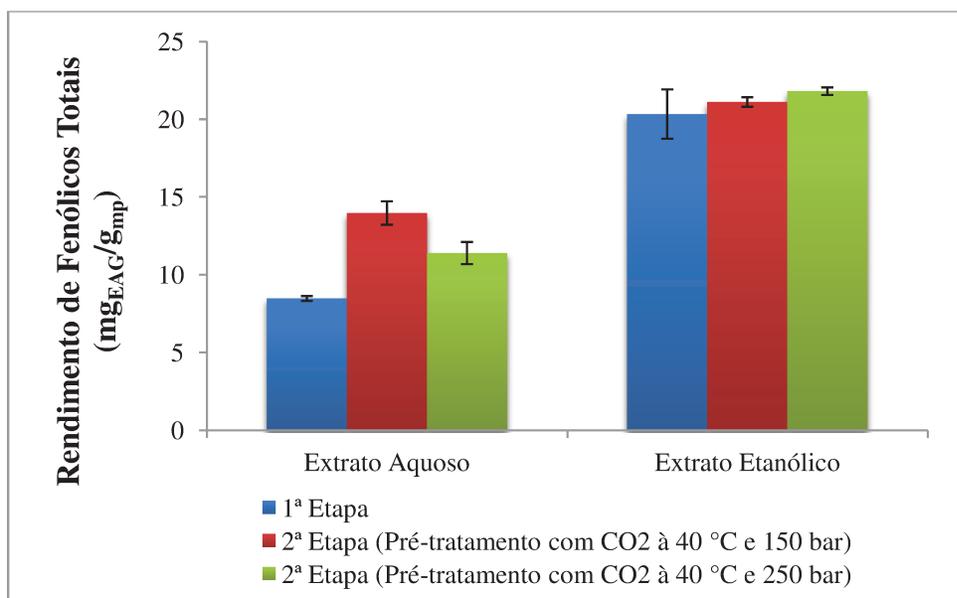


Figura 5.14 – Rendimento de fenólicos totais dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

Com relação à extração etanólica, não houve diferença estatística nos resultados das extrações em uma ou duas etapas (Figura 5.14) e, ainda, o rendimento de fenólicos totais da extração etanólica em apenas uma etapa foi superior aos demais solventes empregados.

Em geral, o etanol favorece a extração de substâncias com polaridade intermediária devido a seu índice de polaridade ser reduzido quando comparado com a água (Barwick, 1997). Dessa forma, o melhor desempenho do etanol apresentado neste trabalho sugere que a folha da mangueira é constituída majoritariamente por compostos fenólicos de polaridade intermediária. Além disso, pode-se afirmar que não há a necessidade do pré-tratamento da matriz vegetal com CO<sub>2</sub> supercrítico para maximização do rendimento de fenólicos totais na extração etanólica.

### 5.3.2 Mangiferina

A Tabela 5.12 mostra os valores de rendimento da mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C<sub>2</sub>-β-D-glucosídeo) nos extratos das folhas da mangueira. Na extração em uma etapa, o maior rendimento de mangiferina foi obtido no extrato etanólico E (526 mg/100 g<sub>mp</sub>), seguido do extrato aquoso A (268 mg/100 g<sub>mp</sub>). O melhor desempenho do etanol na

extração da mangiferina já era esperado, uma vez que esse composto apresenta baixa solubilidade em água (Gómez-Zaleta *et al.*, 2006).

Em nenhuma das condições estudadas o dióxido de carbono puro foi capaz de extrair o composto fenólico mangiferina. Fernández-Ponce *et al.* (2012) também reportaram que a extração supercrítica sem a adição de um cosolvente é incapaz de solubilizar a mangiferina da folha da mangueira. No entanto, na melhor condição estudada (100 bar e 35 °C), esses mesmos autores mostraram que a adição de 20% de etanol no CO<sub>2</sub> faz com que o rendimento de mangiferina no extrato final seja de 191,8 mg/100 g<sub>mp</sub>. Ling *et al.* (2009) relataram valores de aproximadamente 664 e 71 mg/100 g<sub>mp</sub> para o rendimento de mangiferina dos extratos etanólicos e aquosos da folha da mangueira, respectivamente, utilizando as mesmas condições de extração utilizadas neste trabalho. A diferença entre os valores obtidos por Ling *et al.* (2009) e os apresentados neste trabalho estão relacionadas principalmente a época de coleta da matéria-prima, armazenagem, idade da planta, condições climáticas e variedade da planta.

Tabela 5.12 – Rendimento de mangiferina nos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

<b>Tipo de Extração</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>Solvente*</b>	<b>Designação</b>	<b>Rendimento de Mangiferina (mg/100 g<sub>mp</sub>)**</b>
		CO <sub>2</sub> (150 bar)	S150	-
Uma	Folhas de mangueira	CO <sub>2</sub> (250 bar)	S250	-
Etapas	secas	Água	A	268 ± 20 <sup>d</sup>
		Etanol	E	526 ± 35 <sup>a</sup>
Duas	Resíduo da ES a	Água	S150-A	336 ± 12 <sup>b</sup>
	150 bar e 40°C	Etanol	S150-E	521 ± 6 <sup>a</sup>
	Resíduo da ES	Água	S250-A	317 ± 1 <sup>c</sup>
	a 250 bar e 40°C	Etanol	S250-E	504 ± 25 <sup>a</sup>

\*Todas as extrações foram realizadas a 40 °C.

\*\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Assim como no rendimento de fenólicos totais, o pré-tratamento com CO<sub>2</sub> mostrou influência no rendimento de mangiferina apenas nas extrações aquosas. A 150 bar e 40 °C, o pré-tratamento com CO<sub>2</sub> elevou o rendimento de mangiferina em aproximadamente 25% no extrato

aquoso S150-A, enquanto que no pré-tratamento a 250 bar e 40 °C, o extrato aquoso obtido na segunda etapa (S250-A) apresentou um aumento de cerca de 18% em relação ao extrato A. No entanto, todos os extratos (A, S150-A, S250-A) aquosos tiveram rendimentos de mangiferina inferiores aos extratos etanólicos E, S150-E e S250-E, os quais apresentaram resultados iguais de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

As Figuras 5.15 e 5.16 apresentam os cromatogramas dos extratos obtidos em uma e duas etapas de extração. Os cromatogramas dos extratos aquosos (A, S150-A e S250-A) apresentam um comportamento semelhante. O mesmo ocorre com os extratos etanólicos (E, S150-E e S250-E). O composto mangiferina foi observado no tempo de retenção de aproximadamente 2,25 minutos. Os extratos etanólicos apresentaram um perfil rico de compostos com baixo tempo de retenção, onde a mangiferina foi, visivelmente, o componente majoritário no comprimento de onda avaliado (254 nm). No entanto, os extratos aquosos ainda apresentaram outros picos relevantes, indicando a presença de mais compostos importantes.

