

Simone Mazzutti

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM IMPORTÂNCIA
BIOLÓGICA PROVENIENTES DE *Plantago major* E *Plantago
lanceolata* ATRAVÉS DE TÉCNICAS AMBIENTALMENTE
SEGURAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Dra. Sandra R.S. Ferreira
Coorientadora: Dra. Elena Ibáñez Ezequiel

Florianópolis – SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mazzutti, Simone

Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras / Simone Mazzutti ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira ; coorientadora, Elena Ezequiel Ibáñez. - Florianópolis, SC, 2016.

168 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração supercrítica. 3. Extração com água subcrítica. 4. Atividade antioxidante. 5. Espécies de *Plantago*. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Ibáñez, Elena Ezequiel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

De nuestros miedos nacen nuestros corajes
y en nuestras dudas viven nuestras certezas.
Los sueños anuncian otra realidad posible
y los delirios otra razón.
En los extravíos nos esperan hallazgos,
porque es preciso perderse para volver a encontrarse.

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Do fundo do meu coração agradeço a todos que me desejaram as melhores energias ao longo desses 4 anos e que me apoiaram para eu chegar a essa etapa! Foram inúmeros os aprendizados e os desafios envolvidos durante o decorrer do doutorado e que me fizeram compreender um pouquinho mais do grande mistério que a vida é!

Agradeço a minha mãe, pai e irmã que estiveram sempre ao meu lado, mesmo quando foi necessário cruzar um oceano.

Agradeço aos meus amigos, que para a minha alegria são muitos. Com tantos os caminhos desse mundo, sou muito grata por nossas vidas terem se cruzado. Com certeza, muito do que sou hoje é resultado dessas relações que construí ao longo do tempo.

Agradeço a Sandra, minha orientadora, que compartilhou seu conhecimento e tempo comigo.

Agradeço a Capes que me proporcionou a oportunidade de realizar esse doutorado e fazer uma parte dele na Espanha. Foram muitos os aprendizados envolvidos durante esse tempo fora do país.

Agradeço a todo o grupo de pesquisa do Laboratório Foodomics, coordenado pela professora Elena e o professor Alejandro, com os quais aprendi muito.

Agradeço a todos do Laboratório LATESC, que com sua presença tornam o ambiente de trabalho um local agradável, que compartilham seus conhecimentos e que se fazem companheiros para todas as horas.

Agradeço a todas as possibilidades e desafios que surgem a partir de agora, o que torna o mundo verdadeiramente interessante.

RESUMO

A *Plantago major* e a *Plantago lanceolata* têm sido utilizadas como ervas medicinais em distintas partes do mundo durante séculos. As propriedades terapêuticas apresentadas por essas plantas vêm sendo relacionadas a diversas classes de compostos bioativos, os quais podem ser obtidos por diferentes métodos de extração. O objetivo deste trabalho foi obter extratos bioativos de *P. major* e *P. lanceolata* através da aplicação de técnicas convencionais e técnicas avançadas de extração. Na primeira parte do trabalho, a extração supercrítica (ESC) com dióxido de carbono com e sem cossolvente foi comparada a métodos a baixa pressão, como Soxhlet e ultrassom com diferentes solventes, em termos de rendimento de extração e atividade antioxidante e antimicrobiana. Para a *P. major*, as condições avaliadas na ESC variaram de 40 a 60 °C e pressões entre 10 e 30 MPa e para a *P. lanceolata* as condições foram 50 e 60 °C e 20 e 30 MPa. O uso de etanol e metanol como cossolvente em diferentes frações (0; 2,5; 5 e 10%) também foi avaliado. Os maiores rendimentos de extração foram obtidos por ultrassom utilizando solventes mais polares, sendo de 20,5% para a *P. major* e 23,1% para a *P. lanceolata*. O teor de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método do radical DPPH e método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico. De maneira geral, o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram maiores em extratos obtidos solvente polares. A capacidade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória frente a *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Os extratos obtidos por ESC de *P. major* (10 MPa/40 °C) e *P. lanceolata* (20 MPa/60 °C) apresentaram concentrações mínimas inibitórias para *B. cereus* de 15,62 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A análise dos extratos por cromatografia gasosa revelou a presença dos ácidos α -linolênico e palmítico e do α -sitosterol. Na segunda etapa do trabalho, água foi empregada como solvente nos processos de extração com líquidos pressurizados (PLE) e por extração assistida com micro-ondas (MAE). As extrações em PLE foram realizadas de forma individual e sequencial nas temperaturas entre 25 e 200 °C e as extrações em MAE em temperaturas entre 50 e 200 °C. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH e ABTS. O rendimento, a quantidade de compostos fenólicos e a atividade

antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foram máximos quando empregada água a 200 °C em ambas as técnicas avaliadas, sendo superiores aos resultados obtidos por ESC. A análise cromatográfica dos extratos revelou a presença do verbascosídeo e da plantamajoside, compostos que podem estar relacionados ao alto atividade antioxidante desses extratos.

Palavras chaves: *Plantago major*; *Plantago lanceolata*; extração supercrítica; extração com água subcrítica.

ABSTRACT

The *Plantago major* and *Plantago lanceolata* have been used as medicinal herbs in different parts of the world for centuries. The therapeutic properties of *Plantago* species have been related to various classes of bioactive compounds, which can be obtained by different extraction methods. The objective of this study was to obtain bioactive extracts from the *P. major* and *P. lanceolata* using conventional and advanced extraction techniques. In the first part of this work, the supercritical extraction (ESC) with carbon dioxide with and without co-solvent has been compared to the low-pressure methods such as Soxhlet and ultrasound with different organic solvents in terms of extraction yield and antioxidant and antimicrobial activity. For *P. major*, the conditions evaluated in the ESC were temperatures from 40 to 60 °C and pressures from 10 to 30 MPa; for *P. lanceolata*, the conditions were 50 and 60 °C and 20 and 30 MPa. The use of ethanol and methanol as co-solvent in different fractions (0; 2.5; 5 and 10%) was also evaluated. The highest yield were obtained using ultrasound and polar solvents, with 20.5% for *P. major* and 23.1% for *P. lanceolata*. Total phenol content was evaluated by the Folin-Ciocalteu. The potential antioxidant was evaluated by DPPH method and β -carotene/linoleic acid system. In general, the content of phenolic compounds and antioxidant activity was higher in extracts obtained with polar solvent. Antimicrobial activity was evaluated by minimum inhibitory concentration against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The extracts obtained by ESC of *P. major* (ESC 20 MPa/40° C) and *P. lanceolata* (ESC 20 MPa/60 °C) showed values of minimal inhibitory concentration for *B. cereus* of 15.62 and 31.25 mg/mL, respectively. Gas chromatography analysis of the extracts revealed the presence of α -linolenic and palmitic acids and α -sitosterol. In the second part of this work, water was used as a solvent in the extraction process with pressurized liquids (PLE) and microwave-assisted extraction (MAE). The PLE extractions were performed individually and sequentially at temperatures between 25 and 200 °C and the MAE extractions at temperatures between 50 and 200 °C. The antioxidant capacity was evaluated by DPPH and ABTS methods. The yield, the amount of phenolic compounds and the antioxidant activity of the extracts of *P. major* and *P. lanceolata* obtained by PLE and MAE were higher employed water at 200 °C, being higher than the results obtained by ESC.

Chromatographic analysis of the extracts revealed the presence of verbascoside and plantamajoside, compounds that may be related to antioxidant activity of the extracts.

Keywords: *Plantago major*; *Plantago lanceolata*; supercritical extraction; subcritical water extraction.

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	23
INTRODUÇÃO	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo geral.....	26
1.1.2 Objetivos específicos	26
Capítulo 2.....	27
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1. O GÊNERO <i>Plantago</i> L. (PLANTAGINÁCEA).....	28
1.1 <i>Plantago major</i>	29
1.1.1 Usos medicinais	30
1.2 <i>Plantago lanceolata</i>	31
1.2.1 Usos medicinais	33
1.3 Compostos bioativos de plantas do gênero <i>Plantago</i>	34
2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	36
1.4 Atividade antioxidante	38
1.5 Atividade antimicrobiana	39
3. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	40
Capítulo 3.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
2.1. Extração com solventes orgânicos.....	43
2.1.1. Soxhlet.....	44
2.1.2. Extração assistida por ultrassom	45
2.2. Extração com fluidos supercríticos (ESC).....	46
2.2.1. Procedimento de extração	47
2.2.2. Curvas globais de extração.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1. Amostras.....	50
3.1.1. <i>Plantago major</i>	50
3.1.2. <i>Plantago lanceolata</i>	51
3.1.3. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis.....	51
3.1.4. Determinação do diâmetro médio de partícula.....	52
3.1.5. Determinação da massa específica real	52
3.1.6. Caracterização do leito de partículas	53

3.2. Extração com solventes orgânicos	53
3.2.1. Extração Soxhlet.....	53
3.2.2. Extração assistida por ultrassom.....	54
3.3. Extração com fluidos supercríticos	55
3.3.1. Unidade de extração supercrítica.....	55
3.3.2. Procedimento experimental	57
3.3.3. Determinação da cinética de extração	57
3.3.4. Determinação do rendimento de extração	58
3.3.5. Emprego de cossolvente	60
3.4. Determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante.....	60
3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	61
3.4.2. Método do radical DPPH.....	62
3.4.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico	62
3.5. Determinação do atividade antimicrobiano	63
3.5.1. Teste de difusão em ágar	63
3.5.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	64
3.6. Caracterização por CG-EM.....	64
3.7. Análise estatística.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1. Determinação do rendimento global de extração (X_0).....	65
4.1.1. Extração com solventes orgânicos.....	65
4.1.2. Extração com solvente supercrítico	68
4.1.2.1. Caracterização do leite de extração	68
4.1.2.2. Determinação da cinética de extração	69
4.1.2.3. Rendimento de extração	72
4.1.2.4. Emprego de cossolvente	75
4.2. Teor de compostos fenólicos totais (TFT)	78
4.3. Avaliação da atividade antioxidante	82
4.3.1. Método do radical DPPH.....	82
4.3.2. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico	86
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	90
4.5. Caracterização química dos extratos por CG-EM.....	95
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
Capítulo 4.....	101
1. INTRODUÇÃO	102

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	103
2.1. Extração com água subcrítica (SWE)	103
2.1.1. Constante dielétrica da água (ϵ)	105
2.1.2. Processo de extração	107
2.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE).....	109
2.2.1. Processo de extração com água	110
2.3. Remoção da água presente nos extratos	111
3. MATERIAL E MÉTODOS	111
3.1. Amostras.....	111
3.2. Extração com água pressurizada (PLE)	112
3.3. Extração assistida com micro-ondas (MAE)	113
3.4. Determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante.....	114
3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais	114
3.4.2. Método do radical ABTS	115
3.4.3. Método do radical DPPH	116
3.5. Caracterização por HPLC	116
3.6. Análise estatística	117
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
4.1. Efeito da temperatura no rendimento de extração	117
4.2. Efeito da temperatura no conteúdo de fenólicos totais	119
4.3. Efeito da temperatura na atividade antioxidante.....	123
4.4. Caracterização química dos extratos por HPLC	125
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
Capítulo 5.....	137
1. INTRODUÇÃO.....	138
2. Efeito das técnicas de extração no rendimento global de extração.....	138
3. Efeito das técnicas de extração no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante	140
4. Visão global dos processos.....	144
Capítulo 6.....	147
1. CONCLUSÃO GERAL.....	148
2. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	150
REFERÊNCIAS.....	151
APÊNDICES.....	171

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Plantago major</i>	30
Figura 2. <i>Plantago lanceolata</i>	32
Figura 3. Estrutura de alguns compostos com atividade biológica de plantas do gênero <i>Plantago</i>	34
Figura 4. Esquema básico para a avaliação de compostos bioativos de plantas.	37
Figura 5. Fluxograma simplificado do processo de ESC	48
Figura 6. Exemplo de uma curva de extração.	49
Figura 7. Foto da amostra de <i>Plantago major</i> utilizada nos experimentos.	50
Figura 8. Foto da amostra de <i>P. lanceolata</i> utilizada nos experimentos	51
Figura 9. Diagrama da unidade de extração	56
Figura 10. Curvas de extração com fluido supercrítico de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i> a 20 MPa, 50 °C e 8 ± 2 g min ⁻¹ de CO ₂ . 70	
Figura 11. Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC de <i>Plantago major</i>	74
Figura 12. Rendimentos globais (X ₀) para os extratos de <i>Plantago major</i> utilizando etanol e metanol como cossolventes a 30 MPa, 50 °C e vazão de 8 ± 2 g min ⁻¹	77
Figura 13. Rendimentos globais (X ₀) para os extratos de <i>Plantago lanceolata</i> utilizando etanol como cossolvente a 20 MPa, 60 °C e vazão de 8 ± 2 g min ⁻¹	77
Figura 14. Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico, para os extratos de <i>Plantago lanceolata</i> utilizando etanol como cossolvente a 60 °C e 20 MPa.	81
Figura 15. Atividade antioxidante dos extratos de ESC a 60 °C e 20 MPa com cossolvente de <i>Plantago lanceolata</i> através do método DPPH, expressos através do EC ₅₀	86
Figura 16. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Plantago lanceolata</i> obtidos com ESC a 60 °C e 200 MPa com cossolvente através do método descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.	89
Figura 17. Placa de teste apresentando ausência de halos de inibição para soluções de DMSO até 60 % para <i>B. cereus</i>	91

Figura 18. Placa de teste apresentando presença de halos de inibição para solução de antibiótico cloranfenicol.....	92
Figura 19. Diagrama de fases da água com função da temperatura e pressão.	104
Figura 20. Constante dielétrica da água em função da temperatura e do dióxido de carbono supercrítico.	106
Figura 21. Processo de extração acelerada por solvente.	108
Figura 22. Extração assistida por micro-ondas em sistemas fechados.	111
Figura 23. Foto do equipamento de extração com líquidos pressurizados (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, EUA).....	113
Figura 24. Foto do equipamento de extração assistida por micro-ondas (Monowave™ 300, Anton Paar).....	114
Figura 25. Rendimento de extração (%) dos experimentos sequenciais com PLE de espécies de <i>Plantago</i> . (A) = <i>P. major</i> ; (B) = <i>P. lanceolata</i>	120
Figura 26. Conteúdo de compostos fenólicos totais dos experimentos sequenciais com PLE de espécies de <i>Plantago</i>	122
Figura 27. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Plantago lanceolata</i> obtido com água subcrítica a 200 °C (320 nm).....	126
Figura 28. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Plantago major</i> obtido com água subcrítica a 200 °C (320 nm).....	126
Figura 29. Verbascosídeo (a), isoverbascosídeo (b) e plantamajoside (c).....	129
Figura 30. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Plantago lanceolata</i> obtido com água na extração assistida por micro-ondas a 200 °C (320 nm).....	130
Figura 31. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Plantago major</i> obtido com água na extração assistida por micro-ondas a 200 °C (320 nm)....	130
Figura 32. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Plantago major</i> obtido nas extrações sequenciais com PLE (320 nm).	134
Figura 33. Rendimento global de extração de <i>P. major</i> (a) e <i>P. lanceolata</i> (b) por diferentes técnicas de extração.	139
Figura 34. Teor de fenólicos totais (TFT) dos extratos de <i>P. major</i> (a) e <i>P. lanceolata</i> (b) obtidos por diferentes técnicas de extração.....	141
Figura 35. Atividade antioxidante dos extratos de <i>P. major</i> (a) e <i>P. lanceolata</i> (b) obtidos por diferentes técnicas de extração através do	

método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.	142
Figura 36. Atividade antioxidante dos extratos de <i>P. major</i> (a) e <i>P. lanceolata</i> (b) obtidos pelo método DPPH, expressos em termos de EC_{50}	143
Figura 37. Comparativo das técnicas de extração para <i>P. major</i>	145
Figura 38. Comparativo das técnicas de extração para <i>P. lanceolata</i>	146
Figura 39. Curva analítica de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de <i>P. major</i> e <i>P. lanceolata</i> do Capítulo 3.	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas descritas para a <i>Plantago major</i>	31
Tabela 2. Atividades biológicas descritas para a <i>Plantago lanceolata</i>	33
Tabela 3. Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet.....	54
Tabela 4. Planejamento experimental fatorial completo 3^2 com a temperatura (T) e a pressão (P), variando em três níveis para a <i>Plantago major</i>	59
Tabela 5. Planejamento experimental para a <i>Plantago lanceolata</i>	60
Tabela 6. Rendimento globais (X_0) obtidos para as extrações com solventes orgânicos de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i>	66
Tabela 7. Caracterização do leito de extração de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i>	68
Tabela 8. Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico de <i>Plantago major</i> (PM) e <i>Plantago lanceolata</i> (PL) a 20 MPa, 50 °C e $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2	71
Tabela 9. Rendimento globais (X_0) obtidos por extração supercrítica de <i>Plantago major</i> e <i>P. lanceolata</i> em diferentes condições de temperatura e pressão.....	73
Tabela 10. Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i>	79
Tabela 11. Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico, para os extratos de <i>Plantago major</i> obtidos por extração supercrítica com cossolvente a 30 MPa e 50 °C.....	81
Tabela 12. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Plantago major</i> e <i>P. lanceolata</i> através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC_{50}).....	83
Tabela 13. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Plantago major</i> obtidos por ESC a 30 MPa e 50 °C com cossolvente através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC_{50}).....	84
Tabela 14. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i> através do método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.	87
Tabela 15. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Plantago major</i> obtidos com ESC a 30 MPa e 50 °C com cossolvente através do método	

descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.	88
Tabela 16. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>Plantago major</i> contra <i>Bacillus cereus</i> e <i>Escherichia coli</i>	93
Tabela 17. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de <i>Plantago lanceolata</i> contra <i>Bacillus cereus</i> e <i>Escherichia coli</i>	94
Tabela 18. Compostos identificados nos extratos de <i>P. major</i> avaliados por CG-EM.....	96
Tabela 19. Compostos identificados nos extratos de <i>P. lanceolata</i> avaliados por CG-EM.....	97
Tabela 20. Constantes dielétricas (ϵ) de diferentes substâncias determinada a 25 °C.	107
Tabela 21. Fator de perda dielétrica ($\tan \delta$) de alguns solventes químicos (20 °C e 2,45GHz).	110
Tabela 22. Rendimentos de extração (%) dos extratos de <i>P. major</i> e <i>P. lanceolata</i> obtidos por extração com água pressurizada (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).....	118
Tabela 23. Teor de fenólicos totais dos extratos de <i>P. major</i> e <i>P. lanceolata</i> obtidos por extração com água pressurizada (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).....	121
Tabela 24. Atividade antioxidante dos extratos de <i>P. major</i> e <i>P. lanceolata</i> determinado pelos métodos dos radicais ABTS e DPPH. .	124
Tabela 25. Atividade antioxidante dos extratos de <i>P. major</i> e <i>P. lanceolata</i> obtidos nos experimentos sequenciais com PLE determinado pelos métodos dos radicais ABTS e DPPH.....	125
Tabela 26. Principais íons identificados por HPLC-DAD-MS dos extratos das espécies de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i> obtidos com água subcrítica a 100, 150 e 200 °C e suas sugeridas estruturas. .	127
Tabela 27. Íons identificados por HPLC-DAD-MS dos extratos de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i> obtidos na extração assistida por micro-ondas a 200 °C e suas sugeridas estruturas.....	130
Tabela 28. Quantificação dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside dos extratos de <i>Plantago major</i> e <i>Plantago lanceolata</i> obtidos por PLE e MAE.....	131

Tabela 29. Quantificação dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside dos extratos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* obtidos nas extrações sequencias por PLE.132

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A busca por compostos bioativos naturais para o tratamento e prevenção de doenças humanas, bem como com potencial tecnológico para aplicação na indústria de alimentos, fármacos e cosmética é um tema importante em muitos laboratórios e indústrias. Quando se deseja obter substâncias ativas de plantas, uma estratégia que pode ser adotada é observar as informações oriundas da medicina popular.

As plantas do gênero *Plantago*, especialmente a *P. major* e *P. lanceolata*, têm sido usadas desde os tempos antigos como um recurso da medicina alternativa. Essas plantas são globalmente distribuídas e vegetam espontaneamente em áreas de pastagens, terrenos cultivados, locais úmidos e sombreados, do nível do mar até altitudes de 3300 m, sendo que em alguns casos são consideradas invasoras de culturas. No Brasil essas plantas são facilmente encontradas, sendo popularmente conhecidas como tansagem (*P. major*) e carrijó ou língua-de-ovelha (*P. lanceolata*) (GONÇALVES; ROMANO, 2016; KARTINI et al., 2014; SAMUELSEN, 2000).

O chá da *P. major* e *P. lanceolata* é comumente utilizado como depurativo, diurético, antibacteriano, regulador intestinal e para tosse, bronquites, dor de estômago, diarreia e disenteria. Em gargarejos as folhas de *Plantago* são indicadas para combater dor e inflamação da garganta. As folhas frescas maceradas possuem propriedades cicatrizantes, sendo úteis contra picadas de insetos, irritações da pele, úlceras, queimaduras e pequenos cortes (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008; CHÁECIA, 2015). As folhas dessa planta também podem ser consumidas em saladas e sopas, enquanto as sementes são utilizadas na produção de pães e bolos (ZHOU et al., 2013).

Dentre os métodos tradicionalmente usados pela indústria para a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais está a extração com solventes orgânicos. Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica -LATESC do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina é baseada na aplicação do dióxido de carbono supercrítico na obtenção de compostos bioativos como uma alternativa aos métodos tradicionais de extração. O interesse da comunidade científica pela extração supercrítica tem sido impulsionado pela grande versatilidade de dióxido de carbono (solvente mais utilizado),

cujas propriedades podem ser ajustadas a fim de proporcionar extratos com composições desejáveis, e ao mesmo tempo, garantem um processo de separação inócuo tanto para a saúde humana como para o meio ambiente.

O presente documento está dividido em seis capítulos. No Capítulo 2 pode se encontrar uma revisão bibliográfica sobre a *P. major* e a *P. lanceolata*, que são as matérias-primas selecionadas para esse estudo. Além disso, apresenta uma breve descrição do processo de obtenção de compostos bioativos e dos métodos *in vitro* utilizados para a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiano.

No Capítulo 3 estão descritas as técnicas tradicionais de extração com solventes orgânicos (Soxhlet e extração assistida com ultrassom) e a extração supercrítica com dióxido de carbono. Nesse Capítulo se desenvolveu um plano de trabalho em que se objetivou comparar as extrações de *P. major* e *P. lanceolata* realizadas com solventes orgânicos (Soxhlet e extração assistida por ultrassom) e solvente supercrítico quanto ao rendimento de extração. Além disso, procedeu-se à caracterização funcional dos extratos obtidos em todos os métodos, sendo determinada a capacidade antioxidante e antimicrobiana através da utilização de ensaios *in vitro* e caracterização química por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos no Capítulo 3 levaram a seleção de outras técnicas de extração ambientalmente amigáveis utilizadas no Capítulo 4.

No Capítulo 4, água foi empregada como solvente de extração, sendo que este é o primeiro trabalho do LATESC nessa linha de pesquisa. Nesse capítulo, uma breve revisão sobre a extração com água subcrítica e a extração assistida com micro-ondas é apresentada. O plano de trabalho desenvolvido no Capítulo 4 teve como objetivo comparar as extrações de *P. major* e *P. lanceolata* realizadas com água subcrítica e extração assistida com micro-ondas. Os extratos foram caracterizados quanto a atividade antioxidante através da utilização de ensaios *in vitro* e também pela caracterização química pelo uso do método HPLC-DAD, buscando correlacionar a presença de certos compostos bioativos com a capacidade antioxidante.

No Capítulo 5 fez-se a comparação de todas as técnicas de extração estudadas quanto a rendimento e atividade antioxidante. Finalmente, no Capítulo 6 estão descritas as conclusões derivadas dos Capítulos 3, 4 e 5 e as perspectivas de trabalhos futuros.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi obter extratos bioativos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através da aplicação de técnicas compatíveis com o conceito de química verde de extração.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a obtenção de extratos de *P. major* e *P. lanceolata* por meio do emprego da extração em Soxhlet e assistida por ultrassom utilizando diferentes solventes orgânicos;

b) Avaliar a extração supercrítica de *P. major* e *P. lanceolata* em diferentes condições de pressão, temperatura e fração de cossolvente;

c) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos por Soxhlet, ultrassom e ESC de *P. major* e *P. lanceolata* por meio da aplicação dos testes *in vitro*: teor de compostos fenólicos totais, radical DPPH e descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico;

d) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por Soxhlet, ultrassom e ESC de *P. major* e *P. lanceolata* frente às bactérias *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*;

e) Selecionar e avaliar extratos por CG-EM, buscando correlacionar bioatividade e composição;

f) Avaliar a extração de *P. major* e *P. lanceolata* empregando água subcrítica como solvente em diferentes temperaturas;

g) Avaliar a extração de *P. major* e *P. lanceolata* assistida por micro-ondas em diferentes temperaturas;

h) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos com água subcrítica e extração assistida por micro-ondas por meio da aplicação dos testes *in vitro*: teor de compostos fenólicos totais, radical DPPH e radical ABTS; e caracterizar quimicamente os extratos, buscando correlacionar bioatividade e composição.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. O GÊNERO *Plantago* L. (PLANTAGINÁCEA)

O gênero *Plantago* compreende cerca de 275 espécies, amplamente distribuídas no mundo, especialmente em regiões temperadas. No Brasil, ocorrem aproximadamente 16 espécies, principalmente em áreas elevadas das regiões Sul e Sudeste, sendo apenas nove nativas (GONÇALVES; ROMANO, 2016; HEFLER; RODRIGUES; CERVI, 2011; WERYSZKO-CHMIELEWSKA et al., 2012).

As plantas do gênero *Plantago* são popularmente conhecidas como ervas medicinais desde os tempos antigos, sendo utilizadas para problemas relacionados com os órgãos digestivos e respiratórios, doenças infecciosas e da pele e para o alívio da dor. Além disso, estudos publicados na literatura indicam que certas espécies de *Plantago* apresentam efeito citotóxico significativo em linhagens de células tumorais (GÁLVEZ et al., 2005) e atividades antiviral (CHIANG et al., 2002), antioxidante (GÁLVEZ et al., 2003; HEIMLER et al., 2007), anti-inflamatória (SAMUELSEN, 2000), analgésica (NÚÑEZ GUILLÉN et al., 1997) e antiespasmódica (FLEER; VERSPOHL, 2007).

Várias indústrias fitoterápicas da Indonésia comercializam formulações farmacêuticas modernas produzidas de folhas de *P. major* (KARTINI et al., 2014). Além de seu uso como erva medicinal, algumas espécies de *Plantago* também são utilizadas na alimentação humana. Normalmente, as folhas são consumidas como saladas frescas ou utilizadas na elaboração de sopas. As sementes de algumas espécies podem ser cozidas, ou moídas e adicionadas na elaboração de pães e bolos (BEARA et al., 2012; GONÇALVES; ROMANO, 2016; HEIMLER et al., 2007).

As plantas do gênero *Plantago* são cada vez mais utilizadas como ingredientes de rações animais. Os efeitos positivos dessas plantas no organismo animal consistem na melhoria do sabor e cheiro da ração, regulação das funções digestivas, aumento da resistência a infecções dos animais e melhoria das características da carne e da gordura (WERYSZKO-CHMIELEWSKA et al., 2012).

As folhas e sementes de plantas do gênero *Plantago* também são utilizadas pela indústria cosmética. O suco fresco e infusões aquosas estabilizadas de *P. lanceolata* e *P. major* são utilizadas para o preparo de cosméticos, com funções antissépticas, antibacterianas e adstringentes. O

extrato das folhas de *P. lanceolata* é utilizado para produzir diferentes produtos cosméticos, como cremes, loções e máscaras para peles oleosas e acne (WERYSZKO-CHMIELEWSKA et al., 2012).

Dentro do gênero *Plantago*, a espécie mais renomada, usada tanto na medicina tradicional como na medicina moderna é a *P. major* L. (SAMUELSEN, 2000). No entanto, outras espécies vêm sendo investigadas e os estudos publicados indicam um alto potencial dessas plantas como fonte de compostos biologicamente ativos. Apesar disso, a maioria das espécies de *Plantago* não foi descrita até o momento em termos de composição fitoquímica e atividade biológica (BEARA et al., 2012).

1.1 *Plantago major*

As folhas da *P. major* têm sido utilizadas durante séculos em diversas culturas ao redor do mundo. O médico grego Dioscorides descreveu em “De matéria médica” o uso de folhas de *P. major* para cicatrização de feridas no século I. As folhas também eram prescritas para o tratamento de mordidas de cachorro (SAMUELSEN, 2000). A capacidade de cicatrização de feridas da *P. major* foi mencionada pelo autor islâmico Ibn El Beithar nos séculos XII e XIII (FLEURENTIN; MAZARS; FELT, 1983). Os Vikings utilizavam as folhas de *P. major* para fins de cicatrização de feridas e o povo norueguês e sueco chamavam esta planta de “*groblad*”, que significa “folhas de cura”. As folhas de *P. major* foram usadas no tempo de Shakespeare, sendo mencionadas em “Romeu e Julieta”, Ato I, Cena II (SAMUELSEN, 2000).

A *P. major*, pertencente à família Plantaginácea, é uma planta herbácea nativa da Europa e da Ásia que atualmente encontra-se distribuída pelo mundo em regiões subtropicais com clima temperado (WHO, 2010). A planta é vivaz, bianual ou perene, acaule, ereta e cresce entre 20 e 30 cm de altura, podendo variar de acordo com a região de cultivo. As folhas são dispostas em roseta basal, ovaladas ou elípticas, com margens irregulares (Figura 1). As flores são pequenas, dispostas em inflorescência espigada ereta e coloração variando de marrom a verde. As sementes possuem formato ovalado e sabor ligeiramente amargo. O endosperma da semente tem paredes espessas, altamente celulósicas, e lúmen celular cheio de óleo e proteína (HARRI LORENZI; MATOS, 2002; SAMUELSEN, 2000).

No Brasil, a *P. major* é facilmente cultivada, sendo conhecida popularmente por tansagem, transagem e tanchagem. A sua utilização como fitoterápico é reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo seu uso indicado como anti-inflamatório e antisséptico da cavidade oral (ANVISA, 2011). Além disso, esta espécie compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde – RENISUS (SUS, 2014).

Figura 1 - *Plantago major*



Fonte: Wikimedia, 2015.

1.1.1 Usos medicinais

A *P. major* é matéria prima para a produção de medicamentos e cosméticos comercializados em diversos países. No entanto, essa planta é utilizada especialmente como um medicamento caseiro. As formas mais comuns de preparo são infusão e maceração das folhas para aplicação diretamente na pele (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008). A planta é

empregada como expectorante, cicatrizante, adstringente, emoliente, depurativa do sangue; antidiarreica, além de utilizada em inflamações bucofaríngeas, dérmicas, gastrintestinais e das vias urinárias. Em gargarejos a *P. major* é usada contra inflamações da garganta, anginas e gengivas sangrentas (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008; SAMUELSEN, 2000).

As propriedades medicinais da *P. major* despertaram o interesse de diversos pesquisadores em muitos países. Os extratos obtidos dessa matéria prima foram testados frente a diversas atividades biológicas. A maioria dos testes tem sido realizada utilizando extratos brutos sem a devida identificação dos compostos biologicamente ativos (SAMUELSEN, 2000). A Tabela 1 apresenta alguns desses resultados.