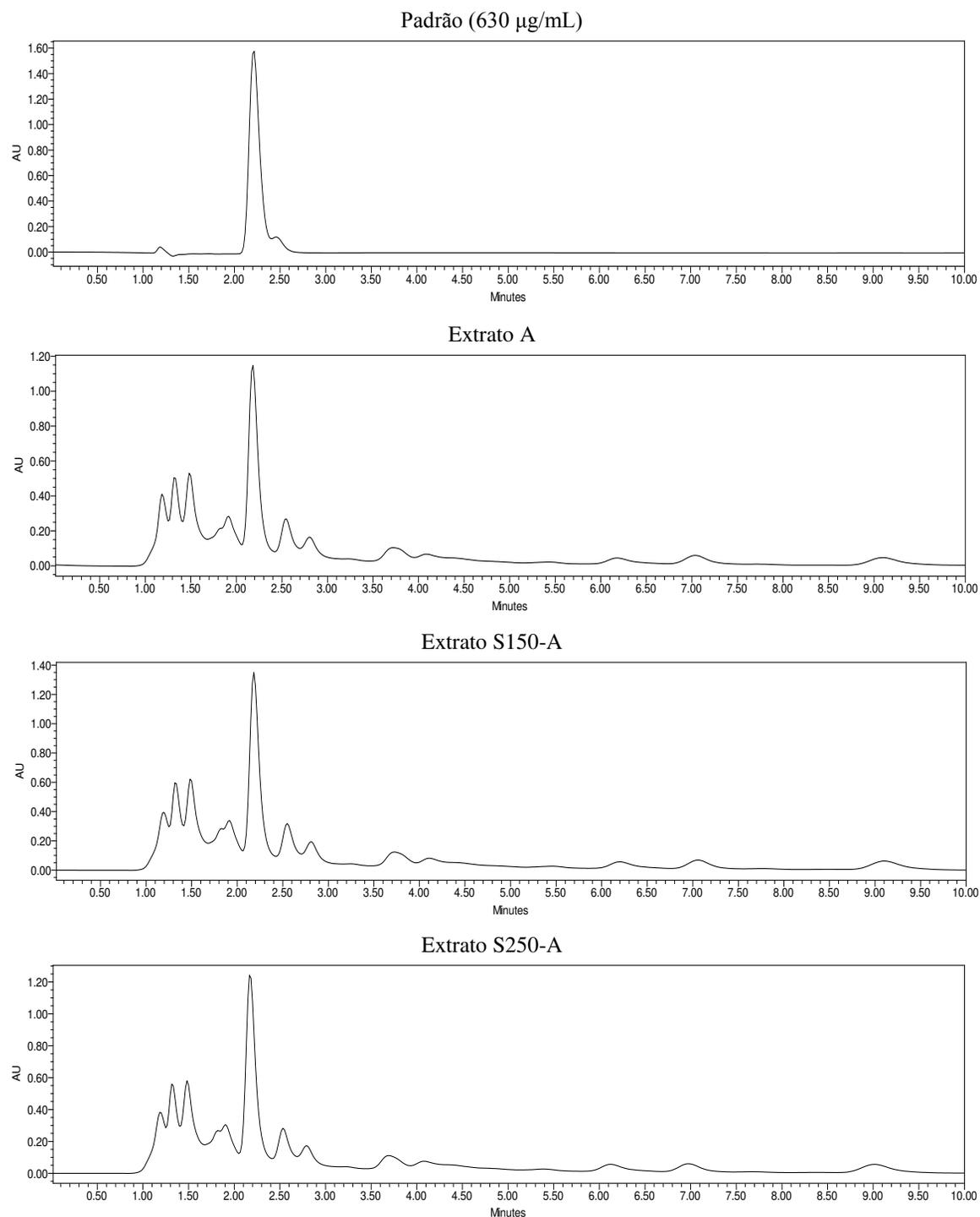


Figura 5.15 - Cromatograma do padrão e dos extratos aquosos no comprimento de onda de 254 nm.

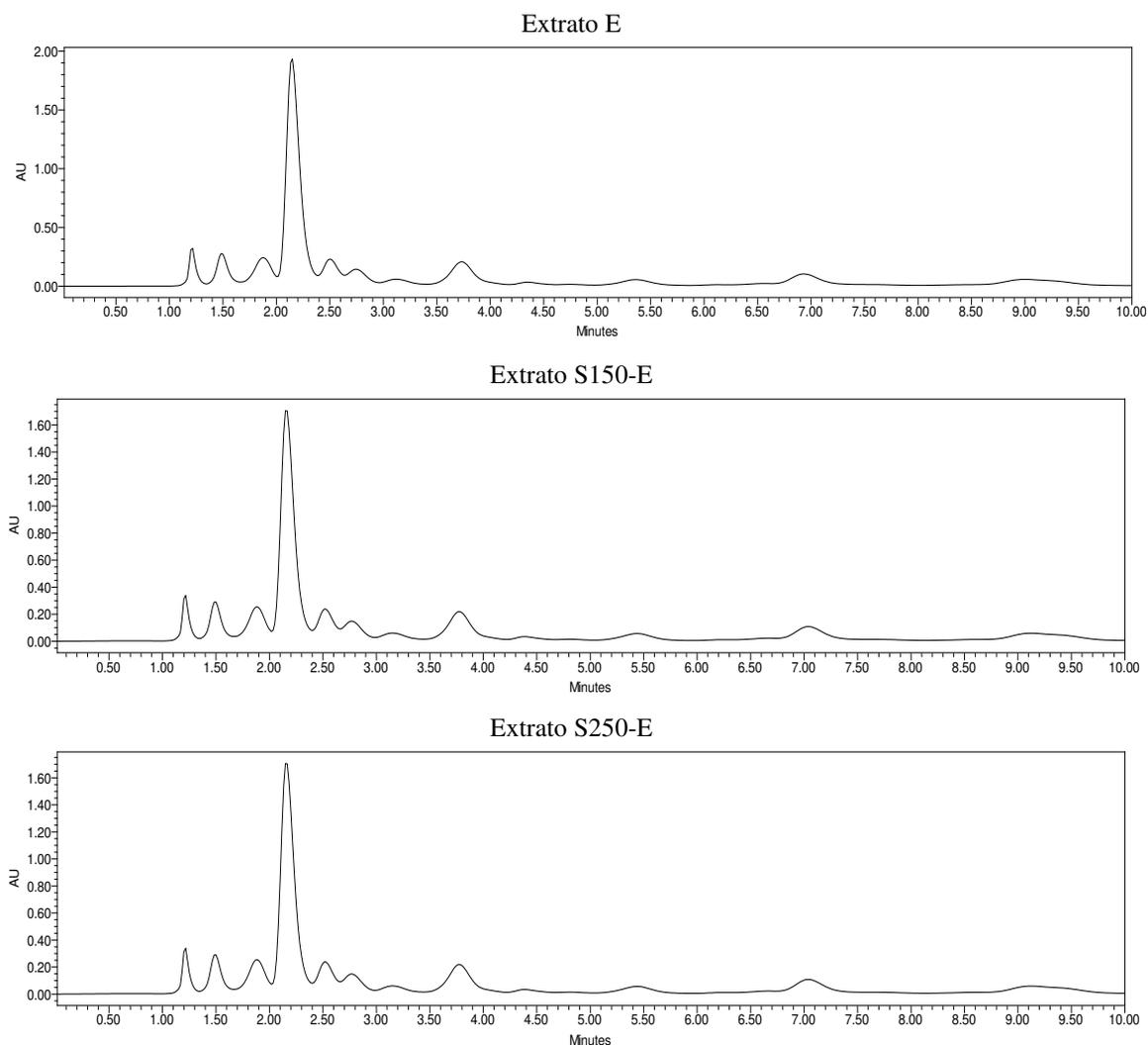


Figura 5.16 - Cromatogramas dos extratos etanólicos no comprimento de onda de 254 nm.

### 5.3.3 Atividade Antioxidante

#### 5.3.3.1 DPPH

O ensaio de sequestro do radical livre DPPH é um dos mais utilizados para medir a capacidade antioxidante *in vitro*, no entanto houve uma grande dificuldade em se comparar os resultados aqui obtidos a os encontrados na literatura devido às diferenças existentes entre as metodologias executadas, assim como devido às diferentes formas de expressão dos resultados. É

importante mencionar que o presente estudo é o primeiro a analisar o efeito da pressão do CO<sub>2</sub> durante o pré-tratamento da matriz vegetal na atividade antioxidantes dos extratos.

De acordo com a Tabela 5.13, os valores resultantes do ensaio DPPH variaram entre 0,14 e 17,24 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>. Com relação aos solventes, o extrato etanólico apresentou a maior atividade antioxidante (15,27 - 17,24 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>), seguido do extrato aquoso (5,40 - 9,45 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>). Novamente, os resultados obtidos pela extração supercrítica (0,14 - 0,26 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>) foram insignificantes quando comparados às extrações convencionais. No entanto, é importante ressaltar que o método DPPH não é o mais adequado para avaliar a atividade antioxidante dos extratos supercríticos, pois este radical interage mais especificamente com compostos hidrofílicos e os extratos provenientes da extração supercrítica sem modificadores são, de maneira geral, hidrofóbicos (Magalhaes *et al.*, 2008).

Tabela 5.13 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

Tipo de Extração	Matéria-prima	Solvente*	Designação	DPPH (mg <sub>EAG</sub> /g <sub>mp</sub> )**
Uma Etapa	Folhas de mangueira secas	CO <sub>2</sub> (150 bar)	S150	0,26 ± 0,01
		CO <sub>2</sub> (250 bar)	S250	0,14 ± 0,01
Duas Etapas	Resíduo da ES a 150 bar e 40°C	Água	A	5,40 ± 0,30 <sup>c</sup>
		Etanol	E	16,10 ± 1,25 <sup>a</sup>
		Água	S150-A	7,87 ± 0,59 <sup>b</sup>
		Etanol	S150-E	15,27 ± 0,92 <sup>a</sup>
Duas Etapas	Resíduo da ES a 250 bar e 40°C	Água	S250-A	9,45 ± 0,53 <sup>b</sup>
		Etanol	S250-E	17,24 ± 0,90 <sup>a</sup>

\*Todas as extrações foram realizadas a 40 °C.

\*\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A Figura 5.17 mostra que o efeito do pré-tratamento com CO<sub>2</sub> (extração em duas etapas) foi significativo apenas para a extração aquosa. O extrato aquoso S250-A obtido pela extração em duas etapas com o resíduo sólido da extração supercrítica a 250 bar e 40 °C apresentou o melhor potencial antioxidante (9,45 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>), exibindo um aumento de 75% quando comparada extração aquosa em apenas uma única etapa (extrato A, 5,40 mg<sub>EAG</sub>/g<sub>mp</sub>). Neste caso,

diferentemente do esperado, o extrato aquoso S250-A exibiu uma atividade antioxidante maior que o extrato S150-A que, por sua vez, apresentou o melhor rendimento de fenólicos totais entre todos os extratos aquosos. Isto mostra que compostos não fenólicos também podem ser responsáveis pela atividade antioxidante, fato também sugerido por Yam, Ang *et al.* (2009).

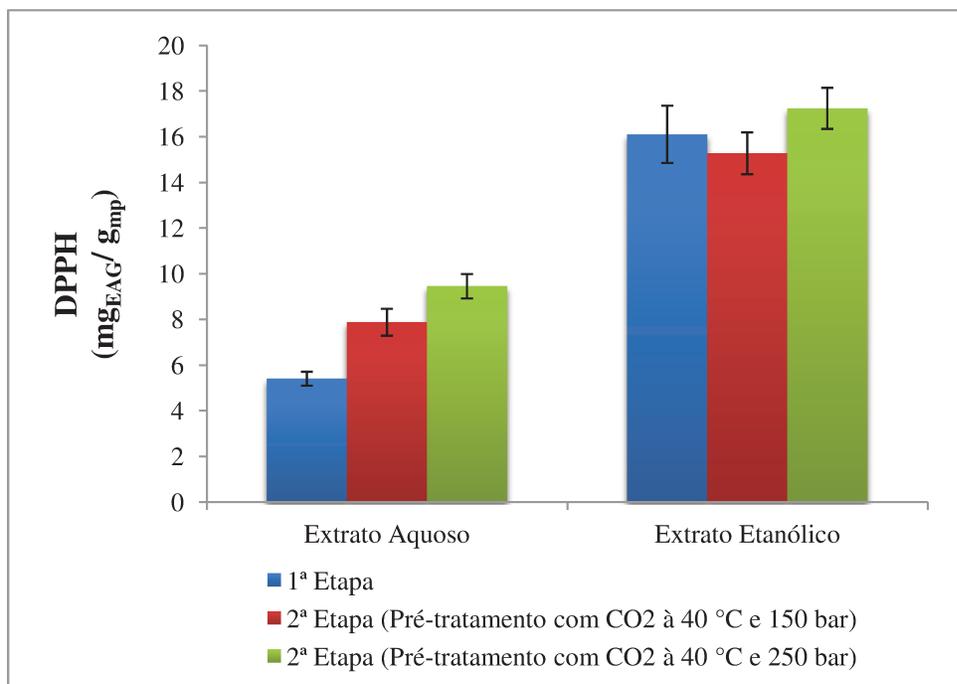


Figura 5.17 – Atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos (E, S150-E e S250-E) foram estatisticamente iguais, ou seja, não houve influência do pré-tratamento na obtenção dos antioxidantes (de acordo com o método DPPH) na segunda etapa de extração. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para o rendimento de fenólicos totais e de mangiferina (item 5.3.1).

Sulaiman, Sajak *et al.* (2011) examinaram a atividade antioxidante dos extratos de 37 vegetais utilizando quatro solventes: acetona 70%, etanol 70%, metanol 70% e água destilada. Nos extratos aquosos, apenas cinco matérias-primas apresentaram atividade antioxidante superior a 5 mgEAG/gmp, sendo que os demais resultados variaram entre 0,3 e 5 mgEAG/gmp. O extrato aquoso da manga (fruta), por exemplo, exibiu atividade antioxidante de 3,5 mgEAG/gmp. Neste trabalho, todos os extratos aquosos apresentaram valores de atividade antioxidante superiores a 5

$\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{mp}}$ . Com relação aos extratos obtidos com etanol 70%, Sulaiman, Sajak *et al.* (2011) mostram que apenas sete matérias-primas tiveram resultados superiores a  $17,24 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{mp}}$ , melhor resultado aqui apresentado. Isto sugere que a folha da mangueira pode ser considerada uma fonte significativa de antioxidantes naturais.

Além disso, Scherer e Godoy (2009) avaliaram a atividade antioxidante de diversos compostos antioxidantes, entre eles: ácido gálico, BHA (antioxidante comercial), ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico, quercetina, rutina, ácido protocatecuico e ácido trans-cinâmico. Eles reportaram que o ácido gálico é o antioxidante mais potente entre as substâncias analisadas e que, nas condições do experimento, apenas  $0,29 \mu\text{g}$  de ácido gálico dissolvidos em  $0,1 \text{ ml}$  de metanol foram suficientes para inibir aproximadamente  $150 \mu\text{g}$  de DPPH em uma solução metanólica de  $3,9 \text{ ml}$  com  $300 \mu\text{g}$  do radical livre. Deste modo, é possível afirmar que os resultados obtidos neste trabalho foram bastante significativos (de acordo com o método DPPH), visto que, utilizando a extração etanólica, um grama de folha de mangueira seca é equivalente a  $17.240 \mu\text{g}$  de ácido gálico, o qual é considerado um antioxidante muito forte.

### 5.3.3.2 ORAC

Todas as amostras analisadas apresentaram proteção antioxidante contra os radicais peróxidos. De acordo com a Tabela 5.14, os valores de ORAC variaram de  $1,50$  a  $26,38 \mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$ , dependendo do solvente utilizado e do tipo de extração.

As amostras da extração aquosa em duas etapas (Extratos S150-A e S250-A) mostraram um aumento de até 30% da capacidade antioxidante contra os radicais peróxidos, em relação ao extrato A. Conforme a Figura 5.18, em ambos os pré-tratamentos, os extratos aquosos obtidos na segunda etapa (Extratos S150-A e S250-A) apresentaram resultados estatisticamente iguais a quaisquer extratos etanólicos (Extratos E, S150-E e S250-E), os quais, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas nos valores obtidos pelo ORAC. A não influência do pré-tratamento da matriz vegetal na extração etanólica também foi observada nos ensaios de DPPH, Folin-Ciocalteu (fenólicos totais) e mangiferina.

Tabela 5.14 - Atividade antioxidante pelo método ORAC dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

Tipo de Extração	Matéria-prima	Solvente*	Designação	ORAC ( $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$ )**	
Uma Etapa	Folhas de mangueira secas	CO <sub>2</sub> (150 bar)	S150	1,50 ± 0,06	
		CO <sub>2</sub> (250 bar)	S250	1,74 ± 0,09	
		Água	A	18,34 ± 1,71 <sup>c</sup>	
		Etanol	E	24,71 ± 1,26 <sup>a,b</sup>	
Duas Etapas	Resíduo da ES a 150 bar e 40°C	Água	S150-A	23,24 ± 1,43 <sup>b</sup>	
		Etanol	S150-E	25,60 ± 0,27 <sup>a,b</sup>	
		Resíduo da ES a 250 bar e 40°C	Água	S250-A	23,91 ± 0,66 <sup>a,b</sup>
			Etanol	S250-E	26,38 ± 0,15 <sup>a</sup>

\*Todas as extrações foram realizadas a 40 °C.