Tabela 1 - Atividades biológicas descritas para a *Plantago major*

Atividade biológica	Autores
Atividade antioxidante	Beara et al., 2009; Stanisavljevic et al., 2008
Atividade anti-inflamatória	Türel et al., 2009
Atividade antimicrobiana	Metiner, 2012
Atividade antifúngica	Mccutcheon et al., 1994
Atividade antimalárica	Weenen et al., 1990
Atividade antiviral	Chiang et al., 2002
Atividade analgésica	Núñez Guillén et al., 1997
Atividade moduladora	Chiang et al., 2003
Atividade anticâncer	Kobeasy; El-Salam, 2011
Atividade hepatoprotetora	Türel et al., 2009
Efeito antidepressivo	Xu et al., 2004
Efeito anti-hipertensivo	Nhiem et al., 2011
Efeito hipotensivo	Schmeda-Hirschmann et al., 1992
Efeito hiperglicêmico	Rodriguez et al., 1994
Efeito diurético	Doan et al., 1992

1.2 *Plantago lanceolata*

As propriedades medicinais da *P. lanceolata* são conhecidas há muito tempo, sendo que essa espécie já era usada na há China a 3000 anos. Na antiga Roma, Plínio, o Velho, recomendava essa planta como

um medicamento para 24 doenças. Na Itália, a resina de *P. lanceolata* foi usada como incenso em rituais da igreja. As inflorescências desta espécie eram misturadas com caules de outras plantas para produzir incensos que depois eram queimados para perfumar roupas e quartos (WERYSZKO-CHMIELEWSKA et al., 2012).

A *P. lanceolata* (Figura 2) é uma planta herbácea nativa da Europa e da Ásia que atualmente encontra-se distribuída pelo mundo. Na região Sul do Brasil ocorre no Rio Grande do Sul (especialmente leste do planalto rio-grandense) e Paraná. No Brasil, a *P. lanceolata* é conhecida popularmente como carrijó, língua-de-ovelha, tanchagem, tanchagem rasura e tanchagem-menor (HEFLER; RODRIGUES; CERVI, 2011).

Figura 2 - *Plantago lanceolata*



Fonte: Africa Museum, 2015.

A *P. lanceolata* cresce em solos úmidos, férteis, arenosos, pedregosos e pode em alguns casos ser considerada uma cultura invasora. A planta é perene, ocasionalmente anual, e cresce entre 15 e 83 cm de altura, podendo variar de acordo com a região de cultivo. As folhas são acaules e apresentam-se em roseta, de formato linear e com margens lisas com nervuras paralelinérveas. As flores são pequenas, dispostas em inflorescência espigada ereta sobre haste floral (HEFLER; RODRIGUES; CERVI, 2011). Apesar das diferenças apresentadas entre a *P. lanceolata* (Figura 2) e a *P. major* (Figura 1), pode ocorrer confusão na identificação das espécies (EMA, 2010).

1.2.1 Usos medicinais

Na Tabela 2 são apresentadas algumas propriedades biológicas já avaliadas para a *P. lanceolata*. As folhas frescas são tradicionalmente aplicadas na pele para picadas de abelhas, espinhas, furúnculos e para a cicatrização rápida de cortes. Além disso, são usadas no preparo de infusão ou decocção para o tratamento de dores de estômago, tuberculose, asma e bronquite (DALAR; TÜRKER; KONCZAK, 2012).

Tabela 2 - Atividades biológicas descritas para a *Plantago lanceolata*

Atividade biológica	Autores
Atividade antioxidante	Beara et al., 2012
Atividade anti-inflamatória	Beara et al., 2012
Atividade antiviral	Abdin, 2006
Atividade antiespasmódica	Fleer; Verspohl, 2007
Atividade anti-úlceras	Melese et al., 2011
Atividade citotóxica	Beara et al., 2012
Atividade anti obesidade	Yoshida et al., 2013
Efeito anti-mitótico	Aşkin Çelik; Aslantürk, 2006
Efeito anti-genotóxico	Aşkin Çelik; Aslantürk, 2006

A *P. lanceolata* pode ser utilizada também como pastagem para a alimentação animal, pois apresenta um interessante valor nutricional, além de efeitos terapêuticos desejáveis. Na medicina veterinária existem diversas referências sobre seu uso como anti-

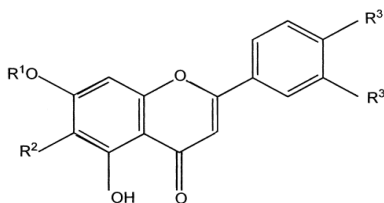
helmíntico (SIEVERS; NANNIG, 2006), indícios de efeitos antibióticos na flora do rúmen e efeito diurético (RUMBALL et al., 1997).

1.3 Compostos bioativos de plantas do gênero *Plantago*

O interesse pelas plantas do gênero *Plantago* tem aumentado nas últimas décadas por se tratar de um produto de origem natural que pode ser empregado na formulação de alimentos funcionais, medicamentos e cosméticos (GONÇALVES; ROMANO, 2016; WERYSZKO-CHMIELEWSKA et al., 2012). A Figura 3 representa a estrutura química de alguns desses compostos presentes nas plantas do gênero *Plantago*.

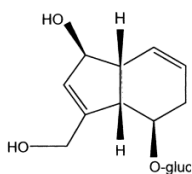
Figura 3 - Estrutura de alguns compostos com atividade biológica de plantas do gênero *Plantago*

Flavonoides



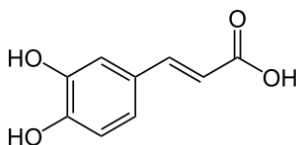
Baicaleína: R¹ = H; R² = OH; R³ = H

Glicosídeos iridoides

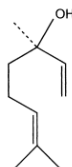


Aucubina

Ácido cafeico



Monoterpenos



Linalol

Fonte: Wikimedia (2015).

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que essas plantas apresentam diversos compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, lipídios, flavonoides, compostos fenólicos, glicosídeos iridoides, monoterpenos, triterpenos (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008; CHIANG et al., 2003; GONÇALVES; ROMANO, 2016; SAMUELSEN, 2000), compostos benzoicos (CHIANG et al., 2003), taninos, saponinas e esteróis (GRUBEŠIĆ et al., 2005). Entre esses compostos, os glicosídeos iridoides, glicosídeos fenilpropanoides, flavonoides e ácidos fenilcarboxílico têm sido utilizados como marcadores taxonômicos para o gênero *Plantago* (JANKOVIĆ et al., 2012; RØNSTED et al., 2003).

A baicaleína (Figura 3), baicalina e luteolina são exemplos de flavonoides identificados nas plantas do gênero *Plantago*. Os flavonoides são conhecidos por apresentarem atividades antiviral, antialérgica e anti-inflamatória, ações vasodilatadoras, bem como pela sua capacidade de induzir a morte de células de carcinoma (BEARA et al., 2009).

Outros constituintes de destacada importância são os glicosídeos iridoides. O glicosídeo aucubina (Figura 3) foi identificado nas folhas, flores e caule de plantas do gênero *Plantago*. As atividades antibacteriana e anti-inflamatória dessas plantas podem ser associadas à presença dessa substância (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008).

Os compostos fenólicos solúveis em água (ácido cafeico, clorogênico e ferúlico) de plantas do gênero *Plantago* exibiram atividades antivirais contra o vírus da herpes simples e adenovírus (CHIANG et al., 2002). Chiang et al. (2003) verificaram que o monoterpeno linanol apresenta atividade imunomoduladora (Figura 3).

A aplicação de folhas de *P. major* em queimaduras permite o alívio da dor e auxilia no processo de cicatrização. Essas propriedades são atribuíveis ao conteúdo de taninos, com função cicatrizante e hemostática, e seu conteúdo de alantoína. A alantoína é uma substância caracterizada pela estimulação da regeneração das células da epiderme. Esse composto é utilizado na composição de cremes para a pele e é de grande interesse da indústria de cosméticos (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008; FAROKHI; KHANESHI, 2013).

As propriedades medicinais apresentadas pelas plantas do gênero *Plantago* não se devem exclusivamente a um único constituinte químico, mas sim à interação dos vários constituintes. As atividades biológicas apresentadas por essa planta são produtos da ação em conjunto

das diferentes substâncias e de seu efeito sinérgico (BLANCO; SABORIO; GARRO, 2008; SAMUELSEN, 2000).

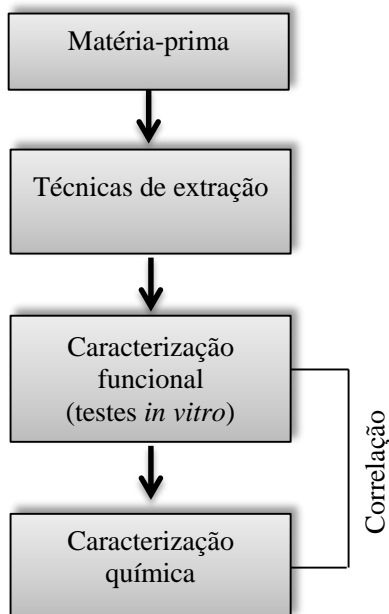
2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A Figura 4 representa um esquema básico para a obtenção e avaliação de compostos bioativos de plantas. A primeira etapa desse processo consiste na extração dos compostos de interesse. A extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (EGGERS; JAEGER, 2003). Nos processos de extração, a escolha do solvente, a temperatura e a ação mecânica (agitação e pressão) são importantes. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, localização e a sua ligação com outros componentes da matriz. As características químicas do solvente e a estrutura e composição do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente mostre comportamento particular, o qual não pode ser previsto facilmente. Os processos extrativos dependem em grande parte dos fenômenos de transferência de massa, sendo que a renovação do solvente desempenha um papel importante na velocidade da dissolução, bem como a agitação pode determinar a duração do processo extrativo (SOARES et al., 1998; TSAO; DENG, 2004).

A extração com solvente orgânico ou água e a extração líquido-líquido já são incorporados na obtenção de compostos naturais, enquanto que a extração com fluido supercrítico e subcrítico e extração assistida por micro-ondas são métodos alternativos ainda pouco utilizados no Brasil e que podem ser utilizados para novas aplicações ou aplicações melhoradas nas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos. Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens. É importante lembrar que o método de extração a ser selecionado para o processamento dos produtos naturais deve levar em conta três fatores principais: (i) obtenção de produto diferenciado do existente no mercado (qualidade, atividade biológica, composição química, estabilidade, ausência de traço de solvente, etc.), (ii) custo de manufatura mais vantajoso (maior rendimento, menor tempo, menor consumo de energia), e/ou (iii) redução no impacto ambiental. No Capítulo 3 do presente trabalho estão descritos os métodos de extração com solventes orgânicos e extração supercrítica com dióxido de carbono, enquanto que no Capítulo 4 estão apresentados

os métodos de extração com água subcrítica e extração assistida por micro-ondas.

Figura 4 - Esquema básico para a avaliação de compostos bioativos de plantas.



A avaliação dos extratos obtidos é outra etapa importante, sendo possível verificar os extratos mais ativos. Para isso os extratos são submetidos a testes biológicos, selecionados com base na sua suposta bioatividade. Os testes *in vitro* são rápidos e requerem pequenas quantidades de amostra e por isso são frequentemente utilizados. Uma vez verificada a atividade biológica, os compostos bioativos devem ser identificados e para isso existem diversos métodos cromatográficos. Após a identificação dos compostos presentes nos extratos, deve-se tentar correlacionar os compostos e sua funcionalidade (BRUSOTTI et al., 2014).

1.4 Atividade antioxidante

Nas últimas décadas tem sido um desafio para os produtores de alimentos garantir a segurança alimentar e atender às exigências dos consumidores particularmente preocupados com a saúde e conscientes dos possíveis efeitos dos aditivos sintéticos usados na conservação dos alimentos. Neste contexto, aumenta a procura por novos agentes antioxidantes e antimicrobianos que possam garantir a segurança e, ao mesmo tempo, atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade e que possam ser utilizados sozinhos ou em combinação com outra tecnologia (PAPETTI, 2012; SULTANBAWA, 2011).

A capacidade antioxidante está relacionada com a presença de compostos capazes de proteger um sistema biológico contra o efeito potencialmente nocivo de processos ou reações que envolvem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010). Por isso, as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e baseadas em fundamentos diversos (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

O método do radical DPPH se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, ocorre uma mudança na coloração de violeta a amarelo pálido. Esse método é um dos mais utilizados por sua facilidade, precisão e reprodutibilidade na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras (ALVES et al., 2010; BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2014).

O método de branqueamento do β -caroteno trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico. Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais e sucos de frutas. No entanto, a utilização do meio emulsionado pode interferir nos valores de

absorbância causando baixa reprodutibilidade (ALVES et al., 2010; BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2014).

O método do radical ABTS baseia-se na redução do ABTS^{•+} a ABTS pela ação de um composto antioxidante, o que acarreta a perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS^{•+} é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método pode ser utilizado para o estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (ALVES et al., 2010; BORGES et al., 2011; SUCUPIRA et al., 2014).

Considerando os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de ensaio, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (BADARINATH et al., 2010; KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

1.5 Atividade antimicrobiana

Os consumidores estão cada vez mais interessados em alimentos seguros e de alta qualidade, fato que pode ser atribuído em parte à ampla disponibilidade e acessibilidade a informações e dados sobre saúde, bem como pela crescente ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar causadas por micro-organismos patogênicos. A inativação ou inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes é um desafio considerável, visto que há uma preocupação crescente por parte dos consumidores em relação ao uso de conservantes químicos e antimicrobianos artificiais (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

As vantagens esperadas da utilização de antimicrobianos naturais incluem a redução da dependência total de antibióticos, a redução do desenvolvimento da resistência aos antibióticos por micro-organismos patogênicos, o controle de contaminações cruzadas por patógenos de origem alimentar, o melhoramento da tecnologia de preservação de alimentos e o fortalecimento do sistema imunológico em humanos (VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos

incluem método de difusão em ágar e métodos de macrodiluição e microdiluição. O método de difusão em ágar é um método qualitativo, amplamente utilizado na seleção dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana. Através deste método verifica-se a capacidade do extrato de inibir ou não o crescimento do micro-organismo de interesse (VIEIRA, 2005). A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da concentração mínima inibitória (CMI), que consiste na determinação da quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo testado (OSTROSKY et al., 2008).

3. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A busca por compostos bioativos de alta qualidade impulsiona as pesquisas envolvendo plantas e outras fontes naturais. No entanto, cada vez mais se busca uma produção mais limpa e com menos geração de resíduos, garantindo que os fabricantes assumam uma maior responsabilidade para os produtos que eles produzem.

Nos processos de obtenção dos compostos bioativos o uso de solventes é fundamental. Como usualmente os solventes não são incorporados ao produto final é necessária uma ou mais etapas para a sua remoção, o que pode gerar uma grande quantidade de resíduo. Em tese, os solventes podem ser reciclados, porém durante sua eliminação ocorrem perdas para o meio ambiente. Desta forma, as pesquisas buscam solventes alternativos que tenham um ciclo funcional mais verde, reduzindo o impacto ambiental e que também garantam a obtenção de produtos de qualidade. Neste contexto, podemos destacar o uso dos fluidos supercríticos e da água.

As matérias-primas estudadas neste trabalho, *P. major* e *P. lanceolata*, são reconhecidas na medicina popular devido às suas ações terapêuticas. Como citado na revisão bibliográfica, o uso da *P. major* é reconhecido Agência Nacional de Vigilância Sanitária e esta espécie compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. O interesse nessas plantas é devido aos diversos compostos bioativos presentes em sua composição, podendo-se destacar seu potencial antioxidante e antimicrobiano.

Tais relatos justificam o estudo de diferentes técnicas de extração para a obtenção de extratos bioativos de *P. major* e *P. lanceolata*.

Muitos são os estudos a respeito das atividades antioxidante e antimicrobiano dessas plantas. No entanto, até o momento não foram encontrados trabalhos sobre *P. major* e *P. lanceolata* que reportem o estudo de diferentes métodos de extração na obtenção de extratos bioativos, buscando preferencialmente processos que permitam maiores rendimentos, potencialização das atividades biológicas e menor impacto ambiental.

Capítulo 3

EXTRAÇÃO SUPERCÍTICA DE *Plantago major* E *Plantago lanceolata*

1. INTRODUÇÃO

A sustentabilidade dos processos empregados para extrair e purificar compostos bioativos é um tema cada vez mais relevante. Os métodos mais modernos de extração visam a utilização de solventes alternativos, com minimização da geração de resíduos, redução do consumo de energia e de operações unitárias, fomentando a automatização dos processos e produzindo extratos de maior qualidade. Dessa forma, novos processos de extração respeitadores do ambiente que proporcionam altos rendimentos associados a extratos bioativos são preferíveis a protocolos convencionais de extração. Entre estas tecnologias, a extração com fluido supercrítico (ESC) é bastante utilizada na obtenção de compostos bioativos a partir de fontes naturais, oferecendo diversas vantagens em relação aos procedimentos de extração tradicionais (HERRERO et al., 2015).

O Capítulo 3 do presente trabalho objetiva avaliar o emprego da extração supercrítica na obtenção de compostos bioativos de *P. major* e *P. lanceolata*. Métodos tradicionais de extração também foram utilizados com a finalidade de comparação com os dados obtidos por ESC. O trabalho experimental do Capítulo 3 desse trabalho foi realizado, em sua maioria, no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Extração com solventes orgânicos

A extração com solventes consiste basicamente na exposição da matéria-prima pré-tratada a diferentes solventes, o que resulta na extração de compostos de interesse. Para a utilização dos extratos, especialmente em aplicações em alimentos, as amostras devem ser submetidas a operações posteriores, como filtração, centrifugação e remoção do solvente (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; STARMANS; NIJHUIS, 1996).

Nos processos de extração diversos solventes podem ser usados, como hexano, éter, clorofórmio, acetonitrila, benzeno e etanol, podendo ser utilizados puros ou em misturas com diferentes proporções

de água. Estes solventes podem ser empregados para a extração de compostos orgânicos polares e apolares, tais como alcaloides, pesticidas organoclorados, fenóis, hidrocarbonetos aromáticos, ácidos graxos e óleos, entre outros. No entanto, alguns desses solventes são tóxicos para os seres humanos e perigosos para o meio ambiente e devem ser utilizados com cuidado (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; STARMANS; NIJHUIS, 1996).

As técnicas clássicas de extração com solventes orgânicos utilizadas para a extração de compostos bioativos de produtos naturais incluem Soxhlet, hidrodestilação e maceração. Outras técnicas foram desenvolvidas para aprimorar a extração de compostos nutraceuticos de produtos naturais, como a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por micro-ondas (WANG; WELLER, 2006). Nesse capítulo serão apresentadas as técnicas de extração em Soxhlet e extração assistida por ultrassom.

2.1.1. Soxhlet

O extrator Soxhlet foi desenvolvido em 1879 e esta técnica vem sendo considerada como uma metodologia padrão por mais de um século. Nessa técnica, a seletividade é unicamente influenciada pela escolha do solvente. A extração com Soxhlet apresenta diversas vantagens. Nesse processo a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo a constante renovação do solvente. Além disso, não há necessidade de filtração ao término da extração, a metodologia é simples e o equipamento apresenta baixo custo. (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

As maiores desvantagens da extração com Soxhlet em comparação a outras técnicas são o longo tempo necessário para a extração e a grande quantidade de solvente utilizado. A amostra geralmente é extraída no ponto de ebulição do solvente durante longos períodos, o que pode resultar na decomposição térmica das espécies termolábeis. Além disso, para a recuperação do extrato há a necessidade de eliminação do solvente, que pode ser incompleta (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

2.1.2. Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom proporciona maiores rendimentos de extração, utilizando menos solvente e de forma mais rápida do que extração com solventes orgânicos por meio de Soxhlet e maceração. Além disso, possibilita a extração de compostos termicamente sensíveis (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003). Esse método tem sido utilizado para a obtenção de vários compostos de produtos naturais, como proteínas, açúcares, complexos polissacarídeos-proteínas, óleos, antioxidantes, entre outros. Assim como a técnica de Soxhlet, a seletividade é unicamente influenciada pela escolha do solvente (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

A maior eficiência de extração desse método está relacionada com o fenômeno chamado de cavitação acústica. Quando a intensidade do ultrassom é suficiente, os ciclos de expansão podem criar cavidades ou microbolhas no líquido. Uma vez formadas, as bolhas irão absorver a energia das ondas sonoras e expandir durante os ciclos de expansão e comprimir durante o ciclo de compressão. Na etapa de compressão, os gases e vapores não retornam completamente para o líquido, resultando em aumento efetivo do tamanho da cavidade durante os ciclos seguintes de compressão e expansão até que seja atingido seu diâmetro crítico, entrando em violento colapso. O colapso das bolhas transientes provoca a liberação de grande quantidade de energia, gerando temperaturas e pressões locais instantâneas muito elevadas. Dessa maneira, a implosão das bolhas de cavitação pode atingir a superfície da matriz sólida e desintegrar as células, causando a liberação dos compostos de interesse (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

As principais desvantagens apresentadas por esse método estão associadas à utilização de solventes orgânicos e da necessidade de etapas posteriores de recuperação do extrato, como filtração ou centrifugação e eliminação do solvente. Além disso, a otimização das variáveis de processo tempo, temperatura e frequência é necessária para manter a estabilidade dos compostos, evitando degradações e perdas de atividade (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

2.2. Extração com fluidos supercríticos (ESC)

Um fluido supercrítico é qualquer substância a uma temperatura e pressão acima de seu ponto crítico termodinâmico. Os fluidos supercríticos são os únicos solventes que podem ter seu poder de solvatação controlado por pequenas alterações na pressão e/ou temperatura. Sua massa específica é muito maior do que aquela dos gases típicos e ligeiramente menor do que aquelas dos líquidos. Por outro lado, a viscosidade do fluido supercrítico assemelha-se à dos gases, e é muito menor do que a dos líquidos. Esta característica assegura a capacidade elevada da fase fluida para a transferência de massa, fazendo com que os fluidos supercríticos sejam escolhidos como solventes de extração (BRUNNER, 1994).

As aplicações da extração com fluidos supercríticos na indústria de alimentos, de fármacos e de cosméticos são inúmeras. Alguns exemplos de processos consolidados que utilizam a extração com fluido pressurizado são: a remoção de nicotina do tabaco e cafeína do café e chás, extração de aromas, óleos essenciais e antioxidantes, extração de óleos de sementes oleaginosas, extração de ervas medicinais e produção de extrato de lúpulo para a produção de cervejas. O único resíduo acumulado ao final do processo ESC é o sólido do qual foi extraído o soluto. Como a matéria-prima é uma matriz biológica ou parte desta, o resíduo pode ser incorporado ao solo sem prejuízo ao meio-ambiente. Em alguns casos, como na extração da cafeína do café, tanto o resíduo (grãos de café descafeinados) quanto o extrato (cafeína) são produtos comercializáveis (HERRERO et al., 2010; MUKHOPADHYAY, 2000).

A seleção do solvente no processo de extração com fluido supercrítico é muito importante, vista a vasta gama de substâncias que podem ser utilizadas nessa técnica. No entanto, apesar da diversidade de substâncias que podem ser utilizadas como solvente nesse método de extração, a maioria dos processos emprega o dióxido de carbono (DAINTREE; KORDIKOWSKI; YORK, 2008).

O dióxido de carbono (CO₂) é barato, ecológico, seguro e apresenta alta difusividade. A temperatura e pressão crítica do CO₂ (31,1 °C e 7,38 MPa) são favoráveis no processo por permitirem a extração de compostos termicamente lábeis ou compostos facilmente oxidáveis. Além disso, em temperatura e pressão ambiente o CO₂ é gasoso, o que torna a recuperação dos compostos muito simples e livre de solventes

(BRUNNER, 1994; HERRERO et al., 2010). Todavia, devido a sua baixa polaridade, o CO₂ não é eficiente na extração de compostos polares de matrizes (HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006).

No processo de extração, as moléculas polares são pouco solubilizadas no CO₂ supercrítico e dessa forma, seu rendimento de extração é baixo. Para aumentar a extração de moléculas polares podem ser utilizados modificadores, os quais devem ser adicionados ao solvente supercrítico apenas em pequenas quantidades. Esse fenômeno é atribuído ao aumento da solubilidade devido à ação conjunta dos componentes, sendo chamado de efeito cossolvente. O etanol é o cossolvente ou modificador mais utilizado nos processos de extração supercrítica devido a sua baixa toxicidade e sua miscibilidade no CO₂ (DAINTREE; KORDIKOWSKI; YORK, 2008; JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

2.2.1. Procedimento de extração

A técnica de extração é baseada no contato entre um leito fixo da amostra com um solvente em estado supercrítico, sendo um processo de separação física que remove um soluto ou mistura de solutos da fase sólida, consistindo de duas etapas principais: extração e separação do extrato do solvente. A Figura 5 ilustra um esquema simplificado do processo de ESC.

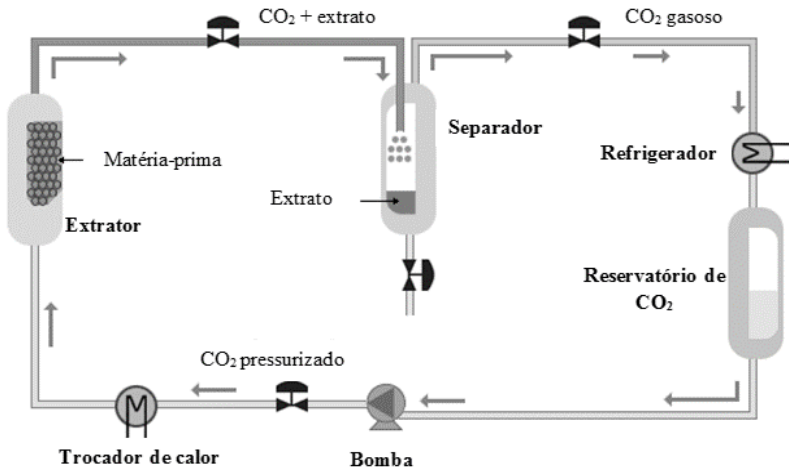
O solvente pressurizado escoava continuamente através do leito de partículas. A matriz sólida o absorve e sua estrutura celular se dilata, sendo que a resistência ao transporte de massa diminui. Na etapa de difusão, os componentes solubilizados são transportados para a superfície do sólido. Paralelamente, os compostos solúveis são dissolvidos pelo solvente. Estes componentes dissolvidos fazem parte da fase fluida e escoam para a saída do extrator. Após a extração ocorre a etapa de separação em que a pressão do sistema é reduzida, o poder de solubilização do solvente extrato diminui drasticamente e o soluto precipita. Após a separação, o solvente pode ser recirculado no sistema (BRUNNER, 1994; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui características específicas do material, como massa específica, diâmetro do poro, porosidade, geometria e teor de umidade. O segundo grupo inclui parâmetros do processo como pressão e temperatura de extração, vazão

do solvente, tempo, temperatura e pressão de separação (MARTÍNEZ; VANCE, 2007).

A extração com fluidos supercríticos tipicamente utiliza pressões entre 20 e 50 MPa, temperaturas de até 80 °C, razão de alimentação de solvente entre 6 e 30 kg de CO₂ por kg de amostra e adição máxima de 20 % de cossolvente (KASSING et al., 2010). O tempo do processo de ESC varia de acordo com as características da matéria-prima, equipamento e condições de operação, sendo definido com base nas informações fornecidas pelo comportamento cinético da extração (BRUNNER, 1994). A representação da cinética da ESC é feita através da construção da curva global de extração.

Figura 5 - Fluxograma simplificado do processo de ESC



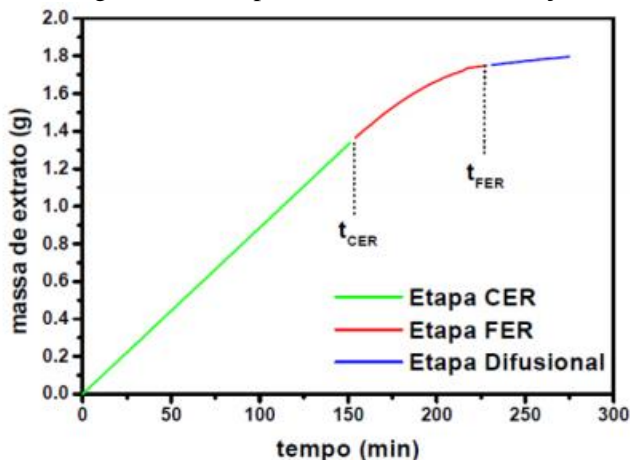
Fonte: Suflux, 2014.

2.2.2. Curvas globais de extração

A curva de extração é um gráfico da massa acumulada ou rendimento de extrato em função do tempo de extração ou quantidade de solvente. A curva obtida depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. São vários os fatores que afetam o comportamento das curvas de extração, como por

exemplo vazão de solvente utilizada e tamanho da partícula formadora do leite. Desta forma, é difícil fazer a comparação entre curvas obtidas a partir de matérias-primas diferentes e de diferentes equipamentos, mas as informações que elas podem fornecer, como a duração da velocidade constante de extração, são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994). Na Figura 6 pode ser observado um exemplo de uma curva de extração com os três períodos de extração.

Figura 6 - Exemplo de uma curva de extração.



Fonte: Martínez, 2005.

De acordo com a literatura, as curvas de extração são divididas em três períodos: (1) período de velocidade constante de extração (CER); (2) período de velocidade decrescente de extração (FER) e (3) período difusional. Cada período é controlado por diferentes mecanismos de transferência de massa (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010; SOVOVÁ, 1994; TALANSIER et al., 2008). No período CER, o soluto está facilmente acessível na superfície das partículas da matriz. Nesta situação o processo de transferência de massa é controlado pela convecção (escoamento do solvente). Em geral, este período pode ser caracterizado pelos seguintes parâmetros: t_{CER} (duração do período CER, s); Y_{CER} (razão mássica de soluto na saída do leite); M_{CER} (velocidade de transferência de massa, kg

s^{-1}) e R_{CER} (rendimento do período CER). No período FER, a taxa de transferência de massa decresce rapidamente como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa e passa a ser significativo o processo de transferência de massa por difusão. O período difusional é caracterizado pela ausência de soluto facilmente acessível na superfície das partículas e predomínio do fenômeno difusivo no sólido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

3.1.1. *Plantago major*

A amostra *P. major* utilizada para as extrações foi adquirida junto a empresa Chá & Cia Ervas Medicinais. Como pode ser observado na Figura 7, a matéria-prima era composta pelas partes aéreas da planta, contendo folhas, talos e sementes. As plantas foram produzidas no Brasil, colhidas em agosto de 2012 e secas em estufa. As amostras recebidas no laboratório foram moídas em moinho tipo Willey (De Leo, Porto Alegre/RS - Brasil), empacotadas em saco plástico identificado e armazenadas em congelador doméstico a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 7 - Foto da amostra de *Plantago major* utilizada nos experimentos.



Fonte: a autora.

3.1.2. *Plantago lanceolata*

A amostra *P. lanceolata* utilizada para as extrações foi adquirida junto a empresa Kampo de Ervas Indústria e Comércio LTDA ME. Como pode ser observado na Figura 8, a matéria-prima era composta pelas partes aéreas da planta, contendo folhas e talos. As plantas foram produzidas no Brasil, colhidas em janeiro de 2013 e secas a sombra. As amostras recebidas no laboratório foram moídas em moinho tipo Willey (De Leo, Porto Alegre/RS - Brasil), empacotadas em saco plástico identificado e armazenadas em congelador doméstico a -18 °C.

Figura 8 - Foto da amostra de *P. lanceolata* utilizada nos experimentos



Fonte: a autora.

3.1.3. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis das amostras foi determinado de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2005). O método n° 925.09 se fundamenta na perda de umidade e substâncias voláteis em estufa a 105 °C. O procedimento foi realizado em duplicata e os resultados expressos em porcentagem \pm desvio padrão.

3.1.4. Determinação do diâmetro médio de partícula

O diâmetro médio de partícula foi determinado em acordo com o cálculo proposto por Gomide (1983). Em peneiras da série Tyler de mesh -24/+48 foram adicionadas 100 g de amostra. O conjunto foi agitado por 30 min e após esse tempo, mediram-se as massas retidas sobre cada peneira. As Equações 1 e 2 foram utilizadas para o cálculo do diâmetro médio de partícula.

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{\bar{d}_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{\bar{d}_i^3}}} \quad (1)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{M} \quad (2)$$

Onde:

d_s : diâmetro médio superficial das partículas;

m_i : massa de amostra retida na peneira i ;

d_i : diâmetro da peneira i ;

n : número total de frações.

3.1.5. Determinação da massa específica real

A massa específica real (ρ_r) das amostras de *P. major* e *P. lanceolata* foi determinada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), utilizando a técnica de picnometria em gás hélio, qual segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos, com o uso do equipamento AccuPyc II 1340 da Micrometrics. A utilização dessa técnica em geral apresenta bons resultados, uma vez que o gás hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial

sem alterar as características das partículas. Os resultados foram expressos em g cm⁻³.

3.1.6. Caracterização do leito de partículas

A massa específica aparente (ρ_a) foi determinada por meio da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações e o volume do leito ocupado.

A porosidade total do leito de partículas (ε) foi calculado com os dados da massa específica real (ρ_r) obtida na seção 3.1.5 e a massa específica aparente (ρ_a) por meio da Equação 3.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3)$$

3.2. Extração com solventes orgânicos

Os processos de extração empregando solventes orgânicos das plantas de *P. major* e *P. lanceolata* foram efetuados pelos métodos de Soxhlet e ultrassom. Essas extrações objetivam fornecer resultados comparáveis aos obtidos com extração supercrítica em termos de rendimento e atividade biológica. Além disso, a seleção do cossolvente empregado na extração supercrítica foi realizada com base nesses resultados.

3.2.1. Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi realizada de acordo com o método n° 920.39C da AOAC (2005). Nas extrações com *P. major* utilizaram-se os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol. Baseando nos resultados obtidos nas extrações com *P. major* e também buscando reduzir a utilização de solventes tóxicos, as extrações de *P. lanceolata* foram realizadas utilizando apenas os solventes hexano, etanol e metanol. A Tabela 3 apresenta as polaridades dos solventes empregados.

O sistema Soxhlet consiste em um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão e na extremidade superior a um condensador. Para cada extração, 5 g de amostra foram envolvidos em um cartucho de papel filtro e inseridos no extrator. O balão foi preenchido com 150 mL de solvente, o que corresponde a uma proporção de amostra-solvente igual à 1:30 (v/v).

Tabela 3 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet.

Solvente	Índice de polaridade
Hexano	0,0
Diclorometano	3,1
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2
Metanol	6,6

Fonte: Byers (2009).

No processo de extração o solvente é aquecido até sua temperatura de ebulição por uma manta. O vapor do solvente sobe até o condensador, resfria e condensa gotejando sobre a matriz vegetal, solubilizando os compostos. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido até o final de extração. As extrações foram realizadas durante 6 h, em duplicata e a eliminação do solvente foi realizada em rotaevaporador a °C com arrefecimento (Fisatom, Brazil), sob vácuo de 400 mmHg e rotação de 50 rpm. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar, armazenados em congelador doméstico a -18 °C e os resultados de rendimento expressos como média \pm desvio padrão.

3.2.2. Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom das amostras de *P. major* e *P. lanceolata* foi realizada em acordo com Vinatoru (2001) e Andrade et al. (2012). Os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol e duas misturas etanol/água nas proporções 50/50 e 70:30 (v/v) foram utilizados nas extrações com a *P. major*. Para as

extrações com a *P. lanceolata* os solventes utilizados foram hexano, etanol e metanol, etanol/água na proporção 70:30 (v/v).

Em um balão de 250 mL foram adicionados 7 g de amostra e 210 mL de solvente, o que corresponde a uma proporção de amostra-solvente igual à 1:30. O balão foi acoplado a um condensador de bolas, e este, por sua vez, conectado a um banho refrigerado. O conjunto foi submetido a banho indireto em ultrassom (USC-700/55 kHz, Unique Ltda., Indaiatuba/SP, Brasil) utilizando uma lavadora ultrassônica por 45 min.

Após o tempo de extração estabelecido, o sistema foi filtrado e realizou-se a eliminação dos solventes em rotaevaporador (Fisatom, Brazil) com arrefecimento, sob vácuo de 400 mmHg, rotação de 50 rpm e temperatura de 50 °C. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em congelador doméstico a -18 °C. As extrações foram realizadas em duplicata e os rendimentos expressos como média ± desvio padrão.

3.3. Extração com fluidos supercríticos

Nos experimentos com fluido supercrítico foi utilizado o método dinâmico de extração, que é caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida, tanto nos experimentos cinéticos como na determinação do rendimento global de extração.

3.3.1. Unidade de extração supercrítica

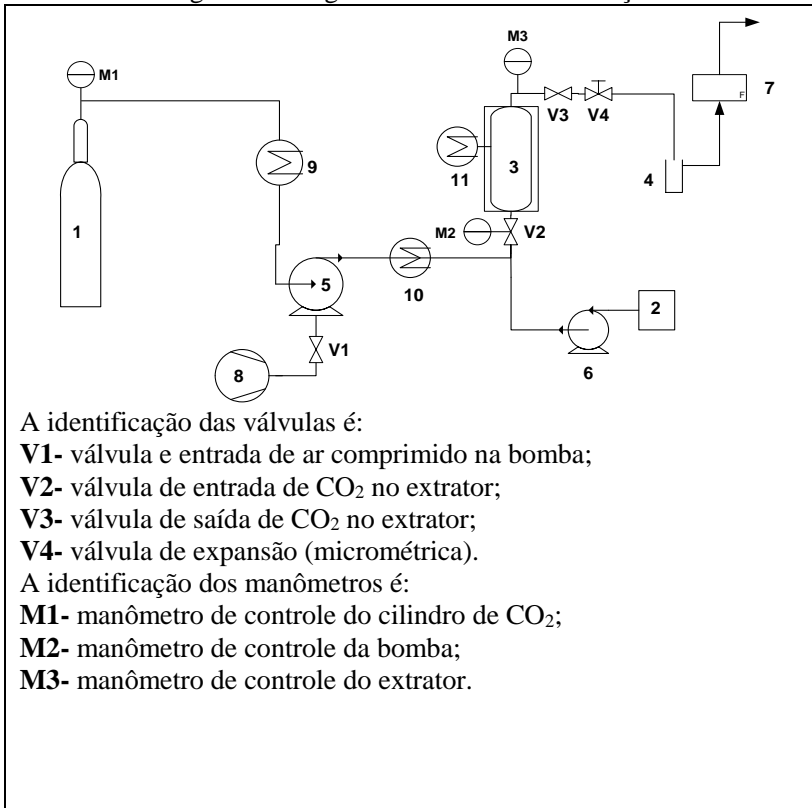
O equipamento de ESC utilizado foi desenvolvido pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha e está representado na Figura 9. A unidade de extração opera até uma pressão máxima de 30 MPa e vazões de solvente de 1,67 a 36,67 g min⁻¹ (ZETZL; LOZANO; BRUNNER, 2007).

O sistema da Figura 9 consiste em:

- 1 - Cilindro de CO₂;
- 2 - Reservatório de cossolvente;
- 3- Coluna de extração;
- 4- Frasco coletor;

- 5- Bomba de CO₂;
- 6- Bomba de cossolvente;
- 7- Rotâmetro;
- 8 - Compressor de ar;
- 9 - Banho de resfriamento do CO₂;
- 10 - Banho de aquecimento;
- 11 - Banho de aquecimento da coluna de extração.

Figura 9 - Diagrama da unidade de extração



- A identificação das válvulas é:
- V1**- válvula e entrada de ar comprimido na bomba;
 - V2**- válvula de entrada de CO₂ no extrator;
 - V3**- válvula de saída de CO₂ no extrator;
 - V4**- válvula de expansão (micrométrica).
- A identificação dos manômetros é:
- M1**- manômetro de controle do cilindro de CO₂;
 - M2**- manômetro de controle da bomba;
 - M3**- manômetro de controle do extrator.

Fonte: a autora.

3.3.2. Procedimento experimental

Michielin et al. (2005) descreveram o procedimento de extração. Na unidade supercrítica representada na Figura 9, o cilindro de CO₂ com tubo pescador alimenta diretamente a linha de extração. A linha de solvente é imersa no banho termostático (9) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o CO₂ esteja no estado líquido antes de sua entrada na bomba (5). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e ajustado na pressão para cada condição de trabalho desejada.

Durante o funcionamento, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado à linha de extração, passando pelo extrator (3), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,9 cm de comprimento, 2,0 cm de diâmetro interno e volume de 100 mL, com extremidades rosqueadas. O banho termostático de aquecimento (10) é mantido a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica (V4) durante a despressurização da mistura soluto/solvente. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (11).

No início do processo de extração as válvulas V2, V3 e V4 são mantidas fechadas. O cilindro (1) é aberto e aguarda-se a equalização dos manômetros 1 e 2. A válvula V2 da linha de CO₂ é aberta e ocorre a equalização do manômetro 3 com 1 e 2. A bomba (5) é acionada e estabelece-se a pressão de trabalho desejada através da regulagem do ar comprimido que entra na bomba. A válvula V3 conectada na saída do extrator auxilia a V4 na despressurização do solvente e permite o controle da vazão de solvente. Após passar pela V4, o soluto é coletado em frascos âmbar (4) e a vazão de CO₂ é medido no rotâmetro (7). Para os experimentos com cossolvente, a bomba (6) é acoplada a linha antes da entrada no extrator.

3.3.3. Determinação da cinética de extração

A curva global de extração fornece informações sobre o comportamento cinético da extração, possibilitando a determinação do tempo mais viável para um processo. Nos ensaios para a determinação da cinética de extração da *P. major* a coluna foi preenchida com 15 g de matéria-prima, o que permitiu a formação de um leito de partículas com

altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial pode ser desprezada. Após a pressurização, o CO₂ puro foi admitido no sistema a uma vazão de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$. Os ensaios foram realizados a uma pressão de 20 MPa e temperatura de 50 °C, correspondentes ao ponto central dos experimentos. Os frascos de coleta foram previamente medidos e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após 5 min da coleta, a massa dos frascos foi medida e determinou-se a massa de extrato obtida em função do tempo.

A determinação da cinética de extração da *P. lanceolata* foi realizada de forma similar a descrita para a *P. major*, utilizando pressão de 20 MPa, temperatura de 50 °C, vazão de CO₂ de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$ e 30 g de matéria-prima. Como os rendimentos de extração da *P. major* foram baixos, optou-se em realizar a extração de *P. lanceolata* com o dobro de matéria-prima.

As curvas globais de extração da *P. major* e *P. lanceolata* estão representadas na Figura 10. Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir da curva de extração. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas de velocidade constante e decrescente de extração, respectivamente. A velocidade de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com o auxílio de planilha eletrônica, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} .

3.3.4. Determinação do rendimento de extração

A influência da pressão e da temperatura no rendimento global (X_0) da ESC da *P. major* foi avaliada por meio de um planejamento experimental com 3 níveis e 2 variáveis, totalizando 9 experimentos (Tabela 4). Nos experimentos, realizados em duplicata, a temperatura variou entre 40 e 60 °C e a pressão entre 10 e 30 MPa. O limite inferior de temperatura (40 °C) está um pouco acima da temperatura crítica do CO₂ (31,1 °C) e é normalmente utilizada na extração de materiais vegetais nos processos de ESC. O limite superior de temperatura (60 °C) permite a extração de compostos de materiais vegetais e não causa danos térmicos no material.

A influência da pressão e da temperatura no rendimento global (X_0) da ESC da *P. lanceolata* foi avaliada por meio de um planejamento experimental com 2 níveis e 2 variáveis, totalizando 4 experimentos (Tabela 5). Com base nos resultados da *P. major*, não foram realizados experimentos a 10 MPa, uma vez que os rendimentos obtidos foram muito baixos (Tabela 9).

Tabela 4 - Planejamento experimental fatorial completo 3^2 com a temperatura (T) e a pressão (P), variando em três níveis para a *Plantago major*.

Experimento	Variáveis codificadas de T	Variáveis codificadas de P	Variáveis reais de T (°C)	Variáveis reais de P (MPa)
1	-1	-1	40	10
2	-1	0	40	20
3	-1	+1	40	30
4	0	-1	50	10
5	0	0	50	20
6	0	+1	50	30
7	+1	-1	60	10
8	+1	0	60	20
9	+1	+1	60	30

O tempo de extração da *P. major* e da *P. lanceolata* foi definido em 3,5 h por meio da observação das curvas globais de extração obtida com 20 MPa, 50 °C e vazão de solvente de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$, descritas na seção 3.3.3 (Figura 10). Nos experimentos foram utilizadas as mesmas massas de matéria-prima empregadas na determinação da cinética de extração, ou seja, 15 e 30 g para *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro.

A massa de extrato obtida nos frascos foi medida em balança analítica e armazenada em congelador doméstico a -18 °C até a realização dos ensaios de avaliação da atividade biológica. O rendimento global (X_0) foi calculado através da razão entre a massa de extrato obtida e a massa de matéria-prima utilizada para formar o leito.

Tabela 5 - Planejamento experimental para a *Plantago lanceolata*.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (MPa)
1	50	20
2	50	30
3	60	20
4	60	30

3.3.5. Emprego de cossolvente

As condições de extração de *P. major* e *P. lanceolata* para a adição de cossolvente foram selecionadas com base nos resultados de rendimento de extração em Soxhlet e ultrassom, atividade antioxidante dos extratos e dados da literatura.

A *P. major* foi submetida a extrações com os cossolventes etanol em frações de 2,5; 5,0 e 10,0% (m/m) e metanol na fração de 5,0 (m/m). As extrações foram realizadas em duplicata, na condição de operação de 30 MPa, 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g min⁻¹ e tempo de 3,5 h.

A *P. lanceolata* foi submetida a extrações com etanol como cossolvente em frações de 2,5; 5,0 e 10,0% (m/m). As extrações foram realizadas em duplicata, na condição de operação de 20 MPa, 60 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g min⁻¹ e tempo de 3,5 h.

3.4. Determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante

As determinações do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC). A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi avaliada por duas técnicas distintas, sendo elas: método do radical DPPH e método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (PESCHEL et al., 2006; SINGLETON; ROSSI J A JR., 1965).

Para a construção da curva analítica de ácido gálico preparou-se uma solução estoque de $0,005 \text{ g mL}^{-1}$ de ácido gálico em água destilada. Em balões volumétricos de 100 mL, foram diluídas alíquotas da solução estoque para a obtenção de frações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 350 mg L^{-1} . A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferidos para estes 100 μL de cada uma das frações, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 segundos e antes de 8 min após a adição do reativo, foram adicionados 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram aferidos com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 2 h para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro. A curva analítica de ácido gálico foi representada através do gráfico de absorvância *versus* concentração de ácido gálico (mg L^{-1}) e está apresentada no Apêndice I.

Os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* avaliados foram diluídos em álcool etílico absoluto P.A. na fração final de 1667 mg L^{-1} , e seguiu-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva analítica de ácido gálico. Os valores de absorvância encontrados para cada tipo de extrato foram correlacionados com a curva analítica, e o teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi determinado através da Equação 4. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg de GAE g^{-1} de extrato, como média \pm desvio padrão.

$$TFT (\text{mg GAE g}^{-1}) = \left[\frac{GAE \cdot 1000}{D_{\text{extrato}}} \right] \quad (4)$$

Onde:

GAE: equivalente em ácido gálico, obtido através da curva analítica (mg GAE L^{-1});

D: diluição da amostra (mg extrato L^{-1}).

3.4.2. Método do radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada em acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Nesse método, concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg mL⁻¹) dos extratos obtidos de *P. major* e *P. lanceolata* foram adicionadas a uma solução etanólica de DPPH 0,3 mmol L⁻¹. Após 30 min, ao abrigo da luz e temperatura ambiente, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro em 517 nm.

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (EC₅₀ – *Effective concentration*) foi calculada por análise de regressão linear. Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC₅₀) para os extratos analisados foram expressos como média ± desvio padrão.

3.4.3. Método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* a partir do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com o método descrito por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006). Para o preparo da solução sistema β-caroteno/ácido linoleico, utilizaram-se 3,4 mg de β-caroteno, aos quais adicionaram-se 40 μL de ácido linoleico, 400 mg de Tween 20 e 1 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador e 100 mL de água destilada foram acrescentados.

Em tubos de ensaio, 5 mL dessa solução sistema foram adicionados a 0,2 mL de solução de extrato etanólico (1,667 mg mL⁻¹). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 470 nm. Os tubos foram colocados em banho-maria, a 50 °C, e as leituras realizadas antes da incubação e após 2 h. Essas leituras foram realizadas para as amostras e para o controle, que são os tubos em que a amostra foi substituída por etanol. Os resultados de atividade antioxidante (AA %) foram calculados pela Equação 5 e expressos como média ± desvio padrão.

$$AA \% = 1 - \left\{ \left[\frac{Abs amostra_{final} - Abs amostra_{inicial}}{Abs controle_{final} - Abs controle_{inicial}} \right] \times 100 \right\} \quad (5)$$

3.5. Determinação do atividade antimicrobiano

3.5.1. Teste de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi avaliada para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. As espécies foram selecionadas por serem causadoras de doenças transmitidas por alimentos (chamadas DTAs) de ocorrência frequente. Os ensaios de difusão em ágar foram realizados no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

No método de difusão em ágar, uma suspensão bacteriana de cada espécie contendo 10^8 UFC mL^{-1} foi semeada na superfície do ágar de Müeller-Hinton com auxílio de *swab* estéril. Em seguida, foram feitos 8 orifícios de 7 mm de diâmetro no ágar com auxílio de um furador de aço estéril. Em cada orifício foram adicionados 50 μL de uma suspensão de concentração de 20 mg de extrato mL^{-1} de DMSO (dimetilsulfóxido) a 60%. A concentração de DMSO foi testada previamente e verificou-se que essa fração de 60% não oferece nenhuma inibição aos microrganismos testados (Figura 17).

O antibiótico cloranfenicol foi utilizado como controle positivo, sendo que a Figura 18 ilustra seu efeito antibacteriano. Os sistemas foram incubados por 24 h a 36 °C, em estufa bacteriológica e em condições aeróbicas. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido (MICHIELIN et al., 2009; SMÂNIA et al., 1995; VALGAS et al., 2007). As amostras que apresentaram halos de inibição superiores a 9 mm foram avaliadas quanto a concentração mínima inibitória.

3.5.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por (ÁVILA et al., 2008), no Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

Em 250 μL de DMSO previamente esterilizado foram dissolvidos 20 mg dos extratos e posteriormente, preparadas diluições seriadas com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações finais variando entre 2.000 e 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em uma placa de microdiluição de 96 poços foram distribuídos 10 μL de cada diluição, 85 μL de caldo de Müeller-Hinton e 5 μL de inóculo bacteriano, o qual consistiu de uma suspensão contendo aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1} de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Como controles de crescimento e esterilidade foram usadas apenas misturas meio de cultura e inóculo e meio de cultura e DMSO.

Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas por 24 h a 36 °C. A leitura de cada placa foi realizada através de densidade óptica (DO) a 630 nm, com uso de leitora de microplacas e nos casos em que a turvação e/ou a coloração do extrato interferiram na leitura da DO, foi utilizada uma solução alcóolica reveladora de crescimento bacteriano INT (cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium). Em cada micropoço foram adicionados 20 μL da solução alcóolica 70 % de INT (5 mg mL^{-1}) e incubou-se as placas por 30 min a 36 °C. A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano (após revelação com INT, amarelo indica ausência de crescimento bacteriano, púrpura indica crescimento), sendo os resultados expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6. Caracterização por CG-EM

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos foi realizada no Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Para a referida análise foi empregado um espectrômetro de massas triplo quadrupolar (Scion MS-TQ, Bruker Daltonics Inc.) acoplado ao cromatógrafo gasoso (456-GC, Bruker Daltonics Inc.), coluna VF5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm , Varian, Inc.,

CA, USA). Os ensaios foram realizados empregando o modo de injeção por split a uma taxa de 1:20. A temperatura do injetor foi de 250 °C. O gás de arraste foi o hélio usado a uma vazão de 1 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantendo por 3 minutos, aquecendo a uma taxa de 5 °C min⁻¹ até 250 °C, mantendo por 10 minutos. Os compostos majoritários foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology/NIST - Mass-Spectral Library with Windows Search Program – Version 8*).

3.7. Análise estatística

Os resultados de rendimento global de extração, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA). Quando se verificou diferenças significativas ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey. Dessa forma, a análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento de extração e entre as porcentagens de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação do rendimento global de extração (X_0)

4.1.1. Extração com solventes orgânicos

A extração é um passo muito importante no isolamento, identificação e utilização de compostos bioativos, sendo que esse processo pode ser efetuado por diferentes métodos. O estudo de diferentes processos de extração permite a seleção do método mais adequado para obter um produto com as características desejadas. Os rendimentos de extração de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos com diferentes solventes orgânicos em Soxhlet e ultrassom estão apresentados na Tabela 6.

Conforme apresentado na Tabela 6, o melhor rendimento de extração para *P. major* foi $20,5 \pm 0,8\%$ para a extração em ultrassom com a mistura de etanol/água 50/50 (v/v). Para a *P. lanceolata* o melhor

rendimento de extração foi de $23,1 \pm 0,3\%$ para a extração em ultrassom com metanol.

Tabela 6 - Rendimento globais (X_0) obtidos para as extrações com solventes orgânicos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*.

Técnica de extração	Solvente	Rendimento (%) ⁽¹⁾	
		<i>Plantago major</i>	<i>Plantago lanceolata</i>
Soxhlet	Hexano	$3,9 \pm 0,2^c$	$1,79 \pm 0,01^d$
	Diclorometano	$2,13 \pm 0,09^f$	-
	Acetato de etila	$3,31 \pm 0,03^{ef}$	-
	Etanol	$11,6 \pm 0,1^d$	18 ± 2^b
	Metanol	$18,3 \pm 1,2^b$	$23,1 \pm 0,3^a$
Ultrassom	Hexano	$1,5 \pm 0,2^f$	$0,67 \pm 0,07^d$
	Diclorometano	$1,58 \pm 0,05^f$	-
	Acetato de etila	$1,46 \pm 0,08^f$	-
	Etanol	$4,5 \pm 0,5^e$	$2,88 \pm 0,01^d$
	Metanol	$11,1 \pm 0,4^d$	$12,1 \pm 0,7^c$
	Água/Etanol (30/70)	$16,7 \pm 0,2^c$	23 ± 2^a
	Água/Etanol (50/50)	$20,5 \pm 0,8^a$	-

⁽¹⁾ média \pm desvio padrão (n=2); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

Como pode ser observado na Tabela 6, tanto para a *P. major* como para a *P. lanceolata*, o emprego de misturas hidroalcoólicas e de metanol como solventes proporcionaram os maiores rendimentos em ambas as técnicas avaliadas. Segundo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), um método adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico, que é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes das plantas com bebidas alcoólicas. Além disso, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois causa o rompimento da membrana celular, possibilitando a extração de um maior número de compostos. De acordo com Kartini et al. (2014), os solventes frequentemente utilizados na extração de *P. major* são água e metanol.

A utilização dos solventes metanol, água/etanol (30/70) e água/etanol (50/50) resultou nos maiores rendimentos em ambas as técnicas de extrações (polaridade 6,6; 6,3; e 7,1; respectivamente). A solubilidade de diferentes compostos naturais varia de acordo com os solventes empregados, por exemplo, solutos polares são solúveis em solventes polares como metanol, etanol, água, etc.; e solutos apolares dissolvem-se em solventes apolares como hexano, benzeno, ciclohexano, tolueno, etc. A solubilidade dos compostos naturais geralmente aumenta com o aumento nos índices de polaridade (JADHAV et al., 2009).

Comparando as técnicas de extração para um mesmo solvente pode-se verificar que maiores rendimentos foram obtidos quando utilizado a técnica Soxhlet (Tabela 6). Nessa técnica, a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação, o que não ocorre no processo de extração em ultrassom. Além disso, o tempo de extração (6 h) e a temperatura do solvente (temperatura de ebulição) dessa técnica foram superiores as empregadas na técnica de ultrassom (45 min, temperatura ambiente). O uso de temperaturas mais elevadas reduz a tensão superficial e viscosidade do solvente quando comparado com temperaturas mais baixa, possibilitando ao solvente alcançar sítios ativos dentro da matriz com maior facilidade, e dessa forma, solubilizar um número maior de solutos (MARKOM et al., 2007). A ação conjunta desses fatores pode ter proporcionado uma extração mais exaustiva das amostras submetidas a técnica de Soxhlet em comparação ao ultrassom e, com isso, diferenças nos valores de rendimento.

O aumento dos rendimentos de extração de *P. major* nas extrações assistidas por ultrassom utilizando misturas de água e etanol pode estar relacionado a influência da concentração de água na cavitação do líquido. Durante o processo de extração os gases são adsorvidos nos poros das partículas. Na etapa de compressão os gases, no interior da cavidade, são comprimidos para o interior da partícula, e na etapa de expansão esses gases ou vapores são dirigidos para fora da partícula. (MARTINES et al., 2000).

Alguns trabalhos publicados na literatura apresentam valores de rendimentos de extrações de plantas do gênero *Plantago*. Gálvez et al. (2005), estudaram a atividade antioxidante de extratos de espécies de *Plantago* obtidos em Soxhlet. Os rendimentos verificados pelos autores das extrações empregando metanol por 48 h foram de 18,04% para *P. afra* e de 29,13% para *P. lanceolata*.

Stanisavljevic et al. (2008) estudaram a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas de *P. major* obtidos por ultrassom e maceração com etanol 70%. Os rendimentos de extração por ultrassom foram superiores aos obtidos por maceração. Kartini et al. (2014) obtiveram um valor de rendimento de extração de folhas de *P. major* por maceração com metanol de aproximadamente 18%. Na extração em Soxhlet com diclorometano por 6 h de *P. major*, Stenholm; Göransson; Bohlin, (2013), obtiveram um rendimento de 2,9%.

Ao realizar qualquer pesquisa envolvendo plantas deve-se tomar cuidado ao extrapolar os resultados obtidos. De acordo com Freitas et al. (2004), a produção de metabólitos secundários ocorre em função da interação planta *versus* ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Este fato pode explicar resultados de rendimento e atividade biológica divergentes de extratos da mesma espécie, coletadas em locais e períodos diferentes.

4.1.2. Extração com solvente supercrítico

4.1.2.1. Caracterização do leito de extração

O teor de umidade das amostras foi de $12,5 \pm 0,2\%$ para a *P. major* e $8,0 \pm 0,4\%$ para a *P. lanceolata*. Na Tabela 7 estão apresentados o diâmetro médio de partícula, massa específica real, massa específica aparente e porosidade do leito das amostras de *P. major* e *P. lanceolata*, conforme descrito nas seções 3.1.4, 3.1.5 e 3.1.6, respectivamente. O conhecimento das características das partículas, bem como do leito de extração é importante para o entendimento dos mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração, quando estes são avaliados por modelos matemáticos.

Tabela 7 - Caracterização do leito de extração de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*.

Planta	Diâmetro médio das partículas	Massa específica real (g cm ⁻³)	Massa específica aparente (g cm ⁻³)	Porosidade do leito (ε)
<i>P. major</i>	0,22	1,70	2,65	0,56
<i>P. lanceolata</i>	0,21	1,45	2,35	0,62

4.1.2.2. Determinação da cinética de extração

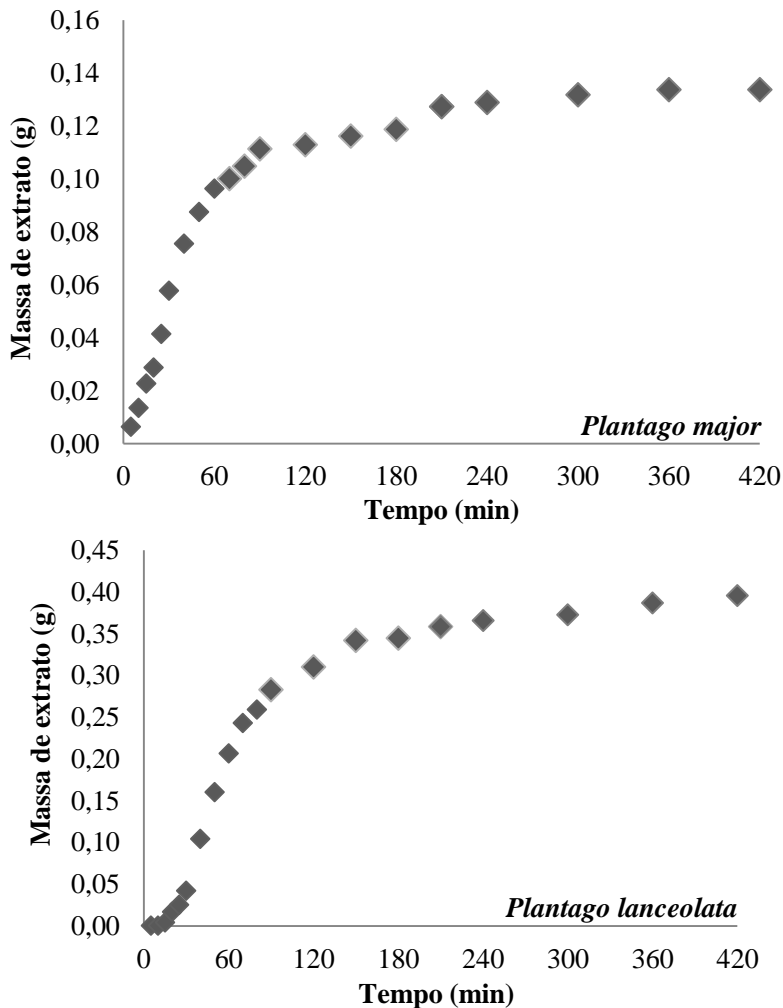
A cinética de um processo de extração pode ser avaliada pela determinação da quantidade de extrato (massa de extrato ou rendimento) como função do tempo do processo (ou consumo de solvente), o que fornece uma curva global de extração. As curvas de extração de *P. major* e *P. lanceolata* foram construídas para a condição de 50 °C e 20 MPa e estão representadas na Figura 10. A vazão de solvente empregada nas extrações foi de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$. A pressão e temperatura empregadas para a determinação da cinética de extração foram selecionadas por serem as condições intermediárias do planejamento experimental. A determinação do tempo de extração é necessária para a avaliação da influência das condições de temperatura e pressão empregadas na determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico, sendo definido com base nas etapas da curva de extração.

Como citado na seção 2.1.3.2 do Capítulo 3, a curva de extração pode ser dividida em três etapas: etapa de velocidade constante de extração (CER), etapa de velocidade decrescente de extração (FER) e o processo difusional. Nas determinações do rendimento de extração (X_0), o tempo de extração utilizado foi o necessário para assegurar que o período difusional fosse alcançado (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Pela análise do comportamento das curvas de extração (Figura 10), verifica-se que as etapas de extração podem ser distinguidas tornando possível o ajuste simultâneo de três retas aos dados experimentais, visando a determinação dos parâmetros cinéticos da extração. A inclinação da primeira reta representaria a velocidade de transferência de massa da etapa CER (M_{CER}). O tempo correspondente à intersecção entre as duas primeiras retas é o t_{CER} , o qual pode representar o tempo mínimo de duração de um ciclo de ESC; o tempo de intersecção entre a segunda e terceira retas é o t_{FER} , que em geral, representa a duração máxima que um ciclo de ESC pode ter para manter a viabilidade econômica do processo (MEIRELES, 2007).