\*\*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

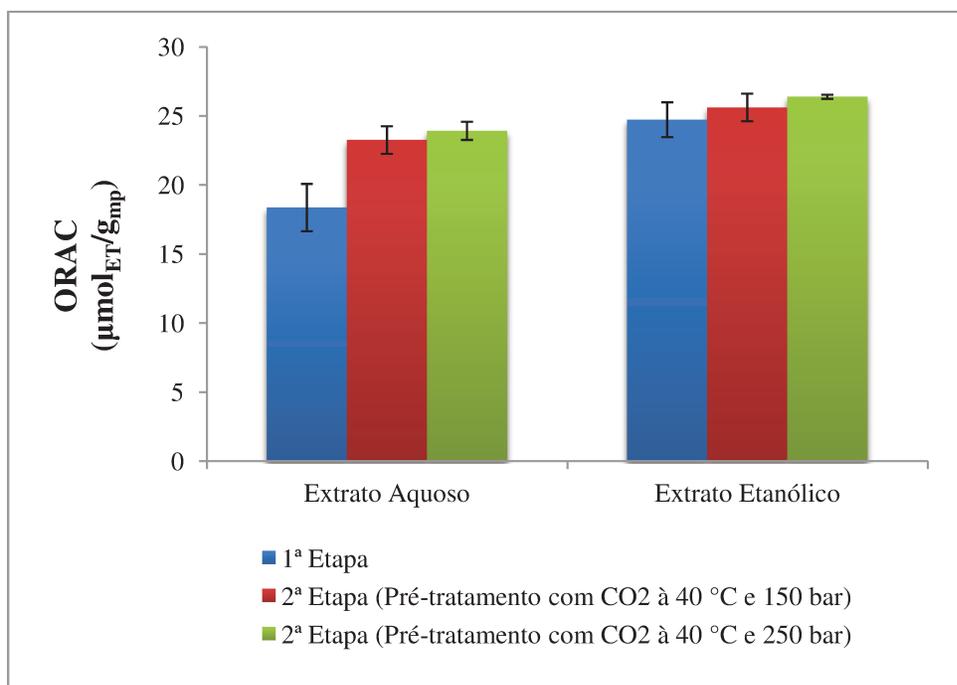


Figura 5.18 - Atividade antioxidante pelo método ORAC dos extratos das folhas da mangueira obtidos em uma e duas etapas de extração.

Em comparação com a literatura, a atividade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos das folhas da mangueira (18,34 - 26,38  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$ ) são comparáveis aos extratos

metanólico da polpa de goiaba (18,03 – 32,25  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$ ) e aos extratos de diferentes tipos de *berries* obtidos com acetonitrila (13.9 - 45.9  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$ ), os quais foram considerados extratos com elevado potencial antioxidante segundo Thaipong, Boonprakob *et al.* (2006) e Prior, Cao *et al.* (1998), respectivamente. No entanto, em comparação com a atividade antioxidante de extratos de outras folhas, os resultados de ORAC obtidos neste trabalho foram baixos. Wang e Lin (2000), por exemplo, reportaram atividades antioxidantes entre 69,7 e 182,2  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{mp}}$  dos extratos obtidos com uma solução tampão de fosfato (75 mM, pH 7.0) das folhas novas e velhas da framboeseira, da amoreira e do morangueiro.

Apesar disso, convém ressaltar que a ausência de resultados relevantes deste ensaio não descredencia os extratos da folha da mangueira como antioxidantes em potencial, dados que os procedimentos experimentais da extração e da metodologia ORAC diferem na maioria dos trabalhos. Além disso, segundo Michiels, Kevers *et al.* (2012), o tipo de solvente utilizado na extração afeta significativamente a atividade antioxidante dos extratos (uma variação maior que 30%) e a comparação da capacidade antioxidante de diferentes matrizes vegetais torna-se impossível sem um procedimento padrão para a preparação da amostra.

Vale ressaltar ainda que ambos os solventes líquidos utilizados neste trabalho, água e etanol, são considerados *GRAS* (*Generally Reconized As Safe*), ao contrário dos solventes comumente empregados para extração de antioxidantes, como metanol, acetona, acetonitrila e a solução de fosfato (Pinelo *et al.*, 2004; Pinelo *et al.*, 2005). Na literatura não foram encontrados trabalhos de extração etanólica e/ou aquosa de antioxidantes de folhas envolvendo o método ORAC.

Finalmente, os resultados do método ORAC – baseado no mecanismo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) – obtidos neste trabalho sugerem que os compostos antioxidantes extraídos da folha da mangueira, utilizando água ou etanol, agem primordialmente doando elétrons (SET – *Single Electron Transfer*), uma vez que os métodos baseados neste mecanismo de ação (DPPH e Fenólicos Totais) reportaram ótimos resultados, conforme discutido anteriormente.

### 5.3.4 Relação entre o rendimento de Fenólicos Totais, mangiferina e atividade antioxidantes pelos métodos DPPH e ORAC

É de fundamental importância verificar o efeito do rendimento de fenólicos totais e de mangiferina na atividade antioxidante dos extratos naturais. Dessa forma, utilizando os dados das Tabelas 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14, onde estão os resultados obtidos para o rendimento de fenólicos totais, de mangiferina, capacidade de sequestro do radical DPPH e atividade antioxidante pelo método ORAC, respectivamente, aplicou-se um teste de correlação, no qual utilizou-se todos os valores médios dos resultados referentes aos extratos líquidos. Os índices de correlação obtidos, entre as análises realizadas, estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Coeficiente de correlação linear ( $r$ ) entre os métodos de atividade antioxidante utilizados, rendimento de fenólicos totais e de mangiferina dos extratos aquosos e etanólicos.

Métodos	Fenólicos totais	Mangiferina	DPPH	ORAC
<b>ORAC</b>	0,87**	0,81	0,87**	-
<b>DPPH</b>	0,96*	0,97*	-	0,87**
<b>Mangiferina</b>	0,98*	-	0,97*	0,81
<b>Fenólicos totais</b>	-	0,98*	0,96*	0,87**

\*  $p \leq 0,01$  \*\*  $p \leq 0,05$

Na literatura existem diversos trabalhos nos quais os autores obtiveram correlações entre diversas análises antioxidantes dos extratos, enquanto que outros não encontram nenhuma relação. Martinez-Correa, Magalhaes *et al.* (2011), por exemplo, reportaram uma baixa correlação linear ( $r = 0,49$ ) entre os polifenóis e a capacidade de sequestro do radical DPPH para o extrato aquoso e etanólico da folha da pitangueira. Brahmi, Mechri *et al.* (2012) mostraram que a atividade antioxidante do ensaio DPPH correlacionou-se bem com o conteúdo de fenólicos totais dos extratos das folhas de oliveira obtidos com acetato de etila ( $r = 0,997$  e  $p = 0,053$ ), no entanto, a correlação foi baixa para os extratos obtidos com hexano, clorofórmio e metanol ( $r = -0,858$ ,  $p = 0,343$ ;  $r = -0,397$ ;  $p = 0,740$  e  $r = 0,142$ ;  $p = 0,909$ , respectivamente). Kevers, Falkowski *et al.* (2007) obtiveram em seus estudos com frutas e vegetais uma significativa correlação ( $r^2 = 0,892$ ) entre os fenólicos totais e a atividade antioxidante medida pelo ensaio de

DPPH, enquanto que nenhuma correlação foi encontrada entre os fenólicos totais e ORAC ou entre o ORAC e o método DPPH.

Neste trabalho, no entanto, o ensaio de quantificação dos compostos fenólicos totais mostrou alta correlação com o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH ( $r = 0,96$ ) e com o ensaio de atividade antioxidante pelo método ORAC ( $r = 0,87$ ). Estes resultados sugerem que a presença de compostos fenólicos influenciou diretamente a atividade antioxidante dos extratos, ou seja, a maioria dos antioxidantes bioativos são fenóis. Além disso, a boa correlação entre o rendimento de mangiferina com o rendimento de fenólicos totais ( $r = 0,98$ ) e com o método DPPH ( $r = 0,97$ ) mostra que a mangiferina é, realmente, um dos principais compostos fenólicos antioxidantes da folha da mangueira. Por fim, a relação entre o rendimento de mangiferina e a atividade antioxidante pelo método ORAC foi baixa ( $r = 0,81$ ) comparando com os outros métodos, indicando provavelmente que esse composto bioativo age preferencialmente doando elétrons (mecanismo SET, método DPPH) do que doando átomos de hidrogênio (mecanismo HAT, método ORAC).