A avaliação do comportamento cinético da extração permite a obtenção de parâmetros que levam às melhores condições operacionais para o processamento da matéria-prima. Os parâmetros cinéticos de cada um dos períodos, obtidos a partir da Figura 10, estão apresentados na Tabela 8 para as extrações a partir de *P. major* e *P. lanceolata*. Os parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa

de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) foram determinados pela regressão linear dos dados obtidos nas curvas de extração (Figura 10).

Figura 10 - Curvas de extração com fluido supercrítico de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* a 20 MPa, 50 °C e $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$ de CO_2 .



O período CER para a *P. major* ocorre entre 0 e 60 minutos, o período FER está compreendido entre 90 e 210 minutos e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 210 minutos. O tempo necessário para que a etapa difusiva seja alcançada é de aproximadamente 3,5 horas (210 min), sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de rendimento (X_0) devido à extração da maior parte de soluto disponível. Este tempo e vazão de solvente implicam em um consumo de 1680 g de CO₂ por extração ($m_{\text{solvente}}/M = 112 \text{ kg CO}_2/\text{kg amostra}$). Na etapa CER, cerca de 83% do extrato foi recuperado, enquanto que ao final da etapa FER recuperou-se 96% do extrato. Dessa forma, com o tempo definido de extração em 210 min, estimou-se que 96% do extrato foi recuperado.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico de *Plantago major* (PM) e *Plantago lanceolata* (PL) a 20 MPa, 50 °C e 8 ± 2 g min⁻¹ de CO₂.

Parâmetro	Período de extração					
	CER ⁽⁶⁾		FER ⁽⁷⁾		Difusional	
	PM	PL	PM	PL	PM	PL
t ⁽¹⁾	0-60	0-90	60-210	90-210	>210	>210
m ⁽²⁾	0,1113	0,2829	0,0176	0,0755	0,0048	0,0296
X ₀ ⁽³⁾	0,74	0,94	0,12	0,25	0,03	0,09
M ⁽⁴⁾	0,0018	0,0031	0,00011	0,00063	0,00002	0,00014
Y ⁽⁵⁾	0,00023	0,00059	-	-	-	-

⁽¹⁾t: duração da etapa de extração (min); m⁽²⁾: massa de extrato aproximada (g); X₀⁽³⁾: rendimento da etapa (%); M⁽⁴⁾: taxa de extração (g min⁻¹); Y⁽⁵⁾: concentração de soluto na fase solvente (kg kg⁻¹); CER⁽²⁾ etapa de extração constante; FER⁽⁷⁾ etapa de extração decrescente.

Na extração de *P. lanceolata* o período CER ocorre entre 0 e 90 minutos, o período FER está compreendido entre 90 e 210 minutos e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 210 minutos. O tempo necessário para que a etapa difusiva seja alcançada é de aproximadamente 3,5 horas, sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de rendimento (X_0) devido à extração da maior parte de soluto disponível. Este tempo e vazão de solvente implicam em um consumo de 1680 g de CO₂ por extração ($m_{\text{solvente}}/M = 56 \text{ kg CO}_2/\text{kg amostra}$). Na etapa CER, cerca de 73% do extrato foi recuperado, enquanto que ao final da etapa FER recuperou-se 92% do extrato. Dessa forma, com o

tempo definido de extração em 210 min, estimou-se que 92% do extrato foi recuperado.

4.1.2.3. Rendimento de extração

O rendimento global da extração para o processo de ESC em leite fixo de partículas e método dinâmico de extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado (SOVOVÁ, 1994). A Tabela 9 apresenta os resultados médios de rendimento global de extração (X_0) dos experimentos realizados por ESC com *P. major* e *P. lanceolata* e as condições de temperatura e pressão utilizadas nos ensaios. Os dados correspondentes de massa específica (ρ) do CO₂ também estão apresentados na Tabela 9 (ANGUS; ARMSTRONG; REUCK, 1976).

De forma geral, o rendimento de um soluto e a seletividade, os quais são fortemente dependentes da solubilidade, são determinadas pela temperatura e pressão de operação. O maior rendimento para a ESC de *P. major* foi verificado na condição de 30 MPa e 60 °C, sendo estatisticamente igual ao obtido na condição de 30 MPa e 50 °C. O menor rendimento global de extração foi verificado na condição de 10 MPa e 60 °C, sendo estatisticamente igual aos valores obtidos na condição de 10 MPa nas temperaturas de 40 e 50 °C.

A temperatura e a pressão são fatores que afetam tanto o rendimento de extração como a classe de compostos extraídos. Na Tabela 9 é possível observar que, a temperatura constante, são obtidos maiores rendimentos de extração com o aumento da pressão. Por exemplo, para a condição isotérmica de 60 °C, o rendimento aumenta de $0,57 \pm 0,02\%$ para $0,99 \pm 0,01\%$ quando a pressão de operação é elevada de 10 para 30 MPa. O poder de solvatação do solvente supercrítico é afetado pela pressão e temperatura de operação devido a sua ação na densidade do solvente. Como regra geral, à pressão constante, um aumento de temperatura diminui a densidade do solvente e seu poder de solvatação, enquanto que a temperatura constante, um aumento da pressão aumenta a densidade do fluido supercrítico (BRUNNER, 1994). Dessa forma, o aumento no rendimento de extração de *P. major* a temperatura constante pode ser atribuído ao aumento da densidade do fluido supercrítico decorrente do aumento da pressão.

Tabela 9 - Rendimento globais (X_0) obtidos por extração supercrítica de *Plantago major* e *P. lanceolata* em diferentes condições de temperatura (T) e pressão (P).

T (°C)	P (MPa)	ρ CO ₂ (g cm ⁻³)	Rendimento (%) ⁽¹⁾	
			<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
40	10	0,629	0,62 ^c ± 0,01	-
40	20	0,840	0,8 ^b ± 0,1	-
40	30	0,911	0,87 ^{ab} ± 0,04	-
50	10	0,385	0,59 ^c ± 0,02	-
50	20	0,785	0,81 ^b ± 0,02	1,15 ^b ± 0,08
50	30	0,871	0,97 ^a ± 0,03	1,8 ^a ± 0,2
60	10	0,295	0,57 ^c ± 0,02	-
60	20	0,724	0,80 ^b ± 0,02	1,2 ^b ± 0,1
60	30	0,830	0,99 ^a ± 0,01	1,21 ^b ± 0,07

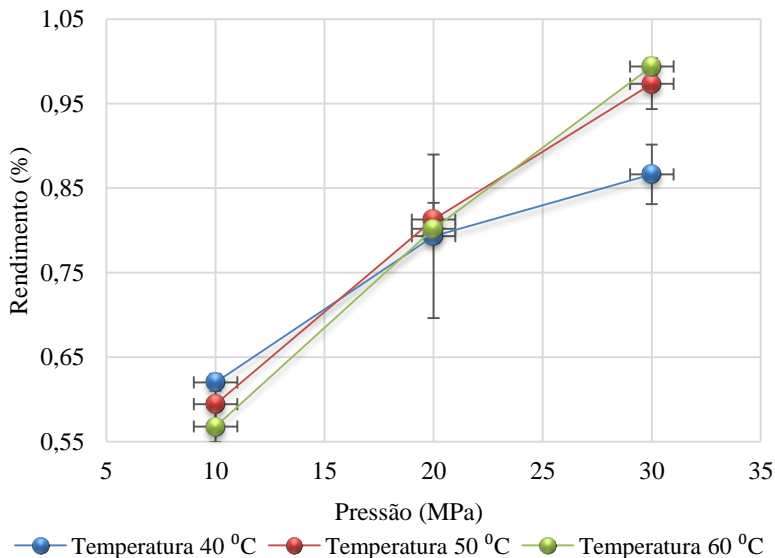
⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=2); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A solubilidade dos solutos no solvente supercrítico é dependente, além dos fatores temperatura e pressão, da massa molecular, polaridade e pressão de vapor dos solutos. Dessa maneira, o efeito da temperatura na solubilidade é complexo devido à combinação de dois fatores: o incremento na temperatura aumenta a pressão de vapor do soluto, aumentando sua solubilidade no solvente supercrítico, no entanto, ao mesmo tempo ocasiona a diminuição da densidade do solvente. Os efeitos antagônicos da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto podem ser observados na Figura 11, a qual apresenta as isotermas de rendimento do extrato de *P. major* em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os resultados da Tabela 9, para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C.

Em baixas pressões a solubilidade diminui com o aumento da temperatura uma vez que a densidade do solvente decresce rapidamente com o aumento da temperatura; a altas pressões as mudanças de densidade com a temperatura são mais discretas, de modo que o aumento na pressão de vapor causado pelo aumento de temperatura torna-se mais importante do que a ligeira diminuição de densidade (BRUNNER, 1994). Esses dois efeitos ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação, que é resultado da predominância de um

dos dois fatores (MICHIELIN et al., 2005). Como pode ser observado na Figura 11, nas proximidades de 15 - 25 MPa há convergência das isotermas (pressão de inversão), e então, à pressões mais elevadas, o rendimento global aumenta com a temperatura.

Figura 11 - Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC de *Plantago major*.



Na Tabela 9 também estão apresentados os rendimentos globais de extração (X_0) da ESC de *P. lanceolata*. O maior rendimento de extração para a ESC de *P. lanceolata* foi verificado na condição de 30 MPa e 50 °C ($1,8 \pm 0,2\%$). O menor rendimento global de extração foi verificado na condição de 20 MPa e 50 °C, sendo estatisticamente igual aos valores obtidos na condição de 60 °C e pressões de 20 e 30 MPa. Comparando as duas espécies de *Plantago* verifica-se que para todas as condições testadas a *P. lanceolata* apresentou valores de rendimentos superiores aos obtidos para *P. major*. Esses resultados podem estar relacionados, entre outros fatores, pela diferença de massa de amostra

utilizada para a formação do leito de partículas (15 g para a *P. major* e 30 g para a *P. lanceolata*).

Stenholm, Göransson e Bohlin, (2013) avaliariam a extração supercrítica de folhas de *P. major* e o maior rendimento obtido foi 0,7%, verificado para a condição de 48,3 MPa, 75 °C e tempo de extração de 100 min. As condições avaliadas pelos autores são distintas das empregadas no presente trabalho, embora os valores de rendimento de extração obtidos são da mesma ordem de grandeza.

4.1.2.4. Emprego de cossolvente

Nos processos de extração supercrítica do dióxido de carbono é o solvente mais utilizado. Do ponto de vista da extração de compostos bioativos de produtos naturais, a principal desvantagem do CO₂ é sua baixa polaridade, o que limita seriamente sua habilidade de extrair compostos de maior polaridade, como são a maioria das substâncias com propriedades antioxidantes. Como muitas outras substâncias, sua constante dielétrica pode ser alterada com a densidade, no entanto mesmo em altas densidades, apresenta limitada habilidade em solubilizar compostos de maior polaridade (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Com o objetivo de aumentar o rendimento de extração de compostos polares fez-se o uso de um modificador. A adição de modificadores ao CO₂ supercrítico pode aumentar o rendimento de extração, uma vez que aumenta a solubilidade dos compostos presentes na matriz sólida e também aumenta o número de componentes solubilizáveis (HERRERO et al., 2010). A definição das condições de extração supercrítica a serem empregadas utilizando cossolvente foi realizada com base no rendimento obtido utilizando CO₂ e também pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos (resultados apresentados no item 4.3 do Capítulo 3). Sendo assim, as condições de 50 °C/30 MPa e 60 °C/20MPa foram selecionadas para os ensaios de cossolvente com *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente, sendo adicionando etanol nas frações de 2,5, 5,0 e 10% em relação à massa de CO₂ utilizada, baseado em outros estudos já realizados com adição de modificadores à extração supercrítica realizados no LATESC (ANDRADE et al., 2012; BENELLI et al., 2010; MAZZUTTI et al., 2012; MICHIELIN et al., 2009).

O etanol foi selecionado como cossolvente ao CO₂ na ESC devido à sua baixa toxicidade, por ser comumente utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica e também devido à sua maior facilidade de eliminação dos extratos por meio de rotaevaporação. Devido aos bons resultados de atividade antioxidante apresentados pelo solvente metanol (resultados apresentados na seção 4.3 do Capítulo 3), realizou-se uma extração supercrítica de *P. major* com 5,0% desse solvente para fins de comparação com os resultados obtidos com etanol.

Os resultados em termos de rendimento global de extração (X_0) com cossolvente para a *P. major* estão representados na Figura 12. A adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica com CO₂ elevou os valores de rendimento global. A adição de 10% de cossolvente proporcionou um incremento de 2,3 vezes o rendimento obtido em relação ao uso de CO₂ puro. O rendimento obtido com o uso de metanol foi estatisticamente igual ao obtido com a mesma fração de etanol ($p > 0,05$). Dessa forma, avaliando o processo com base no rendimento obtido, deve-se usar etanol, já que é um solvente GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

A Figura 13 representa o rendimento global de extração com o uso de etanol como cossolvente na extração supercrítica de *P. lanceolata*. De forma similar as extrações com modificadores de *P. major* (Figura 12), a adição de cossolvente ao processo de extração supercrítica com CO₂ elevou o rendimento global. O maior rendimento foi verificado quando adicionados 10% de cossolvente, proporcionando um incremento de 2,3 vezes no rendimento obtido em relação ao uso de CO₂ puro.

Este comportamento se deve a maior solubilização de compostos polares na mistura cossolvente/CO₂, o que não ocorre quando se utiliza apenas o CO₂, reduzindo assim a seletividade do processo e aumentando o rendimento de extração. Segundo Pereira e Meireles (2010), esse efeito pode ser atribuído também a dois mecanismos: interação entre o cossolvente e o soluto e ao inchamento da matriz, o que facilita o contato entre solvente e soluto.

Stenholm, Göransson e Bohlin (2013) avaliaram a extração supercrítica de *P. major* com o uso de 10% de etanol como cossolvente e o rendimento foi de 1,2%, obtido na condição de 48,3 MPa, 75 °C e tempo de extração de 100 min. O uso do cossolvente aumentou em 1,7 vezes o rendimento de extração, sendo inferior ao verificado no presente trabalho (2,3 vezes para as duas espécies de *Plantago*). Essa diferença pode ser

atribuída a diversos fatores, que vão desde a matéria prima (fatores genéticos e ambientais, partes utilizadas e processamento) e diferenças na metodologia de extração empregada.

Figura 12 - Rendimentos globais (X_0) para os extratos de *Plantago major* utilizando etanol e metanol como cossolventes a 30 MPa, 50 °C e vazão de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$.

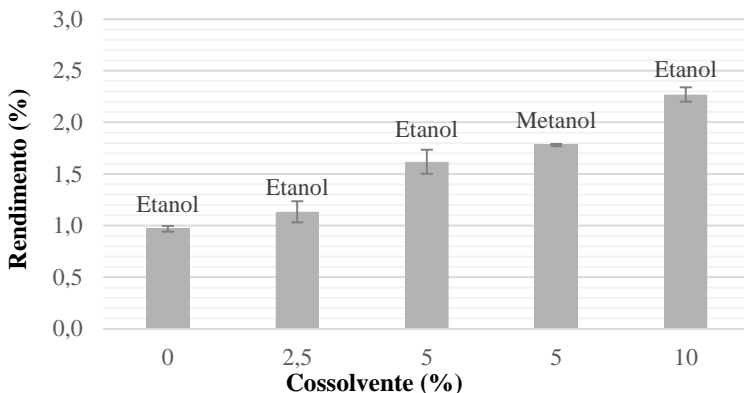
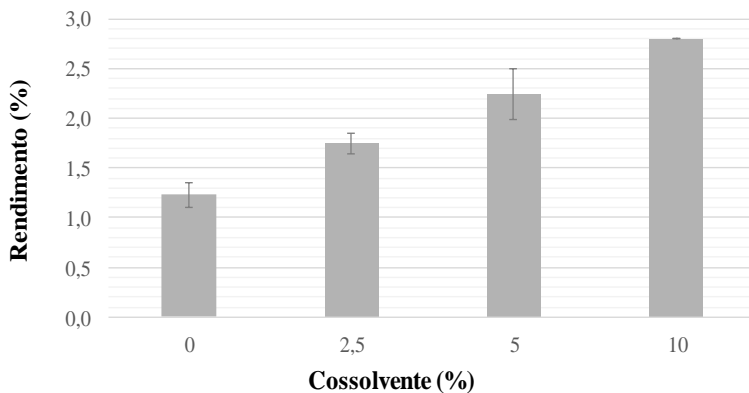


Figura 13 - Rendimentos globais (X_0) para os extratos de *Plantago lanceolata* utilizando etanol como cossolvente a 20 MPa, 60 °C e vazão de $8 \pm 2 \text{ g min}^{-1}$.



4.2. Teor de compostos fenólicos totais (TFT)

Os valores encontrados para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por extração em Soxhlet, ultrassom e ESC estão apresentados na Tabela 10. A curva analítica de ácido gálico, utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais consta no Apêndice I.

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas que apresentam grande diversidade de estruturas, incluindo moléculas simples como vanilina, ácido gálico e ácido cafeico, e polifenóis como estilbenos, flavonoides e polímeros derivados desses vários grupos (CHEYNIER, 2012). Na identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais, muitas vezes é necessária a realização da extração com solventes de polaridades diferentes, já que a atividade dessas substâncias depende dos compostos fenólicos presentes na matriz. De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade.

Comparando as técnicas de extração a baixa pressão pode-se verificar que para a maioria dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* o teor de compostos fenólicos totais obtidos por Soxhlet foi superior ao obtido por ultrassom. Isso pode estar relacionado com o fato de que nesse trabalho a extração em Soxhlet foi realizada de forma mais exaustiva do que a técnica de ultrassom, uma vez que no Soxhlet ocorria a renovação do solvente e na técnica de ultrassom não, o que pode ter levado a saturação do meio. Stanisavljevic et al. (2008) verificaram em seu trabalho que a técnica de maceração apresentou melhores resultados em termos de compostos fenólicos de *P. major* do que o ultrassom.

O emprego de solventes de maior polaridade proporcionou a extração de maiores teores de compostos fenólicos para *P. major* e *P. lanceolata*, tanto nas extrações em Soxhlet como ultrassom, confirmando o caráter polar desses compostos. A mistura de etanol e água revelou-se como mais eficiente do que etanol puro na extração de compostos fenólicos quando utilizada uma concentração de 30% de água. No entanto, a mistura de 50% de água proporcionou uma extração de compostos fenólicos de *P. major* estatisticamente maior a extração com etanol puro (Tabela 10). Os resultados obtidos estão em acordo com (YILMAZ; TOLEDO, 2006) que realizaram extrações de óleo de semente

de uva a 60 °C durante 5 horas, empregando etanol e volumes de água variando entre 0 e 60%. Os autores verificaram que o teor de fenóis aumentou com o emprego de até 30% de água, mantendo-se constante até a concentração de 50%, e reduzindo quando utilizado concentrações maiores de água.

Tabela 10 - Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico para os extratos *Plantago major* e *Plantago lanceolata*.

Técnica de extração	Solvente	TFT (mg GAE g ⁻¹) ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
Soxhlet	Hexano	5,5 ^{ijkl} ± 0,9	11 ^e ± 1
	Diclorometano	21 ^h ± 2	-
	Acetato de etila	76 ^f ± 4	-
	Etanol	82 ^e ± 3	65,5 ^a ± 0,9
	Metanol	99 ^d ± 2	49 ^b ± 2
Ultrassom	Hexano	2,5 ^l ± 0,3	11 ^e ± 2
	Diclorometano	9,7 ⁱ ± 0,9	-
	Acetato de etila	28 ^g ± 2	-
	Etanol	112 ^b ± 3	35 ^d ± 3
	Metanol	79 ^{ef} ± 6	42,7 ^c ± 0,9
	Água/Etanol (30/70)	121 ^a ± 6	33 ^d ± 0,9
	Água/Etanol (50/50)	107 ^c ± 2	-
ESC 10 MPa/40°C	CO ₂	2,1 ^l ± 0,3	-
ESC 10 MPa/50°C	CO ₂	3,5 ^k ± 0,6	-
ESC 10 MPa/60 °C	CO ₂	4,1 ^{jk} ± 0,6	-
ESC 20 MPa/40°C	CO ₂	3,0 ^l ± 0,6	-
ESC 20 MPa/50°C	CO ₂	6,1 ^{ijkl} ± 0,9	2,6 ^{fg} ± 0,5
ESC 20 MPa/60°C	CO ₂	8,4 ^{ij} ± 0,6	-
ESC 30 MPa/40°C	CO ₂	7,5 ^{ijk} ± 0,9	-
ESC 30 MPa/50°C	CO ₂	-	2,5 ^g ± 0,3
ESC 30 MPa/60°C	CO ₂	16,5 ^h ± 0,9	4,9 ^f ± 0,7

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05).

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos *P. major* obtidos por ESC não apresentou uma tendência de variação com a mudança da pressão ou da temperatura. Os valores do teor de compostos fenólicos totais variaram entre $2,1 \pm 0,3$ e $16,5 \pm 0,9$ mg GAE g⁻¹. Para a *P. lanceolata*, os valores do teor de compostos fenólicos totais variaram entre $2,6 \pm 0,5$ e $4,9 \pm 0,7$ mg GAE g⁻¹. Como pode ser observado na Tabela 10, os teores de compostos fenólicos totais obtidos por ESC foram inferiores aos obtidos quando utilizados solventes de maior polaridade nos métodos a baixa pressão.

O teor de compostos fenólicos encontrados por STANISAVLJEVIC et al. (2008) para as folhas secas de *P. major* obtidas pela técnica de ultrassom utilizando etanol 70% foi de 58,7 mg GAE g⁻¹. Kobeasy et al. (2011) avaliaram o teor de compostos fenólicos de extratos aquosos de folhas e sementes de *P. major*, encontrando 13,05 e 7,43 mg GAE g⁻¹, respectivamente. No presente trabalho, o teor de compostos fenólicos obtidos para o extrato hidroalcoólico (água/etanol 30/70, v/v) obtido pela técnica de ultrassom foi superior aos demais estudos, sendo de 121 mg GAE g⁻¹. Essa diferença pode ser atribuída tanto a genética (variação dentro e entre as espécies de plantas) bem como fatores ambientais que incluem fase de crescimento, cultivo do solo, parâmetros como luz, água, temperatura e nutrientes, estresse causado por micro-organismos e agentes químicos, secagem e armazenagem do produto (KABGANIAN et al., 2003).

A utilização de cossolventes no processo de extração supercrítica de *P. major* proporcionou um acréscimo de até 3,9 vezes no teor de compostos fenólicos extraídos em relação a mesma condição com apenas CO₂, conforme pode ser observado na Tabela 11. O maior teor de compostos fenólicos foi obtido quando adicionado 5% de metanol, seguido pelo uso de 5% de etanol.

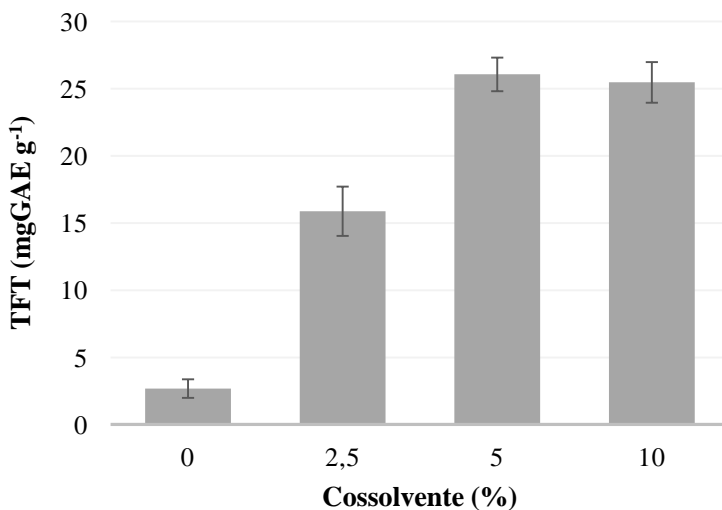
A Figura 14 representa o teor de compostos fenólicos totais obtido por extração supercrítica de *P. lanceolata* utilizando etanol como modificador. De forma similar a *P. major*, a utilização de etanol no processo de extração proporcionou um acréscimo de até 8,5 vezes no teor de compostos fenólicos extraídos em relação a mesma condição sem o uso de um modificador. Os maiores valores do teor de compostos fenólicos totais foram obtidos quando adicionados frações de 5 e 10%, não diferindo estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 11 - Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico, para os extratos de *Plantago major* obtidos por extração supercrítica com cossolvente a 30 MPa e 50 °C.

Cossolvente	Fração cossolvente (m/m)	TFT (mg GAE g ⁻¹) ⁽¹⁾
-	-	11,5 ^e ± 0,7
Etanol	2,5	20 ^d ± 1
Etanol	5	26 ^b ± 1
Etanol	10	23 ^c ± 1
Metanol	5	57 ^a ± 2

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p>0,05).

Figura 14 - Teor de compostos fenólicos totais (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico, para os extratos de *Plantago lanceolata* utilizando etanol como cossolvente a 60 °C e 20 MPa.



Quando utilizados maiores quantidades de cossolvente pode ocorrer um favorecimento das interações soluto/cossolvente, aumentando o rendimento de extração (HOLLENDER et al., 1997). Embora os maiores rendimentos de extração das duas espécies de *Plantago* avaliadas tenham sido verificados nas extrações supercríticas utilizando 10 % de etanol, os extratos mais ricos em compostos fenólicos foram obtidos

utilizando a fração de 5 % de cossolvente. Esses resultados sugerem que na extração com 10 % de cossolvente ocorreu a solubilização de um número maior de compostos, no entanto, o conteúdo de fenólicos extraídos se manteve constante em relação a extração com 5 % de cossolvente. Para avaliar esses compostos e sua composição, esses extratos deveriam ser analisados por cromatografia líquida.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante

4.3.1. Método do radical DPPH

A Tabela 12 apresenta os resultados da atividade antioxidante determinado através do método DPPH dos extratos *P. major* e *P. lanceolata* obtidos em Soxhlet, ultrassom e ESC. A atividade antioxidante foi apresentada em termos de EC₅₀, que expressa a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH. Para fim de comparação de resultados, utilizou-se os resultados obtidos por para o BHT, um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante, determinados com a mesma metodologia utilizada no presente trabalho.

Na presença de compostos antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron, tornando-se mais estável. Com isso, dá-se a redução da sua absorbância, e este processo pode ser avaliado visualmente, por meio da descoloração da solução contendo o DPPH e também com a utilização de espectrofotômetro. Quanto menor o valor de EC₅₀, maior a atividade antioxidante do extrato (SUCUPIRA et al., 2014).

A atividade antioxidante dos extratos obtidos pelos métodos Soxhlet e ultrassom das espécies de *Plantago* avaliadas aumentou com a polaridade dos solventes utilizados, o que confirma a afinidade dos compostos antioxidantes com os solventes polares (Tabela 12). Para a *P. major* e a *P. lanceolata* a maior atividade antioxidante foi verificada para os extratos obtidos por Soxhlet com etanol ($65,6 \pm 0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) e metanol ($126,4 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente. A mistura dos solventes água e etanol não proporcionou a extração de uma maior quantidade de compostos com atividade antioxidante comparada a utilização de etanol puro.

Tabela 12 - Atividade antioxidante dos extratos de *Plantago major* e *P. lanceolata* através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC₅₀).

Técnica de extração	Solvente	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
Soxhlet	Hexano	393 ^h ± 9	677 ^d ± 4
	Diclorometano	396 ^h ± 1	-
	Acetato de etila	102 ⁱ ± 1	-
	Etanol	65,6 ^m ± 0,6	136,2 ^f ± 0,2
	Metanol	80,8 ^{lm} ± 0,3	126,4 ^f ± 0,8
Ultrassom	Hexano	1057 ^{bc} ± 22	971 ^e ± 16
	Diclorometano	475 ^g ± 3	-
	Acetato de etila	314 ⁱ ± 3	-
	Etanol	96,3 ^{lm} ± 0,7	162 ^f ± 1
	Metanol	75,1 ^{lm} ± 0,3	142,0 ^f ± 0,9
	Água/Etanol (30/70)	157,1 ^j ± 0,5	156 ^f ± 3
	Água/Etanol (50/50)	149,1 ^j ± 0,8	-
ESC 10 MPa/40°C	CO ₂	1025 ^c ± 10	-
ESC 10 MPa/50°C	CO ₂	1069 ^b ± 12	-
ESC 10 MPa/60°C	CO ₂	1296 ^a ± 20	-
ESC 20 MPa/40°C	CO ₂	672 ^f ± 2	-
ESC 20 MPa/50°C	CO ₂	762 ^e ± 6	1393 ^a ± 65
ESC 20 MPa/60°C	CO ₂	759 ^e ± 24	-
ESC 30 MPa/40°C	CO ₂	906 ^d ± 16	-
ESC 30 MPa/50°C	CO ₂	-	1042 ^c ± 20
ESC 30 MPa/60°C	CO ₂	744 ^e ± 11	1119 ^b ± 15
BHT ⁽²⁾	-	261 ± 12	

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

A atividade antioxidante dos extratos de *P. major* obtidos por ESC não apresentou uma tendência de variação com a mudança da pressão ou da temperatura empregada na obtenção dos extratos. Este comportamento aleatório pode estar associado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, refletindo em

variações na atividade antioxidante, e também, a baixa afinidades dos compostos polares antioxidantes com o CO₂. Os valores da atividade antioxidante foram inferiores aos obtidos nas demais técnicas testadas, com valores de EC₅₀ variando entre 672 ± 2 e 1269 ± 20 µg mL⁻¹ (Tabela 12).

Os extratos de *P. lanceolata* obtidos por ESC também apresentaram atividades antioxidantes inferiores aos obtidos com solventes de maior polaridade nas técnicas de ultrassom e Soxhlet, com valores de EC₅₀ variando entre 1042 e 1393 µg mL⁻¹. A menor atividade antioxidante dos extratos obtidos por ESC pode estar associada à quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos. Como pode ser observado na Tabela 10, as extrações com CO₂ puro resultaram em valores menores de compostos fenólicos totais, uma vez que o CO₂, solvente apolar, não favorece a solubilização de tais compostos. O mesmo fato foi verificado por Benelli et al. (2010) na extração com fluido supercrítico de bagaço de laranja.

A Tabela 13 apresenta a avaliação da atividade antioxidante expressa através do EC₅₀ para os extratos de *P. major* utilizando etanol e metanol como cossolvente. O emprego dos modificadores promoveu um aumento na extração dos compostos antioxidantes. Como podem ser observados na Tabela 13, os resultados apresentaram diferenças significativas entre si (p < 0,05), sendo que o melhor resultado foi obtido quando empregado 5 % de etanol como cossolvente.

Tabela 13 - Atividade antioxidante dos extratos de *Plantago major* obtidos por ESC a 30 MPa e 50 °C com cossolvente através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50% (EC₅₀).

Cossolvente	Fração cossolvente (m/m)	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ⁽¹⁾
-	-	726 ^a ± 4
Etanol	2,5	396 ^c ± 2
Etanol	5	276 ^d ± 1
Etanol	10	387 ^c ± 3
Metanol	5	414 ^b ± 1
BHT ⁽²⁾		261 ± 12

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05).

⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

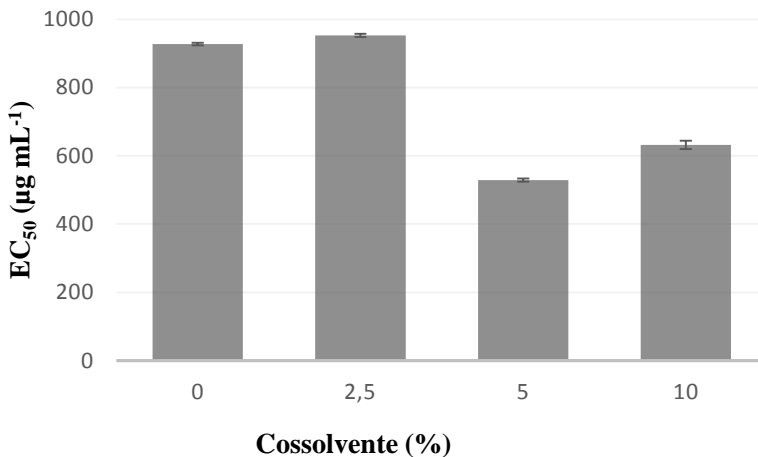
A Figura 15 apresenta a atividade antioxidante expressa através do EC_{50} para os extratos de *P. lanceolata* utilizando etanol como cossolvente. Como pode ser observado na Figura 15, a adição de etanol promoveu um aumento na extração dos compostos antioxidantes. O valor do EC_{50} verificado para o extrato obtido com a fração de 5% de etanol foi 2,6 vezes inferior ao valor de EC_{50} obtido na mesma condição com o uso de CO_2 puro.

O uso de 10% de cossolvente apresentou o maior rendimento de extração. No entanto, de forma similar ao teor de compostos fenólicos, os extratos com maior atividade antioxidante foram obtidos com o uso de 5,0% de cossolvente. Esses resultados se correlacionam, visto que os compostos fenólicos são uma das principais classes de compostos com atividade antioxidante.

Comparando os resultados apresentados ao antioxidante sintético usado como referência BHT, pode-se verificar que alguns extratos de *P. major* e *P. lanceolata* apresentaram valores de EC_{50} inferiores ou iguais ao verificado para o BHT. Isso demonstra a potente atividade antioxidante verificada para os extratos de *P. major* e *P. lanceolata*, inclusive do extrato de *P. major* obtido por ESC com o uso de 5% de etanol como cossolvente (276 ± 1).

Kartini et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante de folhas de *P. major* obtidas por maceração com metanol, obtendo um valor de EC_{50} de $263,57 \mu\text{g mL}^{-1}$. Gálvez et al. (2005) avaliaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de *P. lanceolata* obtidos por 48 h Soxhlet submetidos a uma lavagem com hexano e obtiveram um EC_{50} de $30,86 \mu\text{g mL}^{-1}$. A comparação dos resultados obtidos com trabalhos publicados é difícil, uma vez que as particularidades na obtenção dos extratos e metodologias podem resultar em valores diferentes. Além disso, os fatores genéticos, ambientais e processamento da matéria-prima interferem no conteúdo de compostos bioativos (KABGANIAN et al., 2003).

Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos de ESC a 60 °C e 20 MPa com cossolvente de *Plantago lanceolata* através do método DPPH, expressos através do EC₅₀.



4.3.2. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante dos extratos foi complementada com a utilização de outro método de avaliação. Na Tabela 14 estão apresentados os valores obtidos para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação, para os extratos de *P. major* e *P. lanceolata*.

No método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o β -caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, resultando na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isto ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β -caroteno e do ácido linoleico (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2014).

Tabela 14 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através do método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.

Técnica de extração	Solvente	% Inibição ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
Soxhlet	Hexano	86,0 ^a ± 0,6	42 ^a ± 4
	Diclorometano	87,8 ^a ± 0,6	-
	Acetato de etila	67,8 ^c ± 0,5	-
	Etanol	24,3 ^h ± 0,9	10,3 ^d ± 0,7
	Metanol	35 ^{de} ± 2	2,7 ^{fg} ± 0,7
Ultrassom	Hexano	83,6 ^{ab} ± 0,8	37,3 ^b ± 0,3
	Diclorometano	80,1 ^b ± 0,3	-
	Acetato de etila	68 ^c ± 2	-
	Etanol	26 ^{gh} ± 2	7,4 ^{de} ± 0,6
	Metanol	13 ^j ± 2	1,4 ^g ± 0,3
	Água/Etanol (30/70)	9 ⁱ ± 1	4,3 ^{efg} ± 0,7
	Água/Etanol (50/50)	10 ^j ± 1	-
ESC 10 MPa/40°C	CO ₂	18,6 ⁱ ± 0,9	-
ESC 10 MPa/50°C	CO ₂	34 ^{ef} ± 3	-
ESC 10 MPa/60°C	CO ₂	23 ^{hi} ± 2	-
ESC 20 MPa/40°C	CO ₂	39,3 ^d ± 0,4	-
ESC 20 MPa/50°C	CO ₂	39 ^d ± 3	-
ESC 20 MPa/60°C	CO ₂	29,7 ^{fg} ± 0,4	3,2 ^{fg} ± 0,6
ESC 30 MPa/40°C	CO ₂	30 ^{fg} ± 2	-
ESC 30 MPa/50°C	CO ₂	-	16,8 ^c ± 0,7
ESC 30 MPa/60°C	CO ₂	39,0 ^d ± 0,9	5,3 ^{ef} ± 0,1
BHT⁽²⁾	-	113 ± 7	

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

A atividade antioxidante dos extratos das espécies de *Plantago* obtidos nas extrações com solventes orgânicos em Soxhlet e ultrassom foi maior quando utilizados solventes de menor polaridade, como o hexano. Esses resultados eram esperados, visto que esta técnica é

adequada a sistemas de polaridade baixa. Comparando os resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 14) com os determinados para o antioxidante BHT, pode-se verificar que a atividade antioxidante dos extratos das espécies de *Plantago* avaliadas é inferior à do antioxidante sintético BHT.

Nas espécies de *Plantago* avaliadas, as extrações com CO₂ supercrítico apresentaram valores de percentual de inibição inferior aos obtidos com solventes de menor polaridade em Soxhlet e ultrassom. Além disso, não foi observada nenhuma tendência dos valores de atividade antioxidante com a temperatura e pressão. O percentual de atividade antioxidante verificada nas extrações de *P. major* variou entre $18,6 \pm 0,9$ e $39,3 \pm 0,4\%$ e de *P. lanceolata* entre $3,2 \pm 0,6$ e $16,8 \pm 0,7\%$.

A Tabela 15 apresenta a avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *P. major* obtidos com ESC com etanol e metanol como cossolvente através do método descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico. O emprego de etanol e metanol como cossolvente não promoveram um aumento da atividade antioxidante como observado no método do radical DPPH. O uso do etanol e metanol permite a solubilização de um maior número de compostos, no entanto, são solubilizados compostos de maior polaridade. Como verificado na Tabela 14, esse método de determinação de atividade antioxidante apresenta melhores resultados para compostos de menor polaridade.

Tabela 15 - Atividade antioxidante dos extratos de *Plantago major* obtidos com ESC a 30 MPa e 50 °C com cossolvente através do método descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.

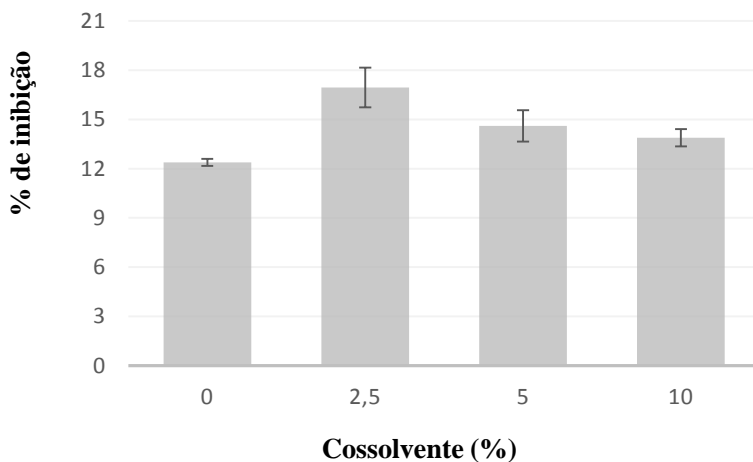
Cossolvente	Fração cossolvente (m/m)	% de inibição
-	-	38 ^a ± 3
Etanol	2,5	41 ^a ± 1
Etanol	5	37 ^a ± 6
Etanol	10	37 ^a ± 1
Metanol	5	30 ^b ± 1
BHT⁽²⁾		113 ± 7

⁽¹⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

⁽²⁾ Benelli et al. (2010).

A **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** representa a avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *P. lanceolata* obtidos com ESC com etanol como cossolvente através do método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A adição de maiores frações de cossolvente (5 e 10%) resultaram em atividades antioxidantes menores do que quando utilizado a fração de 2,5% de etanol. Comparando as duas espécies de *Plantago*, pode-se verificar que melhores resultados de atividade antioxidante determinada por esse método foram obtidos para a *P. major*.

Figura 16 - Atividade antioxidante dos extratos de *Plantago lanceolata* obtidos com ESC a 60 °C e 200 MPa com cossolvente através do método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.



A análise da atividade antioxidante das amostras de *P. major* e *P. lanceolata* determinadas pelos métodos DPPH e descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico demonstraram que essas ervas medicinais apresentam uma potente atividade antioxidante. Comparando os resultados obtidos com o antioxidante sintético BHT observa-se que alguns extratos apresentaram resultados comparáveis ou até melhores em termos de atividade antioxidante. Com base nesses resultados, pode-se verificar que tanto substâncias polares como apolares apresentam

atividade antioxidante, no entanto, as frações polares parecem ser mais relevantes e apresentam maiores rendimentos. A identificação química desses compostos é importante para a melhor interpretação dos resultados. No entanto, considerando o grande número de compostos químicos presentes, o mais provável é que a sua atividade antioxidante não seja atribuível a um único mecanismo específico, mas sim, o sinergismo entre esses compostos.

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

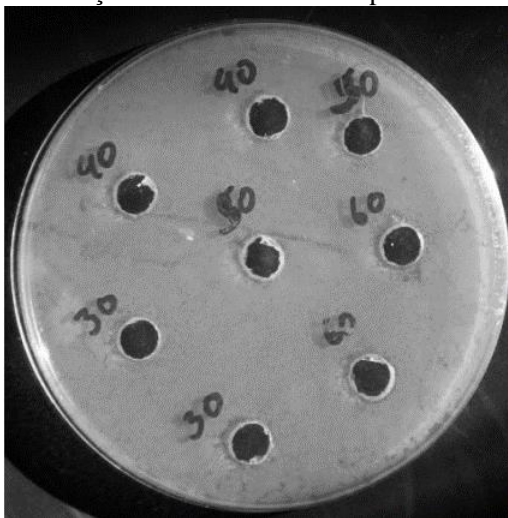
Atualmente, há um crescente interesse em encontrar compostos antimicrobianos naturais como uma alternativa às substâncias sintéticas, que são frequentemente utilizadas na indústria de alimentos. A atividade antimicrobiana dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por diferentes técnicas de extração foi determinada pelas técnicas de difusão em água e microdiluição em meio líquido (ÁVILA et al., 2008), frente a uma bactéria Gram-positiva (*Bacillus cereus*) e uma Gram-negativa (*Escherichia coli*).

As Figuras 17 e 18 ilustram fotos dos testes realizados previamente aos ensaios da atividade antimicrobiana com as espécies de *Plantago*. Na Figura 17 pode-se observar que não houve formação de halos de inibição para soluções de DMSO de até 60%. Na Figura 18 pode-se observar a formação de halos de inibição para solução de antibiótico cloranfenicol em uma placa de *B. cereus*.

As Tabelas 16 e 17 apresentam a concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente, obtidos por Soxhlet, ultrassom e ESC contra as bactérias citadas. De forma geral, não há um consenso sobre o nível aceitável de inibição de extratos quando comparado com padrões. De acordo com (SARTORATTO; MACHADO, 2004), (DUARTE et al., 2007) e (WANG et al., 2008) é possível classificar os materiais como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CMI apresentado pelos seus extratos. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e fraco inibidor para CMI acima de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (DUARTE et al., 2007; MICHIELIN et al., 2009; SARTORATTO; MACHADO, 2004; WANG et al., 2008).

Como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17, diversos extratos apresentaram concentrações mínimas inibitórias inferiores a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que permite classificá-los como fortes inibidores. Entre esses extratos, pode-se destacar os extratos de *P. major* obtido por ESC a 10 MPa e 40 °C e de *P. lanceolata* obtido por ESC a 20 MPa a 60 °C, os quais apresentaram valores de concentração mínima inibitória para *B. cereus* de 15,62 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

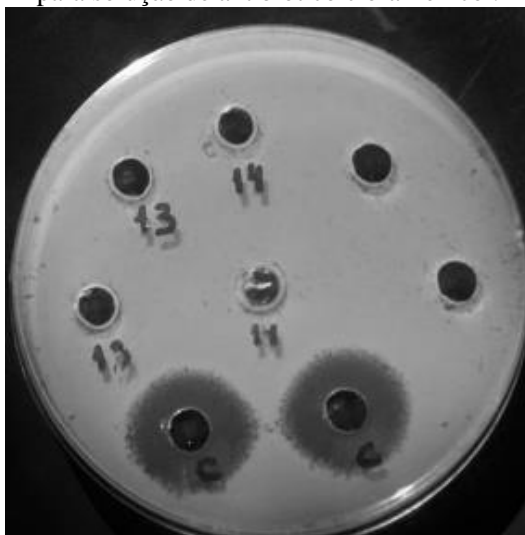
Figura 17 - Placa de teste apresentando ausência de halos de inibição para soluções de DMSO até 60% para *B. cereus*



Os extratos das espécies de *Plantago* obtidos por Soxhlet, ultrassom e extração supercrítica apresentaram maiores atividades antimicrobianas frente a bactéria *B. cereus* (Gram-positiva) em comparação a bactéria *E. coli* (Gram-negativa). A maioria dos antimicrobianos tem o espectro de ação limitado por causa da alta especificidade ou porque são ativos somente em altas concentrações (BRANEN; DAVIDSON, 2000). Geralmente, bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos agentes antimicrobianos, fato que pode ser explicado pela estrutura da parede celular que difere substancialmente das bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana exterior em torno da parede celular, o que restringe a difusão

dos compostos hidrofóbicos através do seu revestimento lipopolissacárido. A parede celular de bactérias Gram-positivas, que não possui uma membrana exterior, pode ser permeada com mais facilidade pelos constituintes dos extratos (TIAN et al., 2009). No entanto, isto não significa que as bactérias Gram-positivas são sempre mais susceptíveis (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Figura 18 - Placa de teste apresentando presença de halos de inibição para solução de antibiótico cloranfenicol.



Como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17, tanto o emprego de solventes polares como apolares proporcionaram a obtenção de extratos com atividade antimicrobiana. Os compostos ativos responsáveis pelas propriedades biológicas normalmente são os produtos do metabolismo secundário (óleos essenciais, polifenóis, terpenos). Os metabólitos secundários são definidos como produtos que, embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SIMOES, 2001). O mecanismo de ação, bem como os efeitos toxicológicos e sensoriais de antimicrobianos naturais não está completamente elucidado, embora a expressão da atividade seja frequentemente clara (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010;

TIWARI et al., 2009). Considerando o grande número de compostos químicos presentes, o mais provável é que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um único mecanismo específico (BURT, 2004).

Tabela 16 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *Plantago major* contra *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*.

Técnica de extração	Solvente	<i>B. cereus</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Soxhlet	Hexano	250	>1000
	Diclorometano	250	>1000
	Acetato de etila	250	>1000
	Etanol	250	1000
	Metanol	250	500
Ultrassom	Hexano	125	1000
	Diclorometano	250	250
	Acetato de etila	250	1000
	Etanol	500	250
	Metanol	1000	>1000
	Água/Etanol (30/70)	500	250
	Água/Etanol (50/50)	1000	>1000
ESC 10 MPa/40°C	CO ₂	15,62	1000
ESC 10 MPa/50°C	CO ₂	62,5	1000
ESC 10 MPa/60°C	CO ₂	62,5	>1000
ESC 20 MPa/40 C	CO ₂	250	>1000
ESC 20 MPa/50°C	CO ₂	62,5	>1000
ESC 20 MPa/60°C	CO ₂	125	>1000
ESC 30 MPa/40°C	CO ₂	125	>1000
ESC 30 MPa/50°C	CO ₂	125	>1000
ESC 30 MPa/60°C	CO ₂	62,5	>1000
ESC 30 MPa/50°C	2,5% etanol	125	>1000
ESC 30 MPa/50°C	5% etanol	125	>1000
ESC 30 MPa/50°C	5% metanol	250	>1000
ESC 30 MPa/50°C	10% etanol	125	>1000

Stanisavljevic et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *P. major* contra bactérias, fungos e leveduras. Os autores verificaram que os extratos obtidos por maceração e ultrassom foram mais efetivos contra leveduras, em comparação a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, não foram verificadas diferenças estatísticas no tamanho dos halos formados para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 17 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de *Plantago lanceolata* contra *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*.

Técnica de extração	Solvente	<i>B. cereus</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Soxhlet	Hexano	62,5	500
	Etanol	62,5	>1000
	Metanol	>1000	>1000
Ultrassom	Hexano	62,5	1000
	Etanol	62,5	500
	Metanol	125	500
	Água/Etanol (30/70)	125	1000
ESC 20 MPa/50°C	CO ₂	31,25	250
ESC 20 MPa/60°C	CO ₂	31,25	125
ESC 30 MPa/50°C	CO ₂	31,25	500
ESC 30 MPa/60°C	CO ₂	62,5	500
ESC 20 MPa/60°C	2,5% etanol	31,25	500
ESC 20 MPa/60°C	5% etanol	62,5	500
ESC 20 MPa/60°C	10% etanol	31,25	1000

As variações referentes aos valores de CMI de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNELL et al., 2004).

Em relação as técnicas de extração, pode-se verificar que os extratos obtidos por extração supercrítica apresentaram valores de concentração mínima inibitória inferior a ultrassom e Soxhlet. O uso de

cossolvente no processo de extração supercrítica das espécies de *Plantago* resultou na obtenção de valores de CMI iguais ou maiores do que quando utilizado apenas dióxido de carbono. Esse resultado está em acordo com os trabalhos que vêm sendo realizados no LATESC, onde diversas matérias primas têm mostrado que a extração supercrítica possibilita a obtenção de extratos com maior atividade antimicrobiana do que técnicas tradicionais de extração (BENELLI et al., 2010; KITZBERGER et al., 2007; MAZZUTTI et al., 2012; MICHIELIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013, 2016).

4.5. Caracterização química dos extratos por CG-EM

A determinação do perfil químico dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi realizada apenas para alguns extratos, selecionados em função dos resultados de rendimento e/ou atividade antioxidante e antimicrobiana. Assim, os extratos de *P. major* selecionados, obtidos pelas técnicas a baixa e a alta pressão, foram: Soxhlet com etanol, ultrassom com diclorometano, ESC a 100 MPa/60 °C, 200 MPa/50 °C, 300 MPa/60 °C e 300 MPa/50 °C com 5% de etanol como cossolvente. Os extratos de *P. lanceolata* selecionados foram: Soxhlet com etanol, ultrassom com hexano, ESC a 200 MPa/60 °C, 300 MPa/50 °C, 300 MPa/60 °C e 200 MPa/60 °C com 5% de etanol como cossolvente.

A Tabela 18 apresenta a lista dos componentes identificados nos extratos selecionados *P. major* obtidos pelas técnicas a baixa pressão (Soxhlet e ultrassom) e com CO₂ supercrítico. No total, 19 compostos foram identificados nos extratos de *P. major*. Na Tabela 19 estão apresentados os 21 compostos identificados nos extratos selecionados de *P. lanceolata*.

Os compostos identificados apresentam importantes atividades biológicas, o que pode sugerir a utilização dos extratos em variadas aplicações terapêuticas. Observando os resultados apresentados na Tabela 18 verifica-se que os compostos majoritários dos extratos de *P. major* identificados por CG-EM foram os ácidos palmíticos e α -linolênico e derivados, o α -sitosterol, o lupeol e o tetratriacontano. Nos extratos de *P. lanceolata* selecionados, cujos resultados estão apresentados na Tabela 19, os principais compostos identificados foram os ácidos palmíticos e α -linolênico e seus derivados, o α -sitosterol e o tetratriacontano.

Tabela 18 - Compostos identificados nos extratos de *P. major* avaliados por CG-EM.

	Composto	% Área					
		1	2	3	4	5	6
1	5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7a-trimetil- 2(4H)-benzofuranona dihidro- actinidiolida	-	0,32	-	0,53	0,40	-
2	Ácido palmítico	-	7,4	38,47	18,47	13,34	11,28
3	Ácido palmítico, etil éster	9,0	-	-	-	-	-
4	Fitol	-	0,37	-	-	-	-
5	2-metil-z,z-3,13-octadecadienol	-	-	5,78	-	-	-
6	Ácido α -linolênico, metil éster	17,2	-	-	-	-	5,83
7	Ácido α -linolênico	-	21,65	-	12,18	9,95	25,78
8	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	2,4	-	-	-	-
9	Pentatriacontano	-	-	2,23	-	0,59	-
10	Hexacosano	3,08	-	0,83	-	-	-
11	Tetatriacontano	4,05	5,67	12,13	11,41	12,5	0,96
12	Heptacosano	-	0,75	0,72	-	-	4,97
13	Campesterol	1,14	2,35	0,38	1,76	1,81	2,09
14	Estigmasterol	-	4,6	-	2,92	3,78	3,82
15	β -sitosterol	36,88	-	-	-	-	-
16	α -sitosterol	-	40,18	9,53	31,47	38,96	35,74
17	Lupeol	-	2,64	1,37	3,61	3,52	3,37
18	Acetato de lupeol	-	-	-	-	2,83	-
19	1-Heptatriacontanol	-	4,24	-	-	-	-

Onde: t_r - tempo de retenção; **1** - Soxhlet com etanol; **2** - ultrassom com diclorometano; **3** - ESC 100 MPa/60 °C; **4** - ESC 200 MPa/50 °C; **5** - ESC 300 MPa/60 °C; **6** - 300 MPa/50 °C com 5% de etanol.

Tabela 19 - Compostos identificados nos extratos de *P. lanceolata* avaliados por CG-EM.

	Composto	% Área					
		1	2	3	4	5	6
1	5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7a-trimetill-2(4H)-benzofuranona dihidro-actinidiolida	0,69	0,84	0,67	0,66	0,53	0,35
2	2-Ciclohexeno-1-one, 4-(3-hidroxi-1-butenil)-3,5,5-trimetil	0,55	0,82	0,64	0,4	-	0,43
3	n-Butilbenzenosulfonamida	0,26	0,34	-	-	-	-
4	Sorbitol	-	-	-	-	-	3,8
5	Ácido cerótico, metil éster	-	-	-	-	1,07	-
6	Ácido pentanóico, 14-metil-, metil éster	1,36	2,09	1,37	0,80	-	-
7	Ácido palmítico	26,1	25,0	26,72	20,35	21,16	17,2
8	Ácido oleico	-	-	-	0,35	-	-
9	Ácido palmítico, etil éster	-	-	-	6,13	-	6,42
10	Metil (8Z,11Z,14Z)-8,11,14-heptadecatrienoato	-	-	-	-	-	0,76
11	Fitol	-	-	-	0,6	-	2,6
12	Ácido α -linolênico, metil éster	4,3	47,5	49,6	2,14	3,57	29,45
13	Ácido α -linolênico	43,0	-	-	36,77	46,9	-
14	9,12(E,Z)-octadecadienoato de metila	-	-	-	-	-	4,03
15	Ácido α -linolênico, etil éster	-	-	-	13,9	-	13,3
16	Tritetracontano	-	0,88	-	0,78	-	-
17	Pentatriacontano	-	-	0,80	-	-	-
18	Tetratriacontano	6,3	4,6	3,58	2,6	7,86	-
19	Heptacosano	-	-	-	-	4,56	-
20	α -sitosterol	5	3,5	5,58	4,5	8,63	3,7

Onde: t_r - tempo de retenção; **1** – ESC 200 MPa/60 °C; **2** - ESC 300 MPa/50 °C; **3** - ESC 300 MPa/60 °C; **4** - ESC 200 MPa/60 °C com 5% de etanol; **5** - Soxhlet com etanol; **6** - ultrassom com hexan

Seifi et al. (2014) avaliaram por cromatografia gasosa o perfil químico do óleo da semente de *P. ovata* e verificaram que os compostos majoritários foram os ácidos palmítico e oleico.

O ácido palmítico é um ácido graxo que apresenta diversas atividades biológicas, como: antioxidante, hipocolesterolêmica, nematocida e pesticida (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015). O ácido α -linolênico é outro ácido graxo identificados nos extratos e apresenta as seguintes atividades biológicas: antiacne, anti-obesidade, antitumoral, imunomodulador e vasodilatador (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015). Além dessas atividades descritas, esses dois ácidos graxos apresentam atividade antimicrobiana, tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas (DESBOIS; SMITH, 2010; ZHENG et al., 2005; ZHOU et al., 2013).

O α -sitosterol, um composto esteroidal, foi identificado em extratos de ambas as espécies de *Plantago*. De acordo com a literatura, este composto apresenta atividade antidiabética, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-hiperlipidêmica (BALAMURUGAN; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011; VENKATA RAMAN et al., 2012). Entre as atividades atribuídas ao β -sitosterol estão: antibacteriana, anticancer, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e pesticida (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015).

O fitol, um diterpeno oxigenado, é um componente da clorofila das plantas detectado em vários extratos. Por ser um composto aromático é utilizado em muitas fragrâncias e cosméticos. Além disso, estudos relatam seu potencial uso como anticonvulsivo, antimicrobiano, antitumoral e anti-inflamatória (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015; VENKATA RAMAN et al., 2012).

O estigmasterol é descrito na literatura como um composto com atividade anti-inflamatória (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015; VENKATA RAMAN et al., 2012). O ácido pentanoico é descrito como um composto com atividade antioxidante (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015).

O luteol é um composto com atividade antiangiogênica, anti-inflamatória, antimalárica, antioxidante, antitumoral, antiviral e pesticida (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015). O campesterol apresenta atividade antioxidante e hipocolesterolêmica (DUKE; BECKSTROM-STERNBERG, 2015).

A forte atividade antimicrobiana verificada para os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* pode estar associada a presença dos vários compostos com atividade antimicrobiana identificados e descritos anteriormente, principalmente aos ácidos graxos α -linolênico e palmítico (e seus derivados) e o α -sitosterol. Além disso, a forte atividade antimicrobiana pode ser produto do sinergismo entre esses compostos. Os melhores resultados dos extratos de ESC em relação aos extratos de Soxhlet e ultrassom podem estar associados a ausência de oxigênio e luz durante o processo de extração, o que garante a preservação dos compostos (PALMA et al., 1999).

Observando as Tabelas 18 e 19 pode-se verificar que alguns compostos com atividade antioxidante foram identificados. No entanto, esses dados não se correlacionam diretamente com a potente atividade antioxidante dos extratos. A atividade antioxidante está provavelmente associada a esses compostos identificados e também à presença dos compostos fenólicos e flavonoides, os quais não foram identificados por essa análise de cromatografia.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foi demonstrado que o uso de *P. major* e *P. lanceolata* como matéria-prima para a obtenção de extratos bioativos é promissor. Nas extrações realizadas com solventes mais polares (etanol, metanol ou mistura de água e etanol) em Soxhlet e ultrassom foram obtidos extratos com melhores rendimentos em comparação as extrações realizadas com CO₂ supercrítico. O maior rendimento de extração para *P. major* ($20,5 \pm 0,8\%$) foi obtido por ultrassom com a mistura de etanol/água (50/50 v/v); enquanto que para a *P. lanceolata* o maior rendimento foi obtido por ultrassom com metanol ($23,1 \pm 0,3\%$).

Os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* apresentaram um alto conteúdo de compostos fenólicos e forte atividade antioxidante, especialmente quando utilizados solventes de maior polaridade. A extração supercrítica de *P. major* com o uso de etanol como modificador possibilitou a obtenção de extratos com atividade antioxidante comparável à do antioxidante sintético BHT.

Na avaliação da atividade antimicrobiana os extratos obtidos com CO₂ supercrítico apresentaram melhores resultados em comparação a Soxhlet e ultrassom. Os extratos apresentaram forte atividade

antimicrobiana, especialmente frente à bactéria *B. cereus*, com valores de concentração mínima inibitória de 15,62 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para extratos de ESC de *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente. A atividade antimicrobiana provavelmente está associada a presença dos ácidos graxos α -linolênico e palmítico (e seus derivados) e do α -sitosterol.

Os resultados de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH) apresentados sugerem que os compostos antioxidantes presentes na *P. major* e na *P. lanceolata* são compostos principalmente polares. Visando extrair esses compostos antioxidantes por meio de técnicas ambientalmente amigáveis e em menos tempo, as amostras de *P. major* e *P. lanceolata* foram submetidas a outros dois métodos de extração utilizando água como solvente (Capítulo 4).

Capítulo 4

EMPREGO DE ÁGUA COMO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DE *Plantago major* E *Plantago lanceolata*

1. INTRODUÇÃO

O extensivo uso tradicional e as modernas aplicações medicinais de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* são consequências de sua variedade de propriedades curativas (SAMUELSEN, 2000). Entre as propriedades terapêuticas, *P. major* e *P. lanceolata* foram amplamente aceitas como plantas com forte atividade antioxidante (BEARA et al., 2012; GÁLVEZ et al., 2005; GONÇALVES; ROMANO, 2016; SAMUELSEN, 2000; STANISAVLJEVIC et al., 2008). Como verificado no Capítulo 3, os compostos antioxidantes dessas espécies avaliadas possuem uma maior afinidade por solventes polares.

Vários métodos podem ser utilizados para extrair antioxidantes a partir de matrizes vegetais. As técnicas de extração e os solventes utilizados devem ser cuidadosamente escolhidos para otimizar o equilíbrio entre maximização de rendimentos e seletividade (AZMIR et al., 2013; JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013). Além disso, durante os últimos anos, as técnicas ambientalmente amigáveis estão se tornando cada vez mais atraentes, o que tem impulsionado pesquisas que visam a otimização de processos de extração mais limpos. Entre essas tecnologias verdes, a extração assistida por micro-ondas e extração com líquidos pressurizados estão ganhando cada vez mais atenção nos dias de hoje para a extração e recuperação de compostos bioativos de diferentes matrizes naturais (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; ONG; CHEONG; GOH, 2006; PLAZA; TURNER, 2015).

Os métodos de extração que empregam água como solvente são particularmente promissores, uma vez que a água é um solvente não tóxico, não corrosivo, não inflamável, ambientalmente amigável, naturalmente abundante e disponível a baixo custo (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; PLAZA; TURNER, 2015). As técnicas de extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração com água subcrítica (SWE) foram utilizadas com sucesso para extrair antioxidantes a partir de plantas, demonstrando ser métodos mais amigáveis, mais rápidos e que requerem uma quantidade de solvente orgânico significativamente menor do que os métodos tradicionais de extração.

O Capítulo 4 do presente trabalho objetivou avaliar a água como solvente de extração na obtenção de compostos com atividade antioxidante de *P. major* e *P. lanceolata*. Para isso, duas técnicas de

extração foram selecionadas: extração com água subcrítica (SWE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).