Os dois métodos para avaliação da atividade antioxidante (DPPH e ORAC) apresentaram uma boa correlação linear ( $r = 0,87$ ), apesar desses métodos apresentarem mecanismos diferentes de reação. Este resultado sugere que há um equilíbrio de antioxidantes que agem pelos mecanismos HAT e SET nos extratos das folhas da mangueira. No entanto, com relação aos fenólicos totais e ao método DPPH, a correlação entre esses dois ensaios ( $r = 0,96$ ) era prevista, pois ambos baseiam-se no mecanismo de reação SET. As Figuras 5.19 e 5.20 mostram a comparação entre esses dois métodos, uma vez que os dois resultados são expressos em miligramas equivalentes em ácido gálico por grama de matéria prima ( $\text{mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{mp}}$ ). A Figura 5.19 mostra a relação entre os fenólicos totais dos extratos aquosos e, bem como, suas capacidades antioxidantes medidas pelo método DPPH, enquanto que a Figura 5.20 apresenta esta relação para os extratos etanólicos. A diferença dos resultados em miligrama equivalente de ácido gálico deve-se ao fato de se utilizar radicais e tempos de reação diferentes nos dois métodos.

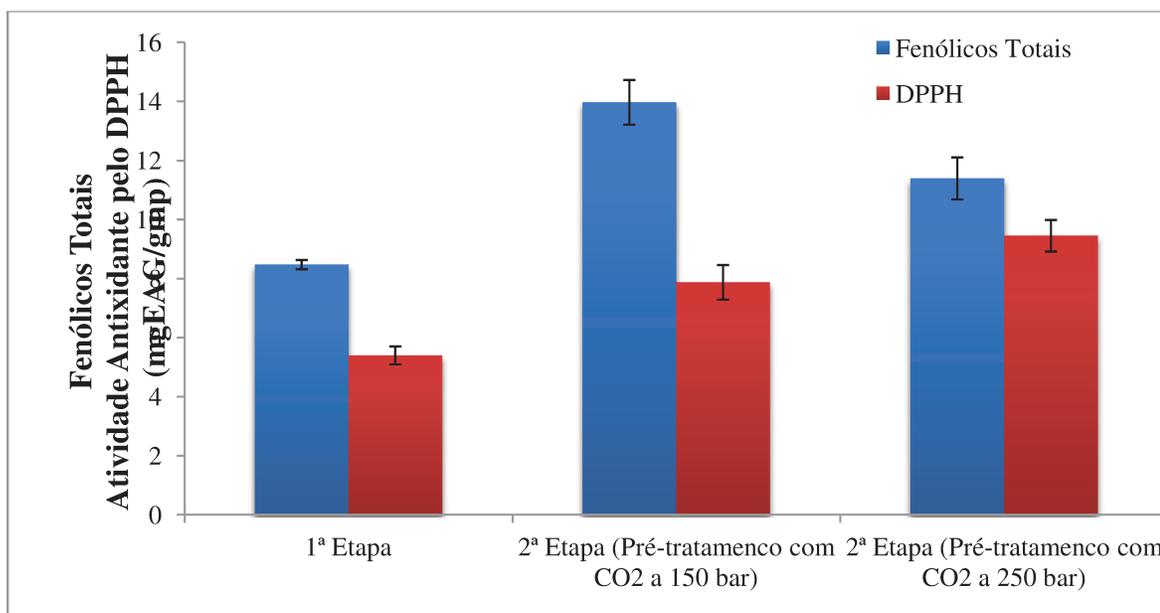


Figura 5.19 – Relação entre os fenólicos totais e atividade de sequestro medida pelo método DPPH para os extratos aquosos.

Como reportado no item 5.3.3.1, o extrato S250-A apresentou a maior atividade antioxidante (medida pelo método DPPH), no entanto não exibiu o maior rendimento de fenólicos totais (Figura 5.19). Este fato pode ser explicado se considerarmos que o extrato obtido nestas condições pode conter substâncias oxigenadas que agem como pró-oxidantes (Ćavar *et al.*, 2008) e/ou há efeitos de sinergismos entre os compostos extraídos que aumentam a atividade antioxidante do extrato (Wu *et al.*, 2009).

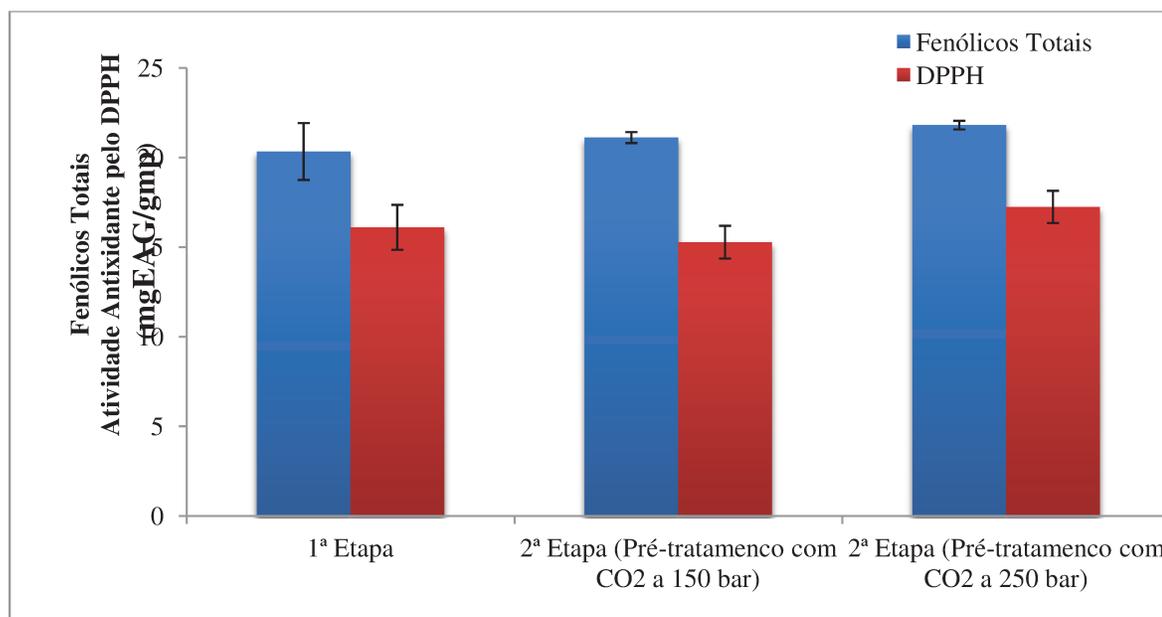


Figura 5.20 - Relação entre os fenólicos totais e atividade de sequestro medida pelo método DPPH para os extratos etanólicos.

Os resultados obtidos do teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante (DPPH) dos extratos etanólicos (Figura 5.20) mostram que a relação entre os dois métodos é mais consistente do que quando analisada as respostas para os extratos aquosos. Estatisticamente, em todos os casos, os extratos apresentaram o mesmo rendimento de fenólicos totais e a mesma atividade antioxidante.



## 6 CONCLUSÃO

A obtenção dos extratos da folha da mangueira propiciou uma análise investigativa de qual dos métodos de extração foi mais eficiente para obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos, com atividade antioxidante e com elevados teores de mangiferina.

Na extração supercrítica, a pressão apresentou um efeito positivo no rendimento global de extração ( $p < 0,01$ ), enquanto que os efeitos da temperatura e da interação temperatura/pressão foram insignificantes considerando um valor de  $p$  de 0,05. Além disso, a presença de curvatura ( $p < 0,05$ ) indicou que o modelo linear adotado na análise estatística não foi apropriado para descrever os dados de rendimento global. O maior rendimento global da extração supercrítica (1,20%) foi obtido na condição de 40 °C e 250 bar. No entanto, a condição experimental mais eficiente para extração supercrítica dos compostos fenólicos e antioxidantes foi a 40 °C e 150 bar, onde o rendimento global foi de apenas 0,69%. Dessa forma, podemos concluir que o CO<sub>2</sub> supercrítico é bastante seletivo na solubilização dos compostos fenólicos, uma vez que as condições experimentais com os maiores rendimentos globais não resultaram em extratos com os maiores teores e/ou rendimentos de fenólicos totais.