Esse é o primeiro trabalho do LATESC nessa linha de pesquisa (SWE e MAE) e surgiu devido à preocupação do grupo em utilizar cada vez mais técnicas e solventes ambientalmente amigáveis e também do interesse de utilizar esses métodos futuramente no laboratório. A realização dos experimentos foi possível devido a uma parceria entre o LATESC e o Laboratório Foodomics do Instituto de Pesquisa em Ciência da Alimentação (CIAL - *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación*) que é um instituto misto pertencente ao Conselho Superior de Pesquisas Científicas (CSIC - *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*) e da Universidade Autônoma de Madrid (UMA - *Universidad Autónoma de Madrid*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Extração com água subcrítica (SWE)

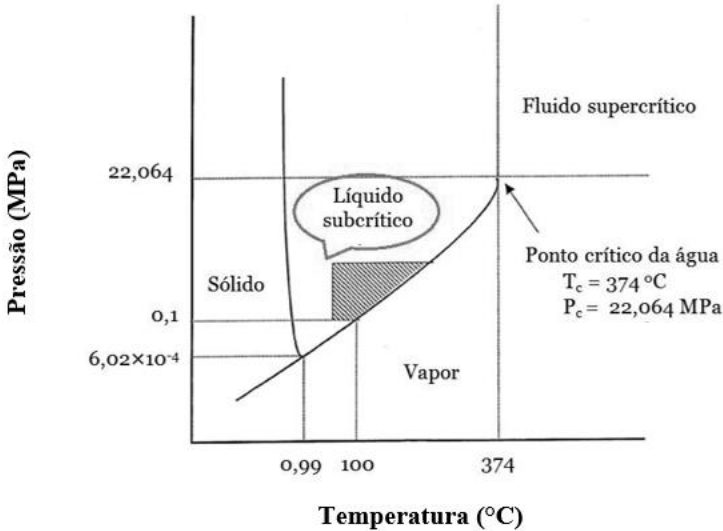
A extração com água subcrítica é um processo que vem sendo estudado para a obtenção de compostos bioativos, embora possa ser considerada uma variação da técnica de extração com solventes acelerada (PLE - *pressurized liquid extraction*). O uso de água como solvente de extração é bastante relevante do ponto de vista ambiental, uma vez que a água não é tóxica para a saúde e nem para o meio ambiente e por isso costuma ser descrita independentemente (BRUNNER, 2009; CARR; MAMMUCARI; FOSTER, 2011; HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006; SMITH, 2006).

O princípio básico desta técnica consiste na utilização da água a altas temperaturas (superiores a 100 °C) e altas pressões (3,5 a 20 MPa), porém abaixo do seu ponto crítico ($T_c = 374$ °C e $P_c = 22,064$ MPa), de modo a manter durante todo o processo de extração o solvente em seu estado líquido (Figura 19). Nestas condições de pressão e temperatura, as propriedades físicas e químicas da água são drasticamente alteradas (BRUNNER, 2009; HAGHIGHI; KHAJENOORI, 2013).

O rendimento e a seletividade de extração podem ser influenciados por diversos parâmetros como: temperatura, tempo, pressão, adição de um solvente orgânico ou surfactante e vazão de solvente. (HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006; HERRERO et al.,

2010; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2010). No entanto, entre todos os parâmetros citados anteriormente, a temperatura é o parâmetro mais relevante.

Figura 19 - Diagrama de fases da água com função da temperatura e pressão.



Fonte: Adaptado de Haghghi e Khajenoori (2013).

A maior influência da temperatura no rendimento e seletividade da técnica de extração com água subcrítica se deve porque em altas temperaturas ocorrem várias mudanças nas propriedades da água (BRUNNER, 2009; HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006), podendo-se destacar:

- ✓ aumento de sua difusividade, o que melhora a difusão dos compostos (difusividade da água a 25 °C é 10 vezes menor do que a da água a 200 °C);
- ✓ redução de sua viscosidade, o que permite uma melhor penetração da água nas partículas da matriz;
- ✓ redução de sua tensão superficial e favorecimento da cinética de transferência de massa por perturbação das forças

- intermoleculares (van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo;
- ✓ redução de sua constante dielétrica (ϵ), o que favorece uma redução da polaridade da água.

2.1.1. Constante dielétrica da água (ϵ)

A constante dielétrica (ϵ) é uma propriedade do material isolante utilizado em capacitores que influi na capacitância total do dispositivo. A constante dielétrica pode ser entendida como a relação entre um capacitor com determinado dielétrico e outro capacitor com mesmas dimensões, cujo dielétrico é o vácuo. Por definição, a constante dielétrica é um número adimensional (Equação 6). Essa constante também descreve a capacidade de um solvente em ser polarizado por um campo elétrico. Constantes dielétricas mais elevadas estão associadas com uma maior capacidade de dissolver eletrólitos ou compostos polares (BRUNNER, 2009).

$$\epsilon = \frac{C}{C_0} \quad (6)$$

Onde:

C = carga obtida com uma determinada tensão no capacitor que contém um dado dielétrico;

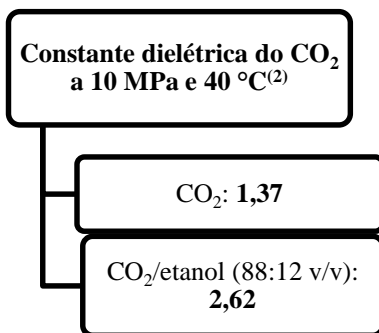
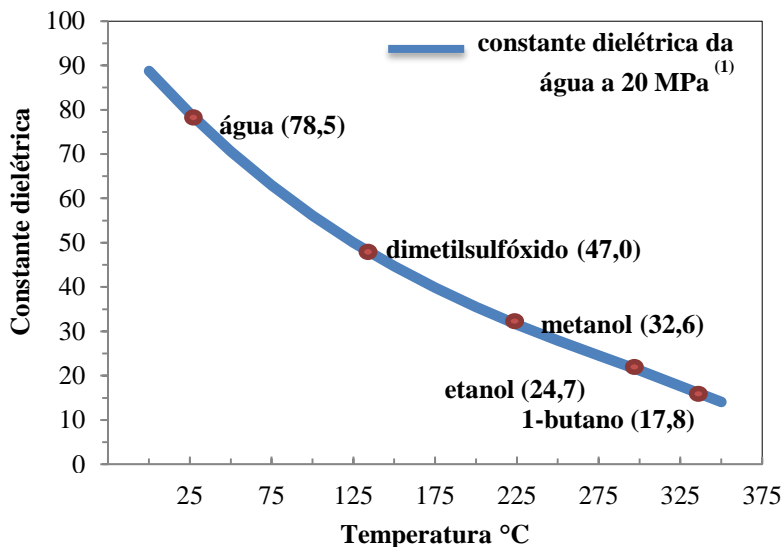
C₀ = carga que existiria se os eletrodos estivessem separados pelo vácuo.

A constante dielétrica da água é mais elevada do que a maioria dos líquidos devido à sua polaridade e a suas pontes de hidrogênio. De maneira geral, a constante dielétrica aumenta com a temperatura para a maioria das substâncias. No entanto, a constante dielétrica da água diminui rapidamente em temperaturas mais elevadas, o que está relacionado à redução da densidade e ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio (BRUNNER, 2009).

Como pode ser observado na Figura 20, na temperatura de 250 °C e pressão de 5 MPa a constante dielétrica da água é igual a 27. Este valor se situa entre o verificado para o etanol ($\epsilon = 24$) e metanol ($\epsilon = 33$). Dessa forma, a temperatura da água pode ser alterada para permitir a obtenção de compostos de diferentes polaridades. Os compostos polares

podem ser extraídos em temperatura ambiente e compostos médio-polares e apolares em temperaturas mais elevadas (CARR; MAMMUCARI; FOSTER, 2011; HERRERO et al., 2013, 2015; MILLER et al., 1998).

Figura 20 - Constante dielétrica dá água em função da temperatura e do dióxido de carbono supercrítico.



Fonte: Adaptado de Herrero et al. (2013)⁽¹⁾ e Wesch; Dahmen; Ebert, (1996)⁽²⁾.

Nos processos de extração com água subcrítica, normalmente são utilizadas pressões suficientes para manter a água em estado líquido durante todo o processo (3,5 a 20 MPa). O efeito da pressão na constante dielétrica da água durante a extração com água subcrítica pode ser negligenciado, uma vez que só ocorrem alterações mais significativas em pressões acima de 100 MPa (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; HERRERO; CIFUNTES; IBANEZ, 2006).

A Figura 20 também apresenta valores da constante dielétrica (ϵ) para o CO₂ e da mistura CO₂/etanol. Como pode ser observado, a constante dielétrica do CO₂ é inferior a apresentada pela água em altas temperaturas e também em relação os solventes etanol e metanol. (WESCH; DAHMEN; EBERT, 1996). Observando a Tabela 20, pode-se verificar que os valores da constante dielétrica do CO₂ e da mistura CO₂/etanol se aproximam mais aos valores determinados para os solventes apolares como hexano e benzeno. Dessa forma a extração com água subcrítica pode ser uma alternativa a extração com ESC, que possui limitada habilidade de extrair compostos de maior polaridade.

Tabela 20. Constantes dielétricas (ϵ) de diferentes substâncias determinada a 25 °C.

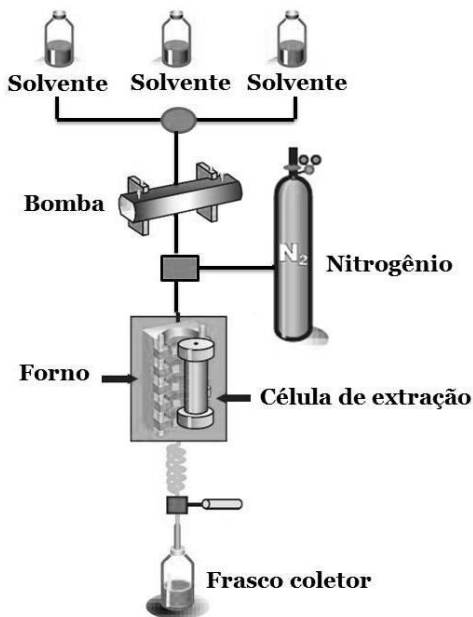
Solvente	Constante dielétrica (ϵ)
Hexano	1,88
Benzeno	2,3
Acetato de etila	6,02
Diclorometano	9,1
Água	80,1

Fonte: Burdick & Jackson (2015).

2.1.2. Processo de extração

A Figura 21 ilustra um esquema simplificado do equipamento de extração acelerada por solvente. O equipamento consiste de um reservatório para armazenar o solvente de extração, uma bomba para pressurizar o fluido, um forno que contem a célula de extração e um frasco para coletar a amostra.

Figura 21 - Processo de extração acelerada por solvente.



Fonte: Dionex (2015).

Esse processo de extração é rápido, no qual, tipicamente, rendimentos de extração mais elevados são obtidos com baixos volumes de solventes orgânicos (por exemplo, 20 min, utilizando 10-50 mL de solvente). No método de extração estático, um determinado volume de solvente é mantido em contato com a amostra, sob as condições de pressão, tempo e temperatura desejadas. Durante esse período, o processo tende a alcançar o equilíbrio entre os componentes da amostra ainda ligada à matriz e aqueles já solubilizados no solvente. Após atingir a saturação do solvente, o rendimento de extração não muda. Para aumentar o rendimento de extração, pode-se fazer a renovação de uma parte do solvente, por meio da adição de mais água (HERRERO et al., 2013).

2.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

Na extração de compostos bioativos, muitos métodos existentes apresentam desvantagens tais como: longo tempo processo, alto consumo de solvente, alto custo e/ou problemas relacionados a sustentabilidade ambiental. A extração assistida com micro-ondas (MAE) é uma tecnologia promissora na obtenção de compostos naturais que apresenta soluções a alguns desses problemas e ainda propicia bons rendimentos (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015).

O efeito de micro-ondas em processos de síntese química e extração está estritamente relacionada com a conversão de radiação eletromagnética em calor. O aquecimento por micro-ondas pode ser obtido por dois mecanismos principais: polarização dipolar e condução iônica. O mecanismo de polarização dipolar envolve o alinhamento do dipolo da molécula ao campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação é dissipada na forma de calor. O mecanismo por condução iônica, por sua vez, envolve a perda por fricção, que ocorre através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; ROUTRAY; ORSAT, 2012).

A absorção das micro-ondas é dependente das propriedades dielétricas do material. Os solventes podem ser classificados como de alta, média e baixa absorção de micro-ondas baseados no valor do seu fator de perda dielétrica (Equação 7). A Tabela 23 apresenta o fator de perda dielétrica de alguns solventes químicos. Em geral, substâncias polares absorvem bem micro-ondas, enquanto que substâncias menos polares absorvem fracamente as micro-ondas (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009).

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon} \quad (7)$$

Onde:

ϵ'' = perda dielétrica (indicativo de eficiência com o qual a radiação eletromagnética é convertida em calor);

ϵ = constante dielétrica (descreve a polarização de moléculas no campo elétrico).

Tabela 21 - Fator de perda dielétrica ($\tan \delta$) de alguns solventes químicos (20 °C e 2,45GHz).

Solvente	Fator de perda dielétrica ($\tan \delta$)
Etanol	0,941 (alto)
Metanol	0,659 (alto)
Água	0,123 (médio)
Clorobenzeno	0,101 (médio)
Acetato de etila	0,059 (baixo)
Hexano	0,020 (baixo)

Fonte: Kappe, Dallinger e Murphree (2009).

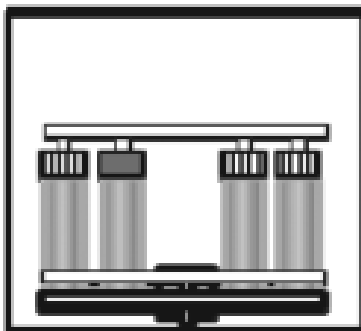
2.2.1. Processo de extração com água

O uso da água como solvente na MAE vem sendo bastante estudado, uma vez que é um solvente ambientalmente amigável e que apresenta propriedades dielétricas relevantes para essa técnica. A água, quando usada como solvente de extração em altas temperaturas, tem sua viscosidade e tensão superficial reduzidas, favorecendo a difusão do solvente através da matriz sólida e sua solubilidade. As altas temperaturas também favorecem a dessorção de solutos a partir da matriz, devido ao aumento da pressão de vapor (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; ROUSTRAY; ORSAT, 2012).

As extrações realizadas com água e sistemas fechados podem ser denominadas como “extração com água superaquecida”. Essa configuração de equipamento (Figura 22) oferece algumas vantagens em relação a sistemas abertos, como menor tempo de extração, evita evaporação do solvente e perda de compostos voláteis e permite trabalhar com temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015).

O curto tempo de processo do MAE e os elevados rendimentos associados podem ser resultado da combinação sinérgica de dois fenômenos de transporte: gradientes de calor e massa trabalhando na mesma direção. Nas extrações convencionais, diferentemente disso, a transferência de massa ocorre do interior da matriz para o exterior enquanto que a transferência de calor ocorre do exterior para o interior da matriz (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; ROUSTRAY; ORSAT, 2012).

Figura 22 - Extração assistida por micro-ondas em sistemas fechados.



Fonte: Flórez, Conde e Domínguez (2015).

2.3. Remoção da água presente nos extratos

O emprego da água como solvente de extração, tanto na técnica de extração com água subcrítica como na extração assistida por micro-ondas, apresenta muitas vantagens. No entanto, um dos problemas relacionados ao uso dessas técnicas está na eliminação da água desses extratos (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015).

Os processos tradicionais para remoção da água normalmente são caros e com alto consumo de tempo e energia. O alto consumo de energia para a remoção de água dos extratos não é desejado, principiante quando se busca a produção de produtos de forma ecologicamente amigável. Várias pesquisas vêm sendo realizadas buscando solucionar esse problema, e entre as mais promissoras poderíamos destacar os processos envolvendo separação por membranas (DÍAZ-REINOSO et al., 2011; FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; KING; SRINIVAS, 2009; MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; ZHAO et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras de *P. major* e *P. lanceolata* utilizadas nos experimentos estão descritas nas seções 3.1.1 *Plantago major* e 3.1.2 *Plantago lanceolata* do Capítulo 3 desse trabalho.

3.2. Extração com água pressurizada (PLE)

As extrações com água pressurizada foram realizadas utilizando um extrator acelerado por solvente (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, EUA), ilustrado na Figura 23, baseadas na metodologia descrita por Ibañez et al. (2003). Para a remoção de qualquer possível ar dissolvido, a água foi sonicada por 10 min antes da extração. Para cada uma das extrações, 2 g de *P. major* ou *P. lanceolata* foram misturados com areia do mar, empregada como agente de dispersão, e colocados em uma cela de extração de aço inoxidável de 11 mL. As celas de extração foram equipadas com discos de aço inoxidável poroso e filtros de celulose em ambas as extremidades para evitar que partículas sólidas escoassem para o frasco de coleta. Antes de cada extração, as celas de extração foram submetidas a uma etapa de pré-aquecimento por um tempo pré-determinado. Este tempo de aquecimento é variável e depende da temperatura de extração (5 minutos quando a temperatura de extração é de 50 a 100 °C, e de 6, 8 ou 9 min se a temperatura de extração é de 124, 168 ou 200 °C, respectivamente).

As extrações foram realizadas utilizando dois procedimentos: extrações individuais (a uma temperatura escolhida) e extração sequencial. Nas extrações individuais, as temperaturas avaliadas foram 25, 50, 100, 150 e 200 °C, com tempo de extração de 20 min e pressão de 10 MPa. Na extração sequencial, a mesma célula de extração foi extraída em diferentes temperaturas. O tempo de extração foi de 10 min em cada uma das temperaturas selecionadas (25, 50, 100, 150 e 200 °C). A pressão foi mantida a 10 MPa e a cada etapa de extração, o frasco de coleta foi substituído. Os experimentos realizados a 100, 150 e 200 °C são extrações com água no estado subcrítico.

Após a extração, os extratos aquosos foram liofilizados (Labconco Corporation, Missouri, EUA) até a completa remoção do solvente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 23 - Foto do equipamento de extração com líquidos pressurizados (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, EUA)



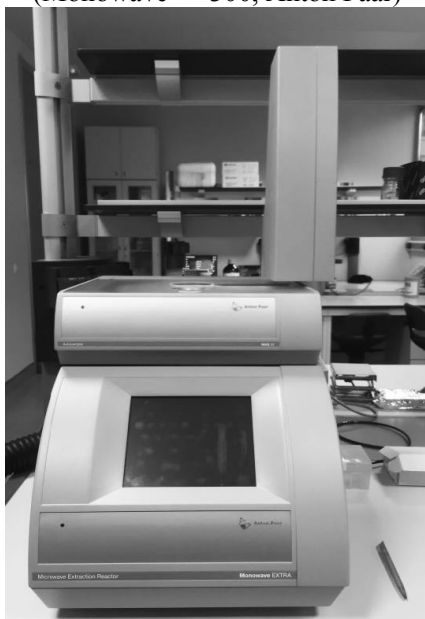
Fonte: a autora.

3.3. Extração assistida com micro-ondas (MAE)

As extrações de *P. major* e *P. lanceolata* foram realizadas em um equipamento de micro-ondas (Monowave™ 300, Anton Paar) em diferentes temperaturas (50, 100, 150 e 200 °C). Essas temperaturas foram selecionadas por serem as mesmas utilizadas nas extrações com água pressurizada (PLE). A temperatura foi medida por um sensor de infravermelho e por uma sonda de fibra óptica. No frasco de reação com volume de 30 mL foram adicionados 0,5 g de amostra, 10 ml de água e uma barra magnética. A Figura 24 mostra a foto do equipamento usado nos experimentos.

O equipamento de micro-ondas foi configurado para um ciclo automatizado contendo: 1) aquecimento para a temperatura desejada (tipicamente leva menos de 1 min) com agitação de 1000 rpm, 2) reação (10 minutos, agitação de 1000 rpm) e 3) rápido resfriamento utilizando nitrogênio comprimido (tipicamente leva menos do que 2 minutos, dependendo da temperatura). Os extratos aquosos foram centrifugados durante 20 min a 4 °C e 3046 g. Após centrifugação, os extratos aquosos foram liofilizados (Labconco Corporation, Missouri, EUA) antes das análises posteriores. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 24 - Foto do equipamento de extração assistida por micro-ondas (Monowave™ 300, Anton Paar)



Fonte: a autora.

3.4. Determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante

A determinação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante foi realizada em acordo com as metodologias empregadas no Laboratório Foodomics. Essas metodologias diferem das utilizadas na LATESC, principalmente porque são configuradas para leitura em microplacas.

3.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais (TFT) dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi determinado por espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Koşar, Dorman e Hiltunen (2005), com algumas modificações.

Resumidamente, uma alíquota de 10 μL da solução de extrato (concentração de 10 mg mL^{-1}) e 600 μL de água ultrapura foram misturados, aos quais se adicionou subsequentemente 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 1 min, 150 μL de 20 % de Na_2CO_3 (m/v) foram adicionados e o volume foi completado com água até 1,0 mL. As amostras foram incubadas durante 2 h a 25 °C e ao abrigo de luz. Posteriormente, 300 μL de cada mistura reacional foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida a 760 nm em um leitor de microplacas espectrofotômetro Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT). O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de ácido gálico (GAE) por grama de extrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.2. Método do radical ABTS

A atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foi determinada pelo ensaio TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) baseado no procedimento descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS^+ foi produzido pela reação de 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de potássio 16 h antes de sua utilização, permanecendo ao abrigo de luz e temperatura ambiente durante esse período.

A solução aquosa de ABTS^+ foi diluída com tampão de fosfato 5 mM (pH 7,4) até uma absorbância de 0,7 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Posteriormente, 10 μL da solução de extrato (5 concentrações diferentes variando de 0,025 a 10 mg mL^{-1}) e 1 mL de solução de ABTS^+ foram misturados num frasco de *Eppendorf* e 300 μL da mistura foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida a 734 nm a cada 5 min durante 45 min num espectrofotômetro leitor de microplacas Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT). O Trolox foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos como valores TEAC (mmol de Trolox/g extrato). Estes valores foram obtidos a partir das cinco concentrações diferentes testadas de cada extrato dando uma resposta linear entre 20 e 80%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.3. Método do radical DPPH

O método do radical DPPH foi utilizado para determinar o atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata*, sendo realizado em acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

Para a realização das análises foi preparada uma solução mãe dissolvendo 23,5 mg de DPPH em 100 mL de metanol. Essa solução foi diluída com metanol na proporção 1:10 (v/v) para a obtenção da solução de trabalho. Tanto a solução mãe como a solução de trabalho foram armazenadas a 4 °C até sua utilização. Posteriormente, 975 µL de solução de trabalho de DPPH foram adicionados a 25 µL de cada solução de extrato (5 concentrações diferentes variando de 0,125 a 5 mg mL⁻¹) e a mistura reacional foi mantida ao abrigo de luz durante 4 h à temperatura ambiente.

Após as 4 h, 300 µL desta mistura foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a absorbância medida a 516 nm num leitor de microplacas espectrofotômetro Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT). A solução de trabalho de DPPH foi utilizada como amostra de referência. A concentração de DPPH remanescente no meio de reação foi calculada a partir de uma curva de calibração. A percentagem remanescente de DPPH em função da concentração de extrato foi representada graficamente para se obter a quantidade necessária de antioxidante (expressos em µg mL⁻¹) para reduzir a concentração de DPPH inicial em 50% ou EC₅₀. Assim, quanto menor o valor de EC₅₀, mais elevada a capacidade antioxidante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Caracterização por HPLC

A caracterização dos extratos obtidos nos experimentos de PLE e MAE foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas. A análise foi realizada em um cromatógrafo Accela (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA) equipado com um detector DAD e espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC/MS/MS) (TSQ-Quantum, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA) com uma interfase ESI (ionização por spray eletrônico). Para realizar a análise foi utilizada uma coluna Eclipse Plus C18 (210 mm

× 450 mm, d.p. 1,8 µm) (Agilent Technologies). As fases móveis foram compostas por água (0,75% de ácido fórmico, A) e acetonitrila (B). O gradiente de eluição foi: 0 min, 0% B; 2,5 min, 15% B; 3,5 min, 20% B; 5 min, 25% B; 8 min, 40% B; 9 min, 50% B; 10 min, 70% B; 11 min, 100% B; 12 min, 0% B durante os últimos 3 min (tempo total de corrida cromatográfica: 15 min). A vazão utilizada foi 0,2 mL min⁻¹, com volume de injeção de 5 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 45 °C. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo e analisador de massa foi definido no modo de varredura completa. Os dados foram adquiridos em uma faixa de m/z entre 150 e 1000. Todas as injeções foram realizadas em duplicata.

3.6. Análise estatística

Os resultados de rendimento global de extração, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA). Quando se verificaram diferenças significativas ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey. Dessa forma, a análise estatística foi realizada para detectar diferenças significativas entre os valores de rendimento de extração e entre as percentagens de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da temperatura no rendimento de extração

Com o objetivo de obter a maior quantidade de compostos antioxidantes bioativos a partir de *P. major* e *P. lanceolata* foram avaliados dois importantes métodos de extração que são ambientalmente amigáveis. A capacidade da água de extrair compostos distintos em diferentes temperaturas e, como esta composição influencia na atividade antioxidante foram avaliados. A Tabela 22 apresenta rendimentos de extração de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos com extração com água pressurizada e extração assistida por micro-ondas em diferentes temperaturas.

Como pode ser observado na Tabela 22, os rendimentos de extração dos extratos obtidos por PLE e MAE claramente aumentaram com o emprego de temperaturas mais elevadas, e isso é devido a fatores que contribuem para o aumento da transferência de massa do processo. O rendimento de extração foi máximo quando empregada água subcrítica a 200 °C (PLE), com valores de $45 \pm 3\%$ para *P. major* e $53 \pm 3\%$ para *P. lanceolata*. Na extração com água subcrítica a seletividade das classes de compostos depende de solvatação dos compostos de interesse na água em estado líquido. Quando a água é aquecida a 200 °C ocorre a redução da sua constante dielétrica a valores semelhantes aos de metanol ou acetonitrila, o que aumenta a solubilidade de compostos menos polares (HERRERO et al., 2013; ONG; CHEONG; GOH, 2006).

Tabela 22 - Rendimentos de extração (%) dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por extração com água pressurizada (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).

Técnica de extração	Temp. (°C)	Rendimento de extração (%) ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
PLE	25	24,8 ^f ± 0,4	31,5 ^d ± 0,3
	50	26,5 ^{ef} ± 0,3	33,4 ^d ± 0,1
	100*	28,7 ^d ± 0,9	36,9 ^c ± 0,9
	150*	37,8 ^b ± 0,6	45 ^b ± 2
	200*	45 ^a ± 3	53 ^a ± 3
MAE	50	18,9 ^h ± 0,8	24,2 ^f ± 0,3
	100	21,2 ^g ± 0,2	27,6 ^e ± 0,4
	150	28 ^{de} ± 2	32,1 ^d ± 0,2
	200	35,2 ^c ± 0,5	38 ^c ± 3

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

* Extração com água subcrítica.

No processo de MAE as extrações foram realizadas em frascos fechados, o que possibilitou o uso de temperaturas acima ponto de ebulição da água. Como resultado, a solubilidade dos compostos pode ser

significativamente aumentada, o que resulta em maiores rendimentos, como pode ser observado na Tabela 22. O aumento da temperatura do solvente de 50 para 200 °C aumentou em 86,2 e 57,4% o rendimento da extração de *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente. Em altas temperaturas a viscosidade do solvente diminui e a difusividade aumenta, assim, a eficiência de extração é melhorada. Além disso, o aumento da temperatura pode provocar também a abertura da matriz celular (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; XIAO; HAN; SHI, 2008).

Também foram realizadas extrações PLE sequenciais de *P. major* e *P. lanceolata* em temperaturas entre 25 e 200 °C e tempo de 10 min em cada temperatura. A Figura 25 mostra os rendimentos de extração de *P. major* e *P. lanceolata* para as extrações sequenciais. Os maiores rendimentos de extração foram verificados para as temperaturas de 25 °C, seguidas da temperatura de 200 °C. Estes resultados mostram a seletividade do processo de extração que pode ser obtida simplesmente ajustando a temperatura da água.

O rendimento total de extração das extrações sequenciais, que é a soma de todas as condições avaliadas, foi de 53,2% para *P. major* e 59,5% para *P. lanceolata*. Esses valores de rendimento total obtidos são maiores do que os apresentados na Tabela 22, para ambas as espécies de *Plantago* estudadas. Além das mudanças na viscosidade, difusividade e constante dielétrica da água que ocorrem com a temperatura e que favorecem a extração de novos compostos (FLÓREZ; CONDE; DOMÍNGUEZ, 2015; IBÁÑEZ et al., 2003), a cada nova extração ocorria a renovação do solvente. Esses fatos podem estar relacionados aos maiores rendimentos verificados.

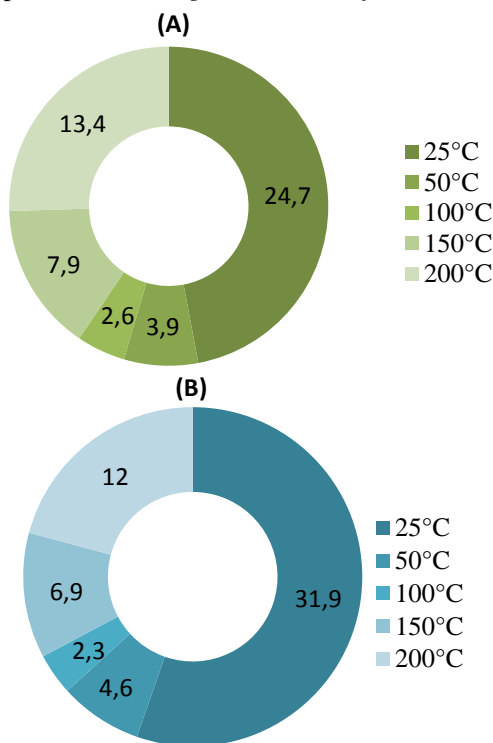
4.2. Efeito da temperatura no conteúdo de fenólicos totais

A caracterização funcional dos extratos foi complementada com a determinação do conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante. O conteúdo de fenólicos totais dos extratos obtidos de *P. major* e *P. lanceolata* empregando água como solvente nas técnicas de PLE e MAE está presente na Tabela 23.

Os compostos fenólicos são a principal classe de antioxidantes naturais (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Como pode ser observado na Tabela 23, os extratos que continham a menor quantidade de fenólicos foram obtidos nas temperaturas mais

baixas (ou seja, 25 e 50 °C). Quando utilizadas temperaturas mais elevadas, a concentração de compostos fenólicos totais foi máxima para ambas as técnicas de extração avaliadas. Estes resultados mostram a elevada seletividade desse processo, que pode ser conseguida através da realização de extração com água em uma determinada temperatura visando obter extratos com uma composição desejada.

Figura 25 - Rendimento de extração (%) dos experimentos sequenciais com PLE de espécies de *Plantago*. (A) = *P. major*; (B) = *P. lanceolata*.



Em relação a extração de compostos fenólicos, para a *P. major* o melhor resultado foi obtido com água subcrítica a 200 °C (PLE), enquanto que na extração de *P. lanceolata*, PLE e MAE a 200 °C não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os maiores valores de fenólicos totais. O conteúdo de compostos fenólicos dos extratos de *P.*

major obtidos a 200 °C com água subcrítica foram superiores ao de *P. lanceolata*: 113 ± 5 mg GAE g⁻¹, o que é cerca de 1,5 vezes maior do que o verificado para *P. lanceolata*.

Tabela 23 - Teor de fenólicos totais dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por extração com água pressurizada (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE).

Técnica de extração	Temp. (°C)	Teor de fenólicos totais (mg GAE g ⁻¹) ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
PLE	25	35 ^h ± 2	23 ^f ± 1
	50	44 ^g ± 1	27 ^e ± 1
	100*	59 ^{de} ± 3	40 ^c ± 2
	150*	72 ^c ± 3	47 ^b ± 3
	200*	113 ^a ± 5	72 ^a ± 1
MAE	50	42 ^g ± 3	28 ^c ± 1
	100	49,4 ^f ± 2	37 ^d ± 3
	150	59 ^e ± 4	48 ^b ± 2
	200	103 ^b ± 4	73 ^a ± 3

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05).

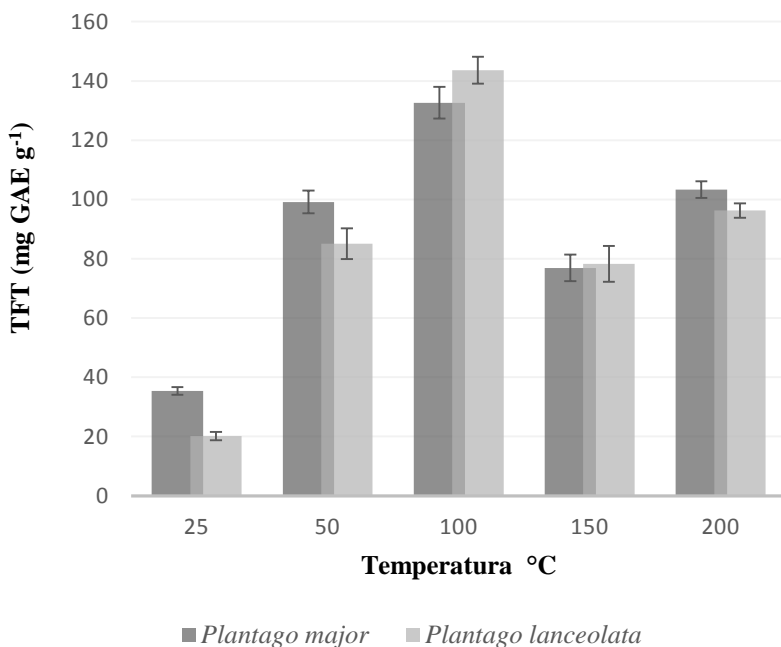
* Extração com água subcrítica

A caracterização funcional dos extratos obtidos no experimento sequencial do PLE em relação ao teor de compostos fenólicos totais está ilustrada na Figura 26. Como pode ser observado na Figura 26, os valores obtidos para diferentes condições (por exemplo, 100 e 200 °C) foram muito superiores em comparação com os resultados obtidos nas extrações individuais no mesmo equipamento (Tabela 23). A quantidade de fenólicos dos extratos de *P. lanceolata* obtidos com água subcrítica a 200 °C (PLE) nas extrações sequenciais foi de 144 ± 5 mg GAE g⁻¹, que é cerca de duas vezes a obtida na mesma temperatura na extração individual.

O conteúdo de compostos fenólicos obtido pela soma das frações obtidas em todas as temperaturas (25, 50, 100, 150 e 200 °C) foi de 447,43 mg GAE g⁻¹ para a *P. major* e 423,42 mg GAE g⁻¹ para a *P.*

lanceolata. O maior conteúdo de compostos fenólicos observado nas extrações por PLE e MAE em temperaturas mais elevadas, e principalmente, nas extrações sequenciais por PLE podem estar associados às reações que ocorrem durante esses processos. A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não enzimático que ocorre entre um açúcar redutor e um grupo amino da proteína que pode melhorar as propriedades funcionais e/ou biológicas de alimentos. Vários trabalhos descritos na literatura demonstram que os produtos da reação de Maillard podem apresentar atividade antioxidante (AHMAD; LANGRISH, 2012; AMAROWICZ, 2009; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2010). De fato, nos extratos obtidos em maiores temperaturas pode ser visualizado um escurecimento em comparação aos obtidos em menores temperaturas.

Figura 26 - Conteúdo de compostos fenólicos totais dos experimentos sequenciais com PLE de espécies de *Plantago*.



4.3. Efeito da temperatura na atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos de *Plantago* obtidos foi avaliada utilizando os métodos do radical ABTS e do radical DPPH, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 24. Os extratos que apresentam os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos empregando água em uma condição subcrítica a 200 °C (PLE), tanto para a *P. major* como para a *P. lanceolata*. Comparando os resultados de EC₅₀ apresentados na Tabela 24 com os valores obtidos por Costa et al. (2015) para a quercetina (padrão) e BHT (valores de EC₅₀ igual a 1,94 e 48,46 µg ml⁻¹, respectivamente) utilizando a mesma metodologia, pode-se concluir que os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* apresentam forte atividade antioxidante. Em relação as espécies de *Plantago* estudadas, verificou-se que os extratos de *P. major* apresentaram maior atividade antioxidante do que os extratos de *P. lanceolata*. Além disso, verificou-se que nesse trabalho os valores de atividade antioxidante não se correlacionam exatamente com teor fenólicos totais.

A atividade antioxidante apresentada pelos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos em altas temperaturas foi maior do que a dos extratos obtidos em condições mais brandas, em ambos dos processos extração estudados (PLE e MAE). Nestes processos de extração, o uso de água em altas temperaturas traz vantagens em relação à melhoria da cinética e rendimento de extração. Além disso, o tratamento térmico pode induzir a formação de substâncias bioativas. Estes novos compostos são derivados de reações que ocorrem durante o processo de extração, como reação de Maillard, caramelização e/ou termo oxidação. Esta possibilidade poderia aumentar ainda mais o interesse em processos em PLE e MAE conduzidos em temperaturas elevadas, tendo em conta que estas técnicas seriam capazes não só de extrair os antioxidantes presentes na amostra, mas também permitir a produção de novos compostos antioxidantes (AHMAD; LANGRISH, 2012; PLAZA et al., 2010).

Tabela 24 - Atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* determinado pelos métodos dos radicais ABTS e DPPH.

Técnica	T (°C)	ABTS		DPPH	
		(mmol Trolox/g extrato) ⁽¹⁾		EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ⁽¹⁾	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
PLE	25	0,349 ^h ± 0,008	0,313 ^g ± 0,002	42,9 ^a ± 0,5	108 ^a ± 2
	50	0,44 ^{fg} ± 0,01	0,34 ^f ± 0,01	40 ^{bc} ± 1	54 ^c ± 1
	100*	0,95 ^b ± 0,03	0,39 ^e ± 0,01	23,7 ^f ± 0,6	44 ^{de} ± 2
	150*	0,75 ^c ± 0,02	0,52 ^c ± 0,01	21,3 ^g ± 0,4	41 ^{ef} ± 1
	200*	1,38 ^a ± 0,07	0,95 ^a ± 0,03	21,3 ^g ± 0,4	33,4 ^g ± 0,4
MAE	50	0,418 ^g ± 0,08	0,290 ^g ± 0,006	41 ^b ± 2	74 ^b ± 4
	100	0,471 ^{ef} ± 0,03	0,38 ^{ef} ± 0,02	39 ^c ± 1	51 ^c ± 2
	150	0,65 ^d ± 0,01	0,472 ^d ± 0,009	33,3 ^e ± 0,7	47 ^d ± 2
	200	0,99 ^b ± 0,03	0,81 ^b ± 0,01	20,8 ^g ± 0,9	38,7 ^f ± 0,9

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05).

* Extração com água subcrítica.

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos nos experimentos sequenciais de PLE estão apresentados na Tabela 25. Nas extrações sequenciais, o mesmo material foi extraído sequencialmente em diferentes temperaturas. Assim, ao variar a temperatura da água, as propriedades físicas da água são modificadas, permitindo a extração de diferentes compostos em cada condição de extração avaliada. Teoricamente, a cada extração há menos compostos antioxidantes ou compostos fenólicos disponíveis na matriz, visto que houve extrações desses compostos nos experimentos anteriores. No entanto, os resultados dos ensaios espectrofotométricos de compostos fenólicos e atividade antioxidante determinado pelo método do radical ABTS e DPPH mostram que os melhores resultados foram obtidos em temperaturas mais elevadas (200 °C), mesmo depois de o material ter sido submetido a 4 extrações anteriores. Estes resultados podem sugerir a formação de novos compostos antioxidantes decorrentes das reações de Maillard, caramelização e termo oxidação (PLAZA; TURNER, 2015).

Tabela 25 - Atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos nos experimentos sequenciais com PLE determinado pelos métodos dos radicais ABTS e DPPH.

Temp (°C)	ABTS		DPPH	
	(mmol Trolox/g extrato) ⁽¹⁾		EC ₅₀ (µg ml ⁻¹) ⁽¹⁾	
	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
25	0,38 ^e ± 0,02	0,272 ^e ± 0,002	44 ^a ± 1	106 ^a ± 1
50	1,11 ^c ± 0,03	1,14 ^c ± 0,02	13,3 ^d ± 0,3	15,9 ^d ± 0,2
100*	1,50 ^b ± 0,04	1,97 ^b ± 0,01	11,3 ^e ± 0,5	10,6 ^e ± 0,2
150*	0,94 ^d ± 0,04	0,99 ^d ± 0,01	25,6 ^b ± 0,4	27 ^b ± 2
200*	1,95 ^a ± 0,08	2,03 ^a ± 0,01	22,0 ^c ± 0,5	19,2 ^c ± 0,7

⁽¹⁾ média ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p > 0,05).

* Extração com água subcrítica.

4.4. Caracterização química dos extratos por HPLC

O método baseado em HPLC-DAD-MS foi utilizado para realizar uma caracterização preliminar dos extratos obtidos, com o objetivo de observar possíveis diferenças entre eles e também para

quantificar os compostos majoritários. O tempo de retenção, os espectros de UV e os espectros de massa dos compostos presentes nos extratos foram utilizados para tentar identificá-los com base em dados publicados por outros autores.

As Figuras 27 e 28 ilustram os perfis cromatográficos dos extratos de água subcrítica obtidos a 200 °C (PLE) de *P. lanceolata* e *P. major*, respectivamente. A Tabela 26 apresenta os dados de HPLC-DAD-MS das estruturas identificadas (compostos sugeridos) dos extratos obtidos a 100, 150 e 200 °C. Os compostos foram identificados com base nos seus tempos de retenção, espectros UV/visível e padrões de fragmentação de massa.

Figura 27 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago lanceolata* obtido com água subcrítica a 200 °C (320 nm).

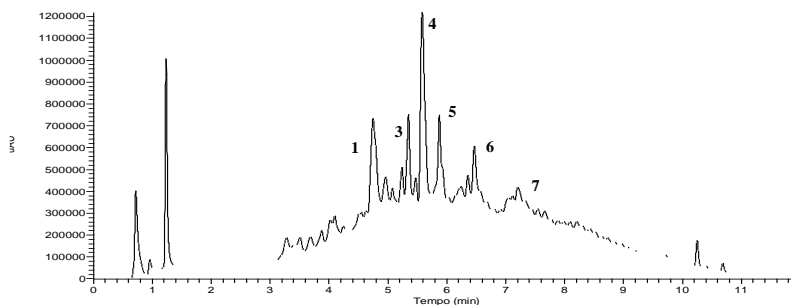


Figura 28 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago major* obtido com água subcrítica a 200 °C (320 nm).

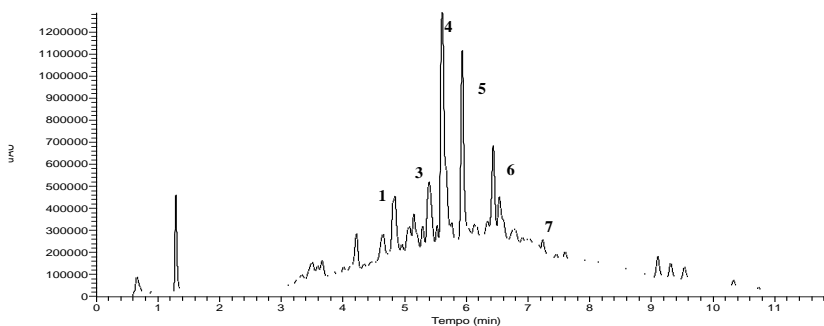


Tabela 26 - Principais íons identificados por HPLC-DAD-MS dos extratos das espécies de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* obtidos com água subcrítica a 100, 150 e 200 °C e suas sugeridas estruturas.

Pico	t _r (min)*	Estruturas sugeridas	[M-H] ⁻ m/z	Fragmentos MS/MS	UV absorbância max.	Referência/Padrão
1	4,8	Plantamajoside	639	461	245, 328	Li et al. (2009); Davey (2004); padrão
2	5,3	β- hidroverbascosideo diastereoisomero	639	621	247, 288, 324	Timóteo et al. (2015)
3	5,4	Luteolina- diglucurónido	637	621	244, 284, 332	Kéry et al. (2010)
4	5,6	Verbascosídeo	623	461	250, 290, 331	Cardinali et al. (2012); Funes et al. (2010); Timóteo et al. (2015); padrão
5	5,9	Isoverbascosídeo	623	461	250, 290, 328	Cardinali et al. (2012); Timóteo et al. (2015); padrão
6	6,4	Melitidina	723	621	283, 327	Zhang et al., 2011
7	7,5	Martynoside	651	491	244, 289, 326	Timóteo et al. (2015)

*tempo de retenção.

Nos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* foram identificados dois isômeros glicosídeos feniletanóides, o verbascosídeo e o isoverbascosídeo (Figura 29). O verbascosídeo e seu isômero estão presentes em várias espécies de *Plantago* e são responsáveis por uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo atividades antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anti-trombótica (ALIPIEVA et al., 2014; FUNES et al., 2010; LIU et al., 2013). Esses compostos identificados, juntamente com os compostos fenólicos, podem ser responsáveis pela forte atividade antioxidante verificada para os extratos obtidos por PLE e MAE.

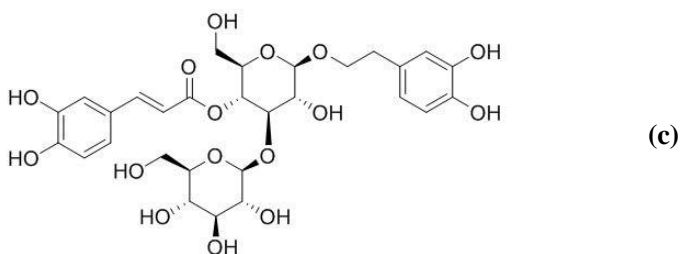
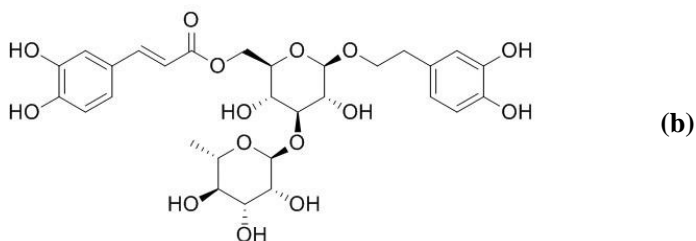
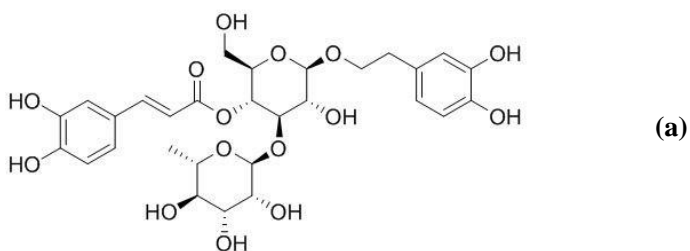
A plantamajoside (Figura 29) é um derivado bioativo do ácido cafeico identificado nos extratos das espécies de *Plantago*. Este composto está presente em várias espécies de *Plantago* e apresenta várias atividades biológicas, tais como efeito antioxidante, antimicrobiano, antibiótico e anti-inflamatório (RAVN et al., 2015). O efeito antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata*, bem como a atividade antimicrobiana apresentada no Capítulo 3, pode estar associada à presença desse composto, juntamente com a presença dos compostos fenólicos.

Os perfis cromatográficos dos extratos de água obtidos na extração assistida por micro-ondas a 200 °C (MAE) de *P. lanceolata* e *P. major* estão representados nas Figuras 30 e 31, respectivamente. Nos extratos de MAE também foram identificados a plantamajoside, o β -hidroverbascosídeo diastereoisômero, o verbascosídeo, o isoverbascosídeo e a melitidina. Comparando o perfil cromatográfico dos extratos obtidos a 200 °C por MAE com os das Figuras 27 e 28 pode-se verificar que as técnicas de extração possibilitaram a obtenção de perfis um pouco distintos. Nos cromatogramas obtidos por MAE (320 nm) podem ser visualizados outros picos, porém a maioria desses compostos não foi identificada pelo padrão de desfragmentação de seus íons porque esses extratos não se ionizavam bem e os picos estavam saturados. A Tabela 27 apresenta os dados de um dos compostos que não foi identificado.

O método baseado em HPLC-DAD-MS também foi utilizado para quantificar três compostos bioativos identificados nos extratos de *P. major* e *P. lanceolata*: o verbascosídeo e seu isômero (isoverbascosídeo) e a plantamajoside. Esses compostos foram selecionados por terem os picos com maiores intensidades e também pela sua relevante importância

biológica. Os resultados da quantificação desses compostos presentes nos extratos obtidos em diferentes temperaturas utilizando água por PLE e MAE estão apresentados na Tabela 28. Como pode ser observado, em alguns extratos não foi possível fazer a quantificação em duplicata, porque esses picos estavam muito saturados.

Figura 29 - Verbascosídeo (a), isoverbascosídeo (b) e plantamajoside (c).



Fonte: Chemfaces (2016).

Figura 30 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago lanceolata* obtido com água na extração assistida por micro-ondas a 200 °C (320 nm).

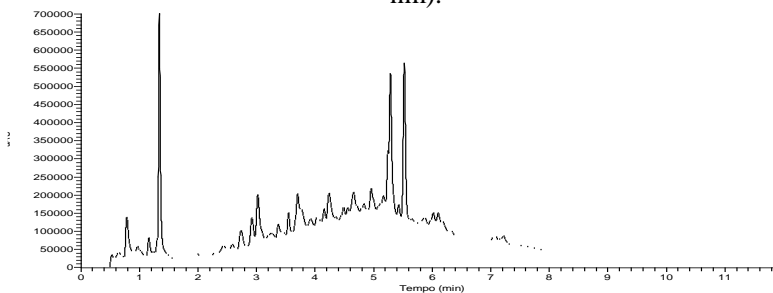


Figura 31 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago major* obtido com água na extração assistida por micro-ondas a 200 °C (320 nm).

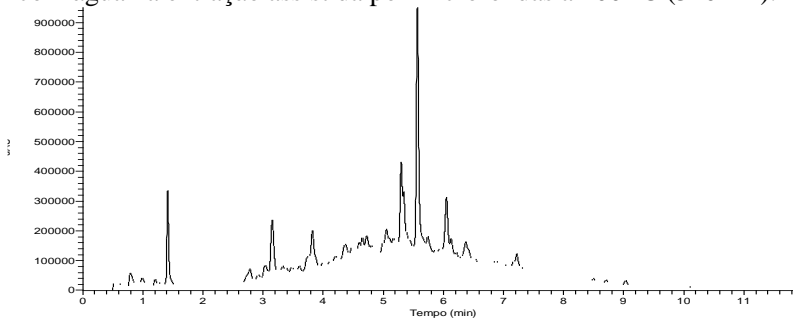


Tabela 27 - Íons identificados por HPLC-DAD-MS dos extratos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* obtidos na extração assistida por micro-ondas a 200 °C e suas sugeridas estruturas.

Pico	t_r (min)*	Estruturas sugeridas	$[M-H]^-$ m/z	Fragmentos MS/MS	UV absorbância max.
2	3,1	Não identificado	507	461	270

*tempo de retenção.

Tabela 28 - Quantificação dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside dos extratos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* obtidos por PLE e MAE.

Técnica de extração	Temp. (°C)	Verbascosídeo (µg mg ⁻¹ extrato)		Isoverbascosídeo (µg mg ⁻¹ extrato)		Plantamajoside (µg mg ⁻¹ extrato)	
		<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. major</i>	<i>P. lanceolata</i>
PLE	25	7,2 ± 0,4	2,1 ± 0,4	0,23 ± 0,07	<LOQ	0,81 ± 0,01	0,47 ± 0,03
	50	9,2 ± 1,4	4,9 ± 0,6	0,60 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,89 ± 0,05	0,95 ± 0,02
	100	8,20 ± 0,08	7,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2	0,38 ± 0,05	0,8 ± 0,1	1,21 ± 0,05
	150	7,4 ± 0,3	5,5 ± 0,5	6,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,51 ± 0,01	0,7 ± 0,2
	200	7,2 ± 0,4	5,37*	5,78 ± 0,03	1,40*	0,49 ± 0,05	0,79*
MAE	50	7,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	0,61 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0,14 ± 0,00	0,76 ± 0,07
	100	7,9 ± 0,4	6,0 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,36 ± 0,07	0,7 ± 0,1	1,07 ± 0,03
	150	4,3 ± 0,2	4,37 ± 0,05	8,7 ± 0,6	4,3 ± 0,2	2,6 ± 0,1	0,90 ± 0,02
	200	0,9 ± 0,6	0,42 ± 0,06	4,7 ± 0,3	2,2 ± 0,2	N.D.	N.D.

*dados de uma única análise; N.D. – não identificado; <LOQ – menor que o limite de quantificação.

Na Tabela 28 é possível observar que, para ambas espécies de *Plantago* estudadas, o conteúdo de isoverbascosídeo é maior em temperaturas mais elevadas. Isso pode ser resultado da seletividade do processo de extração, que altera as propriedades da água em função da temperatura, e/ou da formação desse composto como resultado do aquecimento do verbascosídeo. Wong et al. (2001) verificaram que quando o verbascosídeo foi aquecido em água fervente ocorreu a formação do isoverbascosídeo.

Tabela 29 - Quantificação dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside dos extratos de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* obtidos nas extrações sequencias por PLE.

Planta	T (°C)	Verbascosídeo ($\mu\text{g mg}^{-1}$ extrato)	Isoverbascosídeo ($\mu\text{g mg}^{-1}$ extrato)	Plantamajoside ($\mu\text{g mg}^{-1}$ extrato)
<i>P. major</i>	25	4,5 \pm 0,2	0,40 \pm 0,01	0,82 \pm 0,02
	50	8,0 \pm 0,2	4,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
	100	7,7 \pm 0,8	6,0 \pm 0,1	1,46 \pm 0,04
	150	3,36 \pm 0,02	2,94 \pm 0,04	N.D.
	200	N.D.	N.D.	N.D.
Total		23,6	14,2	3,9
<i>P. lanceolata</i>	25	2,7 \pm 0,2	<LOQ	0,58 \pm 0,02
	50	4,9 \pm 0,3	0,23 \pm 0,01	1,12 \pm 0,03
	100	6,35 \pm 0,07	1,4 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2
	150	3,6 \pm 0,1	0,71 \pm 0,08	0,47 \pm 0,05
	200	N.D.	N.D.	N.D.
Total		17,5	2,3	4,0

* N.D. – não identificado; <LOQ – menor que o limite de quantificação

Na Tabela 28 é possível observar também que a maioria das extrações empregando água como solvente que propiciaram conteúdos máximos do verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside foram realizadas a 100, 150 e 100 ° C respectivamente. Os dados do conteúdo desses compostos não se correlacionam diretamente a atividade

antioxidante determinada pelos métodos ABTS e DPPH (Tabela 24). Dessa forma, esses resultados sugerem que a atividade antioxidante é influenciada também pelos produtos das reações de Maillard, caramelização e termo oxidação que ocorrem em altas temperaturas (AMAROWICZ, 2009; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2010)

Os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos na extração sequencial também foram analisados por cromatografia para tentar identificar os compostos que foram extraídos em cada temperatura. Os perfis cromatográficos dos extratos de água obtidos na extração sequencial (PLE) de *P. major* estão representados na Figura 32. A quantificação dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos em cada temperatura estão apresentados na Tabela 29.

Os resultados de teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante sugerem uma possível formação de novos compostos decorrentes das reações de Maillard, caramelização e termo-oxidação que ocorrem nos processos em altas temperaturas. Observando a Figura 32 pode-se verificar que ocorrem mudanças nos perfis obtidos das extrações em diferentes temperaturas, com o surgimento de novos picos. No entanto, pode-se observar também que ocorre uma saturação nos cromatogramas em temperaturas mais elevadas, o que dificulta a identificação desses novos compostos, sendo necessário alterar o método de HPLC utilizando nesse trabalho.

A Tabela 29 apresenta também o conteúdo total dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e plantamajoside, que é a soma das frações obtida em cada temperatura na extração sequencial em PLE. Como pode ser observado, o conteúdo total desses compostos é mais elevado em comparação aos resultados obtidos na Tabela 28, chegando a 23,58 $\mu\text{g mg}^{-1}$ extrato para o composto verbascosídeo. Esses resultados, somados aos obtidos em termos de rendimento, compostos fenólicos e atividade antioxidante, sugerem que a realização das extrações sequenciais pode ser interessante, porém, levando em conta o tempo de processo, deve-se tentar otimizar o processo para o menor número de extrações possíveis.

Figura 32 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago major* obtido nas extrações sequenciais com PLE (320 nm).

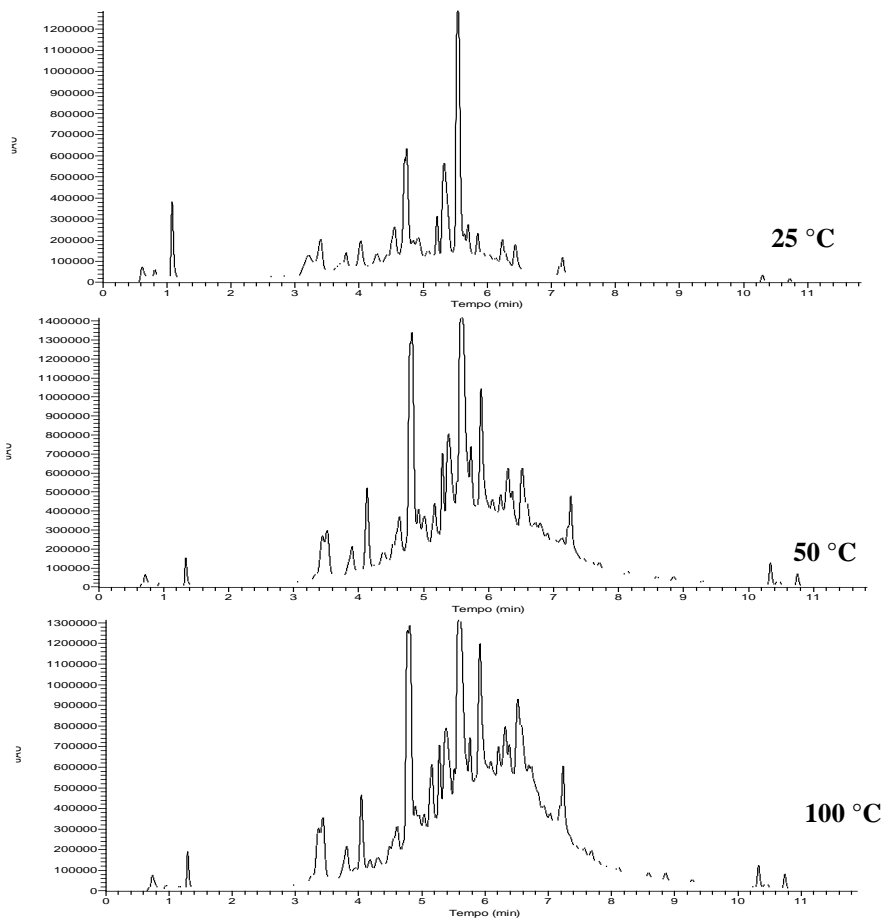
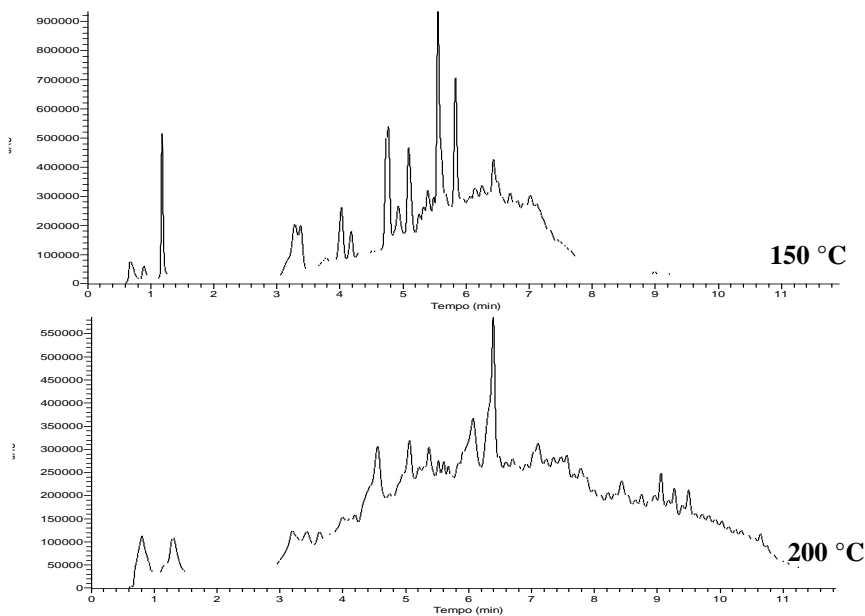


Figura 32 - Perfil cromatográfico do extrato de *Plantago major* obtido nas extrações sequenciais com PLE (320 nm).



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados no Capítulo 4, a água pode ser utilizada com êxito como solvente para a obtenção de compostos antioxidantes de *P. major* e *P. lanceolata* empregando as técnicas de extração com água subcrítica e extração assistida por micro-ondas.

A quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por ambas técnicas de extração mostraram sofrer forte influência da temperatura. Os melhores resultados para o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de *P. major* e *P. lanceolata* foram obtidos quando empregadas altas temperaturas, o que pode ser resultado da formação de novos compostos devido às reações que ocorrem nessas condições testadas.

Os resultados da análise química dos extratos por cromatografia sugerem que a *P. major* e a *P. lanceolata* podem representar uma valiosa fonte de compostos naturais, especialmente o verbascosídeo, o isoverbascosídeo e a plantamajoside.

Os resultados dos experimentos sequenciais demonstram que esta pode ser uma estratégia adotada para aumentar o rendimento de extração e a atividade antioxidante dos extratos. Porém, ao realizar-se mais extrações aumenta o tempo de processo bem como os custos para a remoção da água. Dessa forma, deve-se avaliar o uso do menor número de extrações possível.

Capítulo 5

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO: RENDIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

1. INTRODUÇÃO

Nos Capítulos 3 e 4 foram apresentados os resultados das extrações realizadas utilizando tecnologias tradicionais de extração, como o Soxhlet, e também de tecnologias que reduzem o impacto ambiental pelo uso de fluidos supercríticos e da água como solventes de extração.