Com relação à modelagem matemática da extração supercrítica, os dados das isotermas de solubilidade foram bem representados pelos modelos baseados na densidade do solvente. Neste caso, o modelo de Adachi e Lu (1983) apresentou um desvio absoluto médio (DAM) significativamente inferior aos demais modelos aplicados. Quanto à cinética de extração supercrítica, os modelos de De Souza, Benazzi *et al.* (2008) e de Sovová (1994) ajustaram bem os dados cinéticos experimentais obtidos. No entanto, o modelo de Sovová (1994) foi inconsistente quando analisado o ajuste dos seus parâmetros nas cinéticas do ponto central (triplicata). Nestes casos, os parâmetros ajustáveis de Sovová (1994) apresentaram significativa divergência nos ensaios do ponto central, ou seja, nas mesmas condições experimentais. Portanto, o modelo de De Souza, Benazzi *et al.* (2008), com apenas um parâmetro ajustável, pode ser considerado mais eficiente e consistente na predição da cinética de extração supercrítica das folhas de mangueira.

Em comparação com os demais métodos de extração avaliados (processos aquosos e etanólicos), a extração supercrítica provou ser ineficiente (nas condições estudadas) na extração de compostos fenólicos e/ou antioxidantes, no entanto, seus extratos podem ser ricos em outros

compostos bioativos que não foram identificados. O CO<sub>2</sub> supercrítico foi incapaz de solubilizar a mangiferina presente nas folhas da mangueira, enquanto que os extratos etanólicos e aquosos apresentaram resultados compatíveis com a literatura. Na extração em uma etapa, o etanol foi o solvente mais eficiente, apresentando maiores rendimentos de fenólicos totais, de mangiferina e melhores resultados de atividade antioxidante (de acordo com os métodos DPPH e ORAC). A água apresentou bons resultados na extração em uma etapa. No entanto, o desempenho desse solvente foi inferior ao etanol em todas as análises realizadas.

Na extração em duas etapas, a extração supercrítica prévia a extração aquosa exerceu influência positiva na segunda etapa do processo, produzindo extratos aquosos com melhores rendimentos de fenólicos totais, de mangiferina e, ainda, maiores atividades antioxidantes. A escolha das condições do pré-tratamento depende do resultado desejado. O pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico na menor pressão estudada (150 bar) propiciou o maior aumento no rendimento de fenólicos totais (65%) e de mangiferina (35%) dos extratos aquosos. Em contrapartida, o pré-tratamento a pressão de 250 bar resultou em melhores atividade antioxidante nos extratos aquosos obtidos na segunda etapa de extração, com um aumento de 75 e 30% nos resultados dos métodos DPPH e ORAC, respectivamente. Deste modo, caso a extração aquosa seja um requisito essencial de um determinado processo e deseja-se aumentar o rendimento de fenólicos e/ou atividade antioxidante dos extratos, a utilização da extração supercrítica como um pré-tratamento da matriz vegetal é uma alternativa viável.

Na extração etanólica, o efeito do pré-tratamento com CO<sub>2</sub> supercrítico não influenciou a composição final dos extratos. Em outras palavras, todos os extratos etanólicos apresentaram, estatisticamente, os mesmos resultados. Dessa forma, a utilização apenas do etanol em uma etapa de extração foi suficiente para maximizar a atividade antioxidante, o rendimento de fenólicos totais e da mangiferina dos extratos finais.

Finalmente, os resultados obtidos pelos extratos etanólicos mostram que a folha da mangueira é uma fonte potencial de compostos bioativos. Portanto, pode-se concluir que a extração etanólica é uma técnica eficiente e pode ser empregada nas indústrias onde a utilização de solventes nocivos à saúde humana sofrem restrições. Além disso, de acordo com os coeficientes de correlação obtidos entre os métodos de análises empregados, os compostos fenólicos (inclusive a mangiferina) podem ser considerados os principais antioxidantes naturais das folhas da mangueira.

## 6.1 Sugestões para trabalhos futuros

Para dar continuidade ao estudo dos processos de extração de compostos antioxidantes das folhas da mangueira, as principais sugestões para trabalhos futuros são:

- Identificação dos compostos dos extratos supercríticos através da cromatografia gasosa;
- Utilização de co-solventes polares na extração supercrítica;
- Emprego das técnicas de ultrassom e micro-ondas nos processos de extração;
- Avaliar as mudanças estruturais antes e depois da extração supercrítica através da análise da área superficial da matriz sólida pela técnica de BET.

---

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. E. M.; DARWISH, S. M.; AYAD, E. H. E.; EL-HAMAHMY, R. M. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007..
- ADACHI, Y.; LU, B. C. Y. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene. **Fluid Phase Equilibria**, v. 14, n. 0, p. 147-156, 1983.
- AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; RAO, U. P. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 982-988, 2007,
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens - oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.
- ANGUS, S.; DEREUCK, K. M.; ARMSTRONG, B. **International Thermodynamic Tables of the Fluid-State: Carbon Dioxide**. New York: Pergamon Press, 1976.
- ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1233-1240, 2007.
- ARITOMI, M.; KAWASAKI, T. New xanthone c-glucoside, position isomer of mangiferin, from anemarrhena-asphodeloides bunge. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 2327-&, 1970.
- AYMOTO HASSIMOTTO, N. M.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 394-396, 2009.
- BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection — a literature review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 293-309, 1997.
- BELTRAN, A. E.; ALVAREZ, Y.; XAVIER, F. E.; HERNANZ, R.; RODRIGUEZ, J.; NUNEZ, A. J.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 297-305, 2004.
- BERDAHL, D. R.; NAHAS, R. I.; BARREN, J. P. Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J., *et al* (Ed.). **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Philadelphia, PA: Woodhead Publishing, v.1, 2010. cap. Antioxidants in foods and beverages, p.408.
- BERNARDO-GIL, M. G.; CASQUILHO, M.; ESQUÍVEL, M. M.; RIBEIRO, M. A. Supercritical fluid extraction of fig leaf gourd seeds oil: Fatty acids composition and extraction kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, n. 1, p. 32-36, 2009.

- BIAN, X.; DU, Z.; TANG, Y. An improved density-based model for the solubility of some compounds in supercritical carbon dioxide. **Thermochimica Acta**, v. 519, n. 1–2, p. 16-21, 2011.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BOLLAND, J. L.; TEN HAVE, P. Kinetic studies in the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. **Transactions of the Faraday Society**, v. 43, p. 201-210, 1947.
- BRAHMI, F. et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38, n. 0, p. 146-152, 2012.
- BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CARVALHO JR, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 35, n. 3, p. 197-204, 2005.
- CAVALCANTI, R. N.; NAVARRO-DÍAZ, H. J.; SANTOS, D. T.; ROSTAGNO, M. A.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves: chemical composition, economic evaluation and chemometric. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 3, p. 282-294, 2012.
- CETKOVIC, G.; SAVATOVIC, S.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; DJILAS, S.; VULIC, J.; MANDIC, A.; CETOJEVIC-SIMIN, D. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, 2012.
- CHEN, H.-Y.; LIN, Y.-C.; HSIEH, C.-L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1418-1424, 2007.
- CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavo) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 2, p. 217-225, 2007.
- CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 3016-3021, 1982.
- CHRISTIANSON, D. D.; FRIEDRICH, J. P.; LIST, G. R.; WARNER, K.; BAGLEY, E. B.; STRINGFELLOW, A. C.; INGLETT, G. E. Supercritical fluid extraction of dry-milled corn germ with carbon-dioxide. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 229-&, 1984.

- CONTRERAS-CALDERON, J., CALDERON-JAIMES, L., GUERRA-HERNANDEZ, E. & GARCIA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- COSTA, P.; GONÇALVES, S.; GROSSO, C.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; BERNARDO-GIL, M. G.; ROMANO, A. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 246-256, 2012.
- DA SILVA, B. A.; GORDON, A.; JUNGFER, E.; MARX, F.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and phenolics of *Pouteria macrophylla*, an under-utilized fruit from Brazilian Amazon. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 5, p. 761-768, 2012.
- DAVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.
- DE LUCAS, A.; GRACIA, I.; RINCON, J.; GARCIA, M. T. Solubility determination and model prediction of olive husk oil in supercritical carbon dioxide and cosolvents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 14, p. 5061-5066, 2007.
- DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; HENRIQUES BECHARA, E. J.; DE BARROS, M. P.; MANO, C. M.; FONSECA GOULARTA, M. O. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469-475, 2009.
- DE SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; DA SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; CEVA ANTUNES, O. A. Supercritical extraction process and phase equilibrium of *Candeia (Eremanthus erythropappus)* oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, 2008.
- DECKER, E. A.; CHEN, B.; PANYA, A.; ELIAS, R. J. Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J., *et al* (Ed.). **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Philadelphia, PA: Woodhead Publishing, v.1, 2010. cap. Antioxidants in foods and beverages, p.408.
- DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, J. M. An improved equation for predicting the solubility of vegetable-oils in supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 27, n. 8, p. 1551-1553, 1988.

DIAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

DOMINGUES, R. M. A.; DE MELO, M. M. R.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of Eucalyptus globulus bark: Influence of the operating conditions upon yields and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, n. 0, p. 176-185, 2012.

DORTA, E.; GLORIA LOBO, M.; GONZALEZ, M. Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. C80-C88, 2012

EL MONFALOUTI, H.; CHARROUF, Z.; BELVISO, S.; GHIRARDELLO, D.; SCURSATONE, B.; GUILLAUME, D.; DENHEZ, C.; ZEPPA, G. Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 4, p. 446-452, 2012.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

FAUDALE, M.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; POLI, F.; CODINA, C. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1912-1920, 2008.

FERNÁNDEZ-PONCE, M. T.; CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, n. 0, p. 168-175, 2012.

FERNÁNDEZ-RONCO, M. P.; ORTEGA-NOBLEJAS, C.; GRACIA, I.; DE LUCAS, A., GARCÍA, M. T.; RODRÍGUEZ, J. F. Supercritical fluid fractionation of liquid oleoresin capsicum: Statistical analysis and solubility parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 22-29, 2010

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 5-6, p. 251-260, 2003.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A.; CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 20, n. 2, p. 121-133, 1993.

FERRERES, F.; GOMES, D.; VALENTAO, P.; GONCALVES, R.; PIO, R.; CHAGAS, E. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars:

Variation of phenolics and antioxidative potential. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1019-1027, 2009.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FOSTER, N. R.; GURDIAL, G. S.; YUN, J. S. L.; LIONG, K. K.; TILLY, K. D.; TING, S. S. T.; SINGH, H.; LEE, J. H. Significance of the crossover pressure in solid supercritical fluid phase-equilibria. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 30, n. 8, p. 1955-1964, 1991.

FRANKEL, E. N. Lipid Oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, p. 1-22, 1980.

\_\_\_\_\_. Lipid oxidation - mechanisms, products and biological significance. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 12, p. 1908-1917, 1984.

\_\_\_\_\_. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 51-55, 1996

GARCIA, D.; ESCALANTE, M.; DELGADO, R.; UBEIRA, F. M.; LEIRO, J. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components vimang and mangiferin. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1203-1208, 2003.

GARCÍA-RISCO, M. R.; HERNÁNDEZ, E. J.; VICENTE, G.; FORNARI, T.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Kinetic study of pilot-scale supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 971-976, 2011.

GARRIDO, G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NUNEZ-SELLES, A. J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang®). **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 143-149, 2004

GAZIANO, J. M. Antioxidants in cardiovascular disease: Randomized trials. **Nutrition**, v. 12, n. 9, p. 583-588, 1996.

GELMEZ, N.; KINCAL, N. S.; YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, n. 3, p. 217-224, 2009.

GERMAN, J. B. Antioxidants. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M., *et al* (Ed.). **Food Additives**. 2. New York, NY: Marcel Dekker, 2002. p.938.

GOFFE, W. L.; FERRIER, G. D.; ROGERS, J. Global optimization of statistical functions with simulated annealing. **Journal of Econometrics**, v. 60, n. 1-2, p. 65-99, 1994.

- GONZALEZ, M.; GONZALEZ, V. Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 1842-1866, 2010.
- GOODRUM, J. W.; KILGO, M. B. Peanut oil extraction with sc-CO<sub>2</sub> - solubility and kinetic functions. **Transactions of the Asae**, v. 30, n. 6, p. 1865-1868, 1987
- GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. **Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 443-451, 1996.
- GÓMEZ-ZALETA, B.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZ-VERGARA, E.; GÜIZADO-RODRÍGUEZ, M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A. UV/vis, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 1002-1009, 2006.
- HALL III, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N., *et al* (Ed.). **Antioxidants in food**. New York, NY: CRC Press, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. New York, NY: Oxford University Press, 2007.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
- HAYES, J. E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 948-955, 2011.
- HE, L.; XU, H.; LIU, X.; HE, W.; YUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC-ABTS(+) assay. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1161-1167, 2011.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ALFAREZ, M. J.; VAZQUEZ, C. The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. **Nutrition**, v. 14, n. 6, p. 513-520, 1998.
- HORTON, A. A.; FAIRHURST, S. Lipid-peroxidation and mechanisms of toxicity. **Crc Critical Reviews in Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 27-79, 1987.

- HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 339-346, 2011.
- HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- IRAKLI, M. N.; SAMANIDOU, V. F.; BILIADERIS, C. G.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, 2012.
- ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants - their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1071-1082, 1986.
- JACOBSEN, C. Understanding and reducing oxidative flavour deterioration in foods. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J., *et al* (Ed.). **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Philadelphia, PA: Woodhead Publishing, v.1, 2010. p.408.
- JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S., *et al* (Ed.). **Food Antioxidants**. New York, NY: Marcel Bekker, 1996. p.487.
- JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., *et al* (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. p.273-398.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.
- JIA, D.; LI, S.; XIAO, L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Plumula nelumbinis oil: Experiments and modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, n. 3, p. 229-234, 2009.
- JOHNSTON, K. P.; ECKERT, C. A. An analytical carnahan-starling-van der waals model for solubility of hydrocarbon solids in supercritical fluids. **Aiche Journal**, v. 27, n. 5, p. 773-779, 1981.
- JOKIC, S.; SVILOVIC, S.; ZEKOVIC, Z.; VIDOVIC, S. Mathematical modelling of soybean oil solubility in supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 1031-1037, 2011.
- KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

- KANDASWAMI, C.; MIDDLETON JR., E. Flavonoids as Antioxidants. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural Antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. Champaign, Illinois, USA: AOCS Press, 1997. cap. 10, p.174-203.
- KEVERS, C.; FALKOWSKI, M.; TABART, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J.; PINCEMAIL, J. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8596-8603, 2007.
- KIM, Y.; LOUNDS-SINGLETON, A. J.; TALCOTT, S. T. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 989-993, 2009.
- KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A. N.; HU, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 203, n. 1-2, p. 1-10, 2000.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. C3, p. 217-233, 2011.
- LAFKA, T.-I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1206-1214, 2007.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas, SP: Átomo, 2009. 382.
- LAROZE, L. E.; DIAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; ELVIRA ZUNIGA, M.; DOMINGUEZ, H. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 5, p. 669-677, 2010.
- LEE, A. K. K.; BULLEY, N. R.; FATTORI, M.; MEISEN, A. Modeling of supercritical carbon-dioxide extraction of canola oilseed in fixed-beds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, n. 7, p. 921-925, 1986.
- LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1361-1371, 2003.
- LING, L. T.; YAP, S.-A.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1154-1159, 2009.
- LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; ZHANG, M.; GAO, Y.; MA, C.; WANG, Z. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2441-2446, 2010.

- MAGALHAES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.
- MARTINEZ, G.; DELGADO, R.; PEREZ, G.; GARRIDO, G.; SELLES, A. J. N.; LEON, O. S. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 424-427, 2000.
- MARTINEZ, J.; MARTINEZ, J. M. Fitting the Sovova's supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool. **Computers & Chemical Engineering**, v. 32, n. 8, p. 1735-1745, 2008.
- MARTINEZ-CORREA, H. A.; CABRAL, F. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; GODOY, A. T.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; PAVIANI, L. C. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, n. 0, p. 31-39, 2012.
- \_\_\_\_\_. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998-1006, 2011.
- Martín, L.; González-Coloma, A.; Díaz, C. E.; Mainar, A. M.; Urieta, J. S. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Persea indica*: Effect of extraction parameters, modelling and bioactivity of its extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, n. 2, p. 120-128, 2011.
- \_\_\_\_\_. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 1, p. 64-71, 2011.
- MATSUSAKA, Y.; KAWABATA, J. Evaluation of Antioxidant Capacity of Non-Edible Parts of Some Selected Tropical Fruits. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n. 5, p. 467-472, 2010.
- MESOMO, M. C.; SCHEER, A. D. P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO<sub>2</sub> and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102-109, 2012.
- MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 986-993, 2012.
- MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I.; SUDHEERKUMAR, M.; UNNIKRISHNAN, M. K.; MOHAN, H. Pulse radiolysis studies of mangiferin: A C-glycosyl xanthone isolated from *Mangifera indica*. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 70-77, 2006.

- MOUAHID, A.; CRAMPON, C.; TOUDJI, S.-A. A.; BADENS, E. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and Modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 77, p. 7-16, 2013.
- MOURA, P. M.; PRADO, G. H. C.; MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 116-122, 2012.
- MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. **Toxicology**, v. 215, n. 1-2, p. 57-68, 2005.
- MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 173-179, 2011.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NANTITANON, W.; YOTSAWIMONWAT, S.; OKONOGLI, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1095-1103, 2010.
- NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography Mass Spectrometric**. New York: Marcel Dekker Inc, 1992.
- OU, B. X.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.
- OZKAL, S. G.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, L. The solubility of apricot kernel oil in supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 399-404, 2006.
- PALACE, V. P.; KHAPER, N.; QIN, Q. I.; SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 5-6, p. 746-761, 1999.
- PALAFIX-CARLOS, H.; YAHIA, E.; ISLAS-OSUNA, M. A.; GUTIERREZ-MARTINEZ, P.; ROBLES-SANCHEZ, M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 7-13, 2012.
- PANDE, G.; AKOH, C. C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1067-1075, 2010.

- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* L'herit. Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 30, n. 2, p. 150-173, 2007.
- PEREIRA, P. J.; COTO, B.; MENDUIÑA, C.; GOMES DE AZEVEDO, E.; NUNES DA PONTE, M. High pressure phase equilibrium for  $\delta$ -tocopherol + CO<sub>2</sub>. **Fluid Phase Equilibria**, v. 216, n. 1, p. 53-57, 2004.
- PIANTINO, C. R.; AQUINO, F. W. B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 209-214, 2008.
- PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.
- \_\_\_\_\_. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 267-273, 2004.
- POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidant. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N., *et al* (Ed.). **Antioxidants in Food: practical applications**. Abington, Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2001.
- POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, n. 3, p. 245-256, 2011.
- PRIOR, R. L.; CAO, G. H.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2686-2693, 1998.
- PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- PROESTOS, C.; KOMALTIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 652-659, 2008.
- PURAVANKARA, D.; BOGHRA, V.; SHARMA, R. S. Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 522-526, 2000.

- RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S., *et al* (Ed.). **Food Antioxidants**. New York, NY: Marcel Dekker, 1996. p.490.
- RAMARATHNAM, N.; OCHI, H.; TAKEUCHI, M. Antioxidant Defense System in Vegetable Extracts. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. Champaign, IL: AOC Press, 1997. p.414.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006.
- REVERCHON, E.; DONSI, G.; OSSEO, L. S. Modeling of supercritical-fluid extraction from herbaceous matrices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 11, p. 2721-2726, 1993.
- RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G.; ESQUIVEL, M. M. Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, n. 1, p. 51-60, 2001.
- RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNOEDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.
- RODRIGUEZ, J.; DI PIERRO, D.; GIOIA, M.; MONACO, S.; DELGADO, R.; COLETTA, M.; MARINI, S. Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1333-1342, 2006.
- RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 98-103, 2012.
- 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, n. 1-2, p. 235-240, 2005.
- RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203-210, 2007.
- SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; SILVA, C. M.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, n. 0, p. 71-79, 2012.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

- SCHIEBER, A.; ULLRICH, W.; CARLE, R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 161-166, 2000.
- SELLES, A. J. N.; CASTRO, H. T. V.; AGUERO-AGUERO, J.; GONZALEZ-GONZALEZ, J.; NADDEO, F.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, 2002.
- SERRA, A. T.; SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BRONZE, M. R.; DE SOUSA, H. C.; DUARTE, C. M. M. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 184-191, 2010.
- SHAHIDI, F. Natural Antioxidants: An Overview. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997. cap. Natural Antioxidants: An Overview, p.414.
- SHI, L.-E.; ZHANG, Z.-L.; XING, L.-Y.; YANG, D.-D.; GUO, Y.-P.; GUO, X.-F.; ZHAO, L.-M.; TANG, Z.-X. Antioxidants extraction by supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 3, p. 300-308, 2011.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; SINGH, S.; MEHTA, P.; VYAS, S. P. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1848-1851, 2009.
- SILVA, D. C. M. N.; BRESCIANI, L. F. V.; DALAGNOL, R. L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 4, p. 317-326, 2009.
- SIMS, R. J.; FIORITI, J. A. Methional as an antioxidant for vegetable-oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 54, n. 1, p. 4-7, 1977.
- SINGH, Z.; SINGH, S. P. Mango. In: REES, D.; FARRELL, G., *et al* (Ed.). **Crop Post-Harvest: Science and Technology**: Blackwell Publishing Ltd, 2012. cap. 6, p.108-142.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants, Pt A**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SKIBSTED, L. H. Understanding oxidation process in foods. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J., *et al* (Ed.). **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Philadelphia, PA: Woodhead Publishing, v.1, 2010. p.408.

- SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 524-530, 2006.
- SOVOVÁ, H. Rate of the Vegetable Oil Extraction With Supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modelling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.
- SPIGNO, G.; TRARNELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.
- SULAIMAN, S. F.; SAJAK, A. A. B.; OOI, K. L.; SUPRIATNO; SEOW, E. M. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 506-515, 2011.
- SULTANA, B.; HUSSAIN, Z.; ASIF, M.; MUNIR, A. Investigation on the Antioxidant Activity of Leaves, Peels, Stems Bark, and Kernel of Mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. C849-C852, 2012.
- TAN, C. S.; LIOU, D. C. Modeling of desorption at supercritical conditions. **Aiche Journal**, v. 35, n. 6, p. 1029-1031, 1989.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.
- VANESCH, G. J. Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ). **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1063-1065, 1986.
- VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 2, p. 246-254, 2009.
- VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.
- WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.
- WIJEKOON, M. M. J. O.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 615-619, 2011.

- WILLIAMS, D. F. Extraction with supercritical gases. **Chemical Engineering Science**, v. 36, n. 11, p. 1769-1788, 1981.
- WU, N.; FU, K.; FU, Y. J.; ZU, Y. G.; CHANG, F. R.; CHEN, Y. H.; LIU, X. L.; KONG, Y.; LIU, W.; GU, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of *Pigeonpea cajanus cajan* (L.) Millsp. leaves. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1032-1043, 2009.
- YAM, M. F.; ANG, L. F.; AMEER, O. Z.; SALMAN, I. M.; AZIZ, H. A.; ASMAWI, M. Z. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Elephantopus tomentosus* Ethanolic Extract. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 2, n. 4, p. 280-287, 2009.
- YANG, H.; GE, Y.; SUN, Y.; LIU, D.; YE, X.; WU, D. Identification and characterisation of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, 2011.
- YOSHIMI, N.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; QIAO, Z.; HARA, A.; YAMAHARA, J.; MORI, H. The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. **Cancer Letters**, v. 163, n. 2, p. 163-170, 2001.
- ČAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M.; ŠOLIĆ, M. E.; JERKOVIĆ-MUJKIĆ, A.; BEŠTA, R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 648-653, 2008.