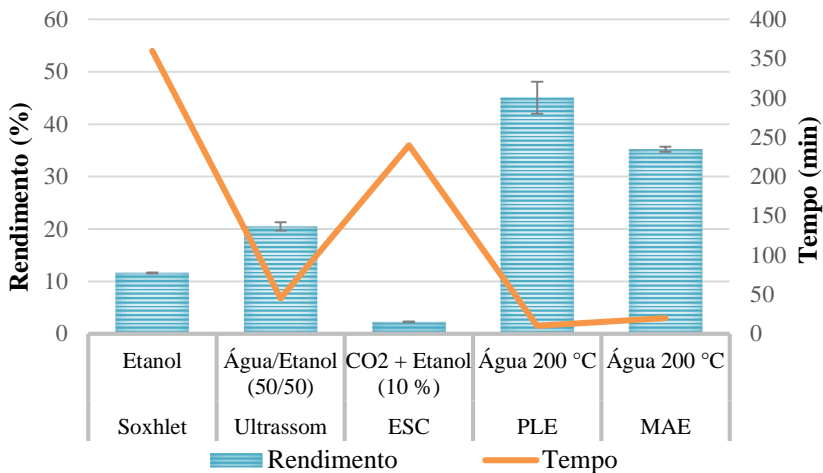
O Capítulo 5 objetiva comparar esses resultados, buscando verificar os processos que permitiram obter maiores rendimentos e potencialização da atividade antioxidante de *P. major* e *P. lanceolata*. Cientes da importância da utilização de técnicas e solventes que prezem pelo meio ambiente, foram considerados os melhores resultados de cada técnica utilizando apenas etanol, água, CO₂ e/ou da mistura de diferentes frações desses solventes.

2. Efeito das técnicas de extração no rendimento global de extração

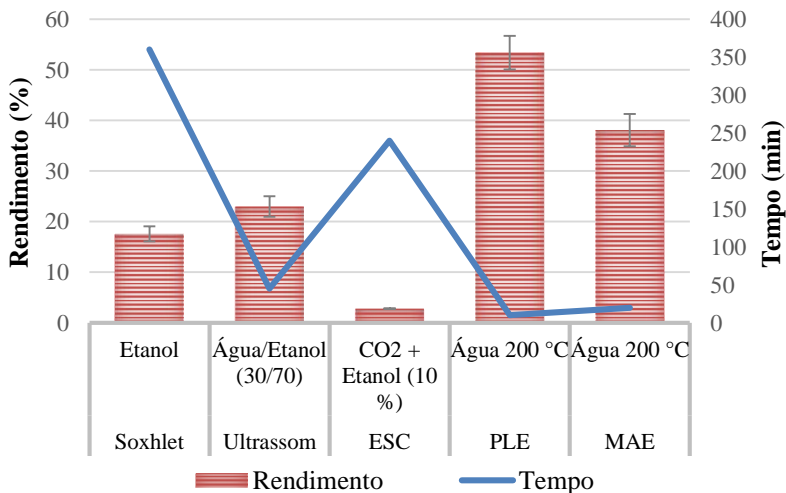
Os rendimentos globais de extração de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos pelas diferentes técnicas de extração estão representados na Figura 33. Além do rendimento global de extração, é possível observar também o tempo de extração, sem levar em consideração a etapa de remoção de solvente. Na Figura 33 pode-se observar que os valores de rendimento global de extração empregando água como solvente nos processos de extração com PLE e MAE são significativamente maiores. Além disso, o tempo necessário para a obtenção desses extratos é menor em comparação as demais técnicas.

Para a *P. major* o aumento no rendimento de extração chega a 119%, comprando as técnicas de extração PLE a 200 °C e ultrassom com água e etanol (50/50 v/v). Para a *P. lanceolata* o aumento de rendimento chega a 131%, comparando a 200 °C e ultrassom com água e etanol (30/70 v/v). Quando se compara o rendimento de extração empregando água como solvente com os resultados da extração com CO₂ supercrítico, verifica-se que o rendimento de extração é ainda maior. Isso pode ser explicado, entre outros fatores, pela diferença dos valores da constante dielétrica da água e do CO₂ supercrítico apresentados na Figura 20 do Capítulo 4 e também devido à maior temperatura utilizada nas extrações em PLE e MAE.

Figura 33 - Rendimento global de extração de *P. major* (a) e *P. lanceolata* (b) por diferentes técnicas de extração.



(a)



(b)

Onde:

ESC = extração supercrítica; PLE = extração com líquidos pressurizados (água subcrítica); MAE = extração assistida por micro-ondas.

3. Efeito das técnicas de extração no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante

Os teores de fenólicos totais dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos pelas diferentes técnicas de extração estão representados na Figura 34. Comparando os dados das extrações utilizando água como solvente (MAE e PLE) aos obtidos por Soxhlet e ultrassom, verifica-se que os resultados são similares aos das extrações com os solventes etanol e a mistura água/etanol. Isso pode ser atribuído à redução da constante dielétrica da água que ocorre em altas temperaturas a valores mais próximos aos verificados para os solventes orgânicos etanol (CARR; MAMMUCARI; FOSTER, 2011; MILLER et al., 1998). Os menores resultados foram verificados com o emprego da extração supercrítica.

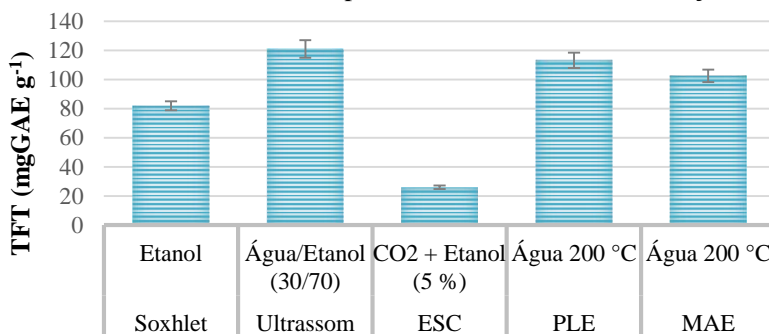
A Figura 35 apresenta a atividade antioxidante dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos pelas diferentes técnicas de extração através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Como pode ser observado na Figura 35, a atividade antioxidante verificada para todos os extratos é inferior a verificada para o antioxidante sintético BHT. Comparando os resultados de PLE e MAE as demais técnicas, verifica-se que a atividade antioxidante com água a 200 °C é maior. Esse resultado pode ser atribuído aos possíveis novos compostos formados nas extrações a alta temperatura e também a maior quantidade de compostos extraídos.

A comparação dos resultados do DPPH deve ser mais cuidadosa, já que os valores de EC_{50} foram determinados através de duas metodologias distintas. Mesmo os resultados expressos em EC_{50} (quantidade necessária de amostra para reduzir a concentração de DPPH inicial em 50 %), devem ser cautelosamente comparados entre si, pois representam valores estequiométricos (moles de DPPH reduzidos por moles de antioxidante), mas ignoram a cinética da reação. Isso pode explicar os diferentes valores obtidos de EC_{50} na literatura para um mesmo composto (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012; XIE; SCHAICH, 2014).

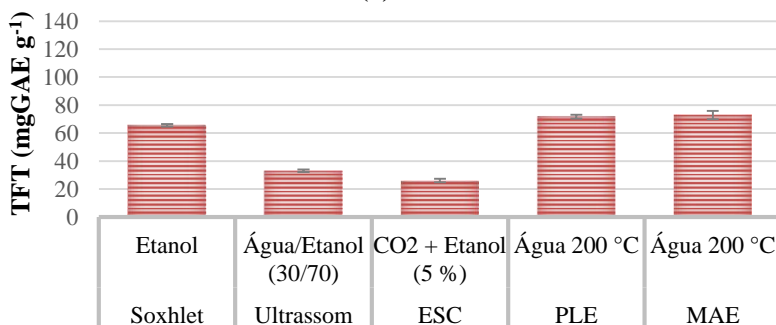
Dessa forma, a atividade antioxidante dos extratos obtidos com água foi determinada pela metodologia baseada em Mensor et al. (2001) e está apresentada na Figura 36, sendo que os resultados foram comparados ao antioxidante sintético BHT. Os extratos de *P. major* e *P.*

lanceolata apresentam elevada atividade antioxidante comparável à do antioxidante usado como padrão de referência. Os bons resultados de atividade antioxidante verificados com o uso da água, mesmo em altas temperaturas, já eram esperados e podem ser explicados aos maiores teores de compostos fenólicos extraídos nessas condições, bem como pelos produtos das reações de Maillard e caramelização que ocorrem nessas condições (AHMAD; LANGRISH, 2012; AMAROWICZ, 2009; BRUDZYNSKI; MIOTTO, 2011; RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2010).

Figura 34 - Teor de fenólicos totais (TFT) dos extratos de *P. major* (a) e *P. lanceolata* (b) obtidos por diferentes técnicas de extração.



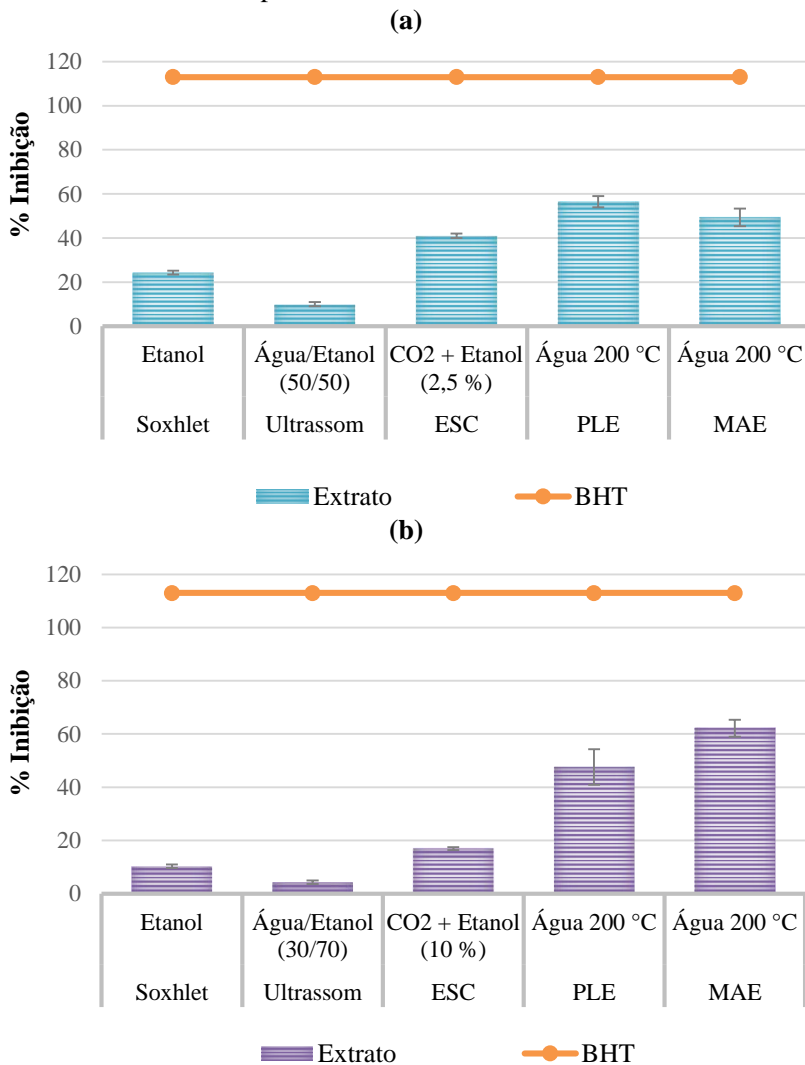
(a)



(b)

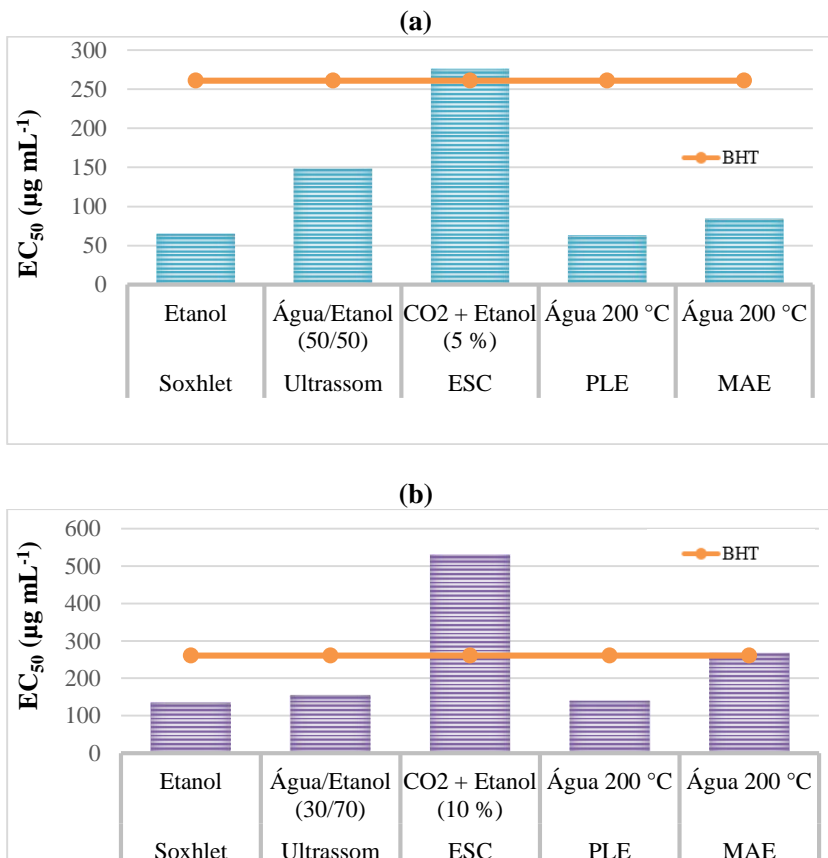
Onde: ESC = extração supercrítica; PLE = extração com líquidos pressurizados (água subcrítica); MAE = extração assistida por micro-ondas.

Figura 35 - Atividade antioxidante dos extratos de *P. major* (a) e *P. lanceolata* (b) obtidos por diferentes técnicas de extração através do método descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos através do percentual de atividade antioxidante.



Onde:ESC = extração supercrítica; PLE =extração com líquidos pressurizados (água subcrítica); MAE =extração assistida por micro-ondas.

Figura 36 - Atividade antioxidante dos extratos de *P. major* (a) e *P. lanceolata* (b) obtidos pelo método DPPH, expressos em termos de EC_{50} .



Onde: ESC = extração supercrítica; PLE =extração com líquidos pressurizados (água subcrítica); MAE =extração assistida por micro-ondas.

4. Visão global dos processos

As Figuras 37 e 38 representam um comparativo das técnicas de estudadas para a extração de *P. major* e *P. lanceolata*, respectivamente, em termos de rendimento global, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante, tempo de extração e volume estimado de solvente. A atividade antioxidante foi representada pela porcentagem de inibição determinada pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

O volume de solvente é um dado bastante relevante, visto os gastos energéticos e de tempo envolvidos na remoção desses solventes do extrato. Embora o volume de etanol utilizado como cossolvente na ESC seja elevado, nos ensaios realizados no LATESC foi observado que uma parte representativa desse solvente evapora durante a extração, de forma que o volume final é menor. Os menores volumes de solvente foram utilizados na técnica de extração assistida por micro-ondas.

Para uma análise mais completa desses processos faltam alguns dados importantes, tais como: tempo de remoção dos solventes, custo do processo de produção e composição completa desses extratos. Com base nos dados disponíveis na Figura 37 e a Figura 38, as extrações com água a 200 °C em PLE e MAE são as que apresentam resultados mais satisfatórios na obtenção de extratos com atividade antioxidante. Nessas condições são obtidos altos rendimentos e extratos com forte atividade antioxidante. Além disso, apresentam menores tempos de extração e a utilização de pequenos volumes de solvente.

Figura 37 - Comparativo das técnicas de extração para *P. major*

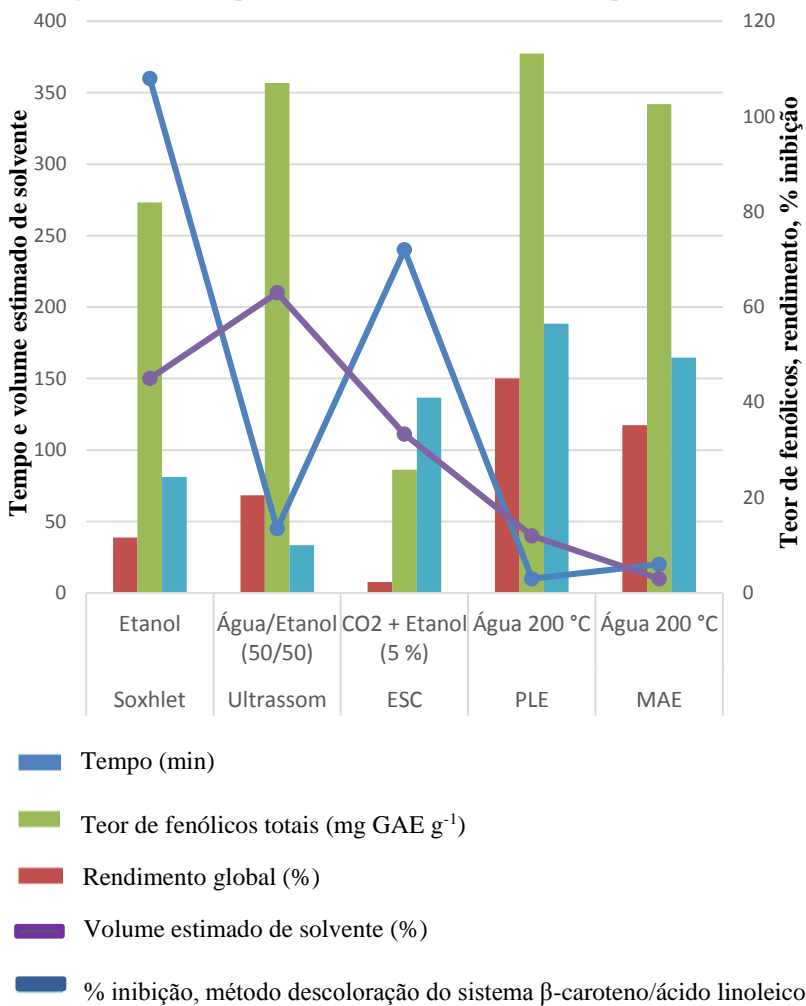
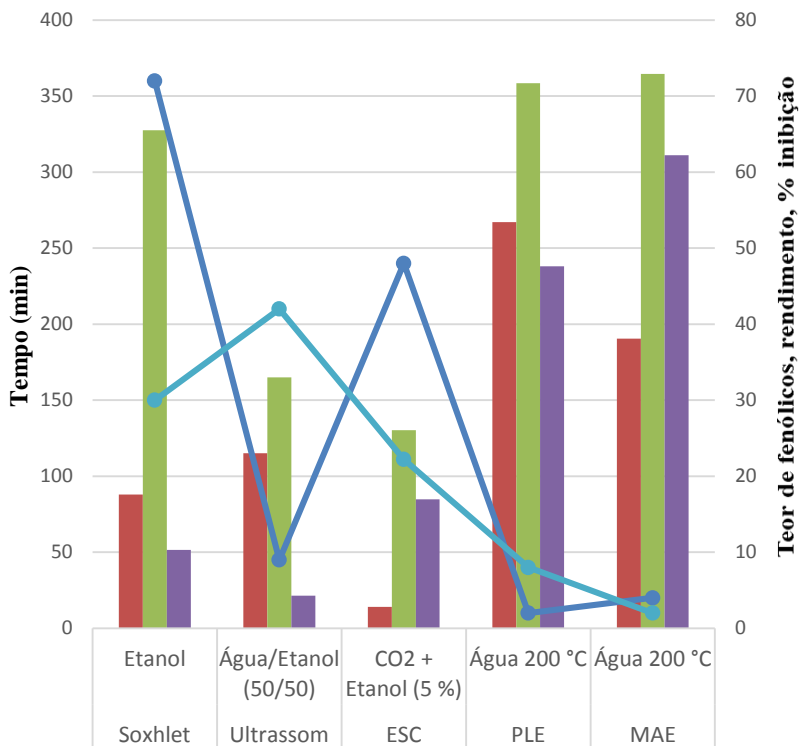


Figura 38 - Comparativo das técnicas de extração para *P. lanceolata*



- Tempo (min)
- Teor de fenólicos totais (mg GAE g⁻¹)
- Rendimento global (%)
- % inibição, método descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico
- Volume estimado de solvente (%)

Capítulo 6

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

1. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados nos Capítulos 3, 4 e 5 desse trabalho mostraram que a *Plantago major* e *Plantago lanceolata* podem ser utilizadas como matéria-prima para a obtenção de extratos bioativos com atividade antioxidante e antimicrobiano. As diferentes técnicas de extração avaliadas permitiram visualizar como a metodologia de extração aplicada pode influenciar no rendimento de extração e nas atividades biológicas apresentadas pelos extratos.

Os maiores rendimentos de extração foram obtidos com água subcrítica a 200 °C (PLE), sendo 45,03% para *P. major* e 53,4% para *P. lanceolata*. As extrações assistidas com micro-ondas em altas temperaturas também propiciaram altos rendimentos, por volta de 35%. Esses valores são significativamente maiores aos obtidos por ESC com o uso de cossolvente (em torno de 2%) e das extrações com solventes orgânicos em Soxhlet e ultrassom (em torno de 20%).

Na avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por ESC apresentaram melhores resultados em comparação aos de Soxhlet e ultrassom, sendo mais efetivos contra o *Bacillus cereus*. Os extratos obtidos por ESC de *P. major* (10 MPa/40 °C) e de *P. lanceolata* (20 MPa/60 °C) apresentaram valores de concentração mínima inibitória para *B. cereus* de 15,62 e 31,25 µg mL⁻¹, respectivamente, podendo ser classificados como forte atividade antimicrobiana. A análise cromatográfica por GC-EM revelou a presença dos ácidos graxos α -linolênico e palmítico (e seus derivados) e do α -sitosterol, compostos que podem estar relacionados à forte atividade antimicrobiana dos extratos.

A extração de *P. major* e *P. lanceolata* possibilita a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos e com forte atividade antioxidante. O teor de fenólicos totais das extrações com água como solvente e altas temperaturas em PLE e MAE foi comparável aos resultados obtidos com solventes mais polares (etanol e mistura de água/etanol) nas técnicas de Soxhlet e ultrassom. Em relação à atividade antioxidante, os resultados demonstram que todas as técnicas podem ser utilizadas para a obtenção de extratos com forte atividade antioxidante, sendo necessário para isso, solventes de maior polaridade em Soxhlet, ultrassom e ESC com cossolvente e o uso de altas temperaturas em PLE e MAE.

A análise cromatográfica dos extratos obtidos por PLE e MAE com água como solvente revelou a presença dos compostos verbascosídeo, isoverbascosídeo e da plantamajoside. Esses compostos podem estar relacionados ao alto atividade antioxidante verificado para esses extratos. A presença desses compostos bioativos sugere que estes extratos podem apresentar, além da forte atividade antioxidante, ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral.

Os resultados das extrações sequenciais em PLE com água indicam que os ótimos resultados em termos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos principalmente em altas temperaturas podem ser resultado da formação de novos compostos devido as reações que ocorrem no meio. Esses resultados demonstram que as técnicas de MAE e PLE podem ser utilizadas como estratégias para obter produtos com melhores atividades biológicas.

Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a *P. major* e a *P. lanceolata* são fontes valiosas de compostos bioativos, não só para aplicações biomédicas ou farmacêuticas, mas que também podem ser utilizados na indústria de alimentos. De maneira geral, extratos com altos rendimentos aliados a forte atividade antioxidante podem ser obtidos pelo emprego da água em PLE e MAE em altas temperaturas ou com o uso de solventes de maior polaridade em Soxhlet e extração assistida por ultrassom. Extratos com forte atividade antimicrobiana podem ser obtidos pelo emprego da extração com fluido supercrítico com CO₂.

2. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Testar os extratos obtidos ESC para mais espécies de bactérias e fungos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral dos extratos obtidos com água.
- Realizar uma extração sequencial: ESC + extração com água, avaliando atividades antioxidantes e antimicrobiana;
- Micronizar e encapsular os melhores extratos de *P. major* e *P. lanceolata* obtidos por água subcrítica e extração assistida por micro-ondas
- Testar a atividade antimicrobiana dos extratos micronizados e encapsulados.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M. Possible Role for *Plantago Lanceolata* in the Treatment of HIV Infection? **Townsend Letter**, n. 275, p. 92, 2006.
- AFRICA MUSEUM. **Plantago lanceolata**. Disponível em: <http://www.africamuseum.be/prelude/prelude_pic/Plantago_lanceolata12.jpg>. Acesso em: 13 abr. 2015.
- AHMAD, J.; LANGRISH, T. A. G. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 162–174, mar. 2012.
- ALIPIEVA, K. et al. Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1065–1076, nov. 2014.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMAROWICZ, R. Antioxidant activity of Maillard reaction products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 2, p. 109–111, 1 fev. 2009.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544–552, 2012.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. DE. **International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide**. Oxford: Pergamon Press, 1976.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, p. 126, 2011.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18.

ed. Maryland: [s.n.].

AŞKIN ÇELİK, T.; ASLANTÜRK, Ö. S. Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells. **Biologia**, v. 61, n. 6, p. 693–697, 2006.

ÁVILA, H. P. et al. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790–9794, 2008.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, ago. 2013.

BADARINATH, A. V. et al. A review on In-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.

BALAMURUGAN, R.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of ??-sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. 1-3, p. 410–418, 2011.

BEARA, I. N. et al. Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9268–73, 2009.

BEARA, I. N. et al. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 64–70, 2012.

BENELLI, P. et al. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010.

BLANCO, B.; SABORIO, A.; GARRO, G. Descripción anatómica ,

propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (Ilantén mayor). **Tecnología en Marcha**, v. 21, n. 2, p. 17–24, 2008.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–20, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRANEN, J.; DAVIDSON, P. M. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. **Letters in applied microbiology**, v. 30, n. 3, p. 233–7, 2000.

BRUDZYNSKI, K.; MIOTTO, D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 869–874, fev. 2011.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**. Heidelberg: Steinkopff, 1994. v. 4

BRUNNER, G. Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 373–381, jan. 2009.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218–228, 2014.

BURDICK & JACKSON. **Dielectric Constant**. Disponível em: <[http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Dielectric Constant .htm](http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Dielectric%20Constant.htm)>. Acesso em: 29 fev. 2015.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

BYERS, J. A. **Catálogo Phenomenx**. Disponível em:
<<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2014.

CARDINALI, A. et al. Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1822–1829, 22 fev. 2012.

CARR, A. G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N. R. A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, n. 1, p. 1–17, 2011.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

CHÁECIA. **Tansagem**. Disponível em:
<http://www.chaecia.com.br/loja/produto111058-1339-tanchagem_plantago_major_1_100_grg>. Acesso em: 1 nov. 2013.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 8615–8627, 11 jul. 2012.

CHEMFACES. **Plantamajoside, acteoside and iso-acteoside**. Disponível em: <<http://www.chemfaces.com/natural/Plantamajoside-CFN99522.html>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, 2012.

CHIANG, L. C. et al. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. **Antiviral research**, v. 55, n. 1, p. 53–62, 2002.

CHIANG, L. C. et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 600–604, 2003.

COSTA, A. R. M. et al. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 86–96, maio 2015.

DAINTREE, L. S.; KORDIKOWSKI, A.; YORK, P. Separation processes for organic molecules using SCF Technologies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 351–372, 2008.

DALAR, A.; TÜRKER, M.; KONCZAK, I. Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 2, p. 42–51, 2012.

DAVEY, M. Effects of elevated CO₂ on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 15, p. 2197–2204, ago. 2004.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 3 fev. 2010.

DÍAZ-REINOSO, B. et al. Membrane concentration of antioxidants from *Castanea sativa* leaves aqueous extracts. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, n. 1, p. 95–102, 2011.

DIONEX. **ASE 200 Accelerated Solvent Extraction System**. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/products/sample-preparation/ase/instruments/lp-81380.html>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

DOAN, D. D. et al. Studies on the individual and combined diuretic effects of four Vietnamese traditional herbal remedies (*Zea mays*,

Imperata cylindrica, Plantago major and Orthosiphon stamineus). **Journal of ethnopharmacology**, v. 36, p. 225–231, 1992.

DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.

DUKE, J. A.; BECKSTROM-STERNBERG, S. M. **Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Database**. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chem-activities.pl>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

EGGERS, U.; JAEGER, P. Extraction Systems. In: LIADAKIS, G.; TZIA, C. (Eds.). . **Extraction Optimization in Food Engineering**. Food Science and Technology. [s.l.] CRC Press, 2003. v. 128.

EMA. **Community herbal monograph on Plantago lanceolata L., folium**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_Community_herbal_monograph2011/01/WC500101387.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2013.

FAROKHI, F.; KHANESHI, F. Histopathologic changes of lung in asthmatic male rats treated with hydro-alcoholic extract of Plantago major and theophylline. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 3, n. 2, p. 143–51, 2013.

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 205–217, 2004.

FLEER, H.; VERSPOHL, E. J. Antispasmodic activity of an extract from Plantago lanceolata L. and some isolated compounds. **Phytomedicine**, v. 14, n. 6, p. 409–415, 2007.

FLEURENTIN, J.; MAZARS, G.; FELT, J. M. Additional information on the cultural background of drugs and medicinal plants of Yemen. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 335–344, 1983.

FLÓREZ, N.; CONDE, E.; DOMÍNGUEZ, H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 590–607, abr. 2015.

FREITAS, M. S. M. et al. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 30–34, 2004.

FUNES, L. et al. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 2, p. 190–199, fev. 2010.

GÁLVEZ, M. et al. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 125–130, 2003.

GÁLVEZ, M. et al. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1927–1933, 2005.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 213–226, maio 2016.

GRUBEŠIĆ, R. J. et al. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 837–842, 2005.

HAGHIGHI, A.; KHAJENOORI, M. Subcritical Water Extraction. In: **Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling**. [s.l.] InTech, 2013.

HARRI LORENZI; MATOS, F. J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas**. Nova Odessa - SP: nstituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

HEFLER, S. M.; RODRIGUES, W. A.; CERVI, A. C. O gênero *Plantago L.* (Plantaginaceae) na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, p. 297–321, 2011.

HEIMLER, D. et al. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1724–1729, 2007.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–511, 2010.

HERRERO, M. et al. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67–83, fev. 2013.

HERRERO, M. et al. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 1–13, 2015.

HERRERO, M.; CIFUNTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HOLLENDER, J. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases1. **Journal of Chromatography A**, v. 776, n. 2, p. 233–243, 1997.

IBAÑEZ, E. et al. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 2, p. 375–82, 2003.

JADHAV, D. et al. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 421–426, 2009.

JANKOVIĆ, T. et al. Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 69–74, 2012.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

KABGANIAN, R. et al. Localization of Alkamides, Echinacoside and Cynarin with *Echinacea angustifolia*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 10, n. 2, p. 73–81, jul. 2003.

KANG, H. J. et al. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 614–620, 2006.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols**. [s.l: s.n.].

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KARTINI et al. HPTLC simultaneous quantification of triterpene acids for quality control of *Plantago major* L. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 239–246, 2014.

KASSING, M. et al. A new approach for process development of plant-based extraction processes. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 3, p. 377–387, 2010.

KÉRY, Á. et al. Analysis of medicinal plant phenoloids by coupled tandem mass spectrometry. **Ph.D. Thesis , Semmelweis University Doctoral School of Pharmaceutical Sciences**, p. 6–7, 2010.

- KING, J. W.; SRINIVAS, K. Multiple unit processing using sub- and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 598–610, 2009.
- KITZBERGER, C. S. G. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 2, p. 631–638, 2007.
- KOBEASY, M. I. et al. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 3, n. March, p. 83–91, 2011.
- KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 525–533, jul. 2005.
- LI, L. et al. Identification of Phenylethanoid Glycosides in Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 541–545, mar. 2009.
- LIU, Y.-H. et al. Inhibitory activities of acteoside, isoacteoside, and its structural constituents against protein glycation in vitro. **Botanical Studies**, v. 54, n. 1, p. 6, 2013.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–9, 2010.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: A powerful tool for leaching. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.
- MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496,

2007.

MARTINES, M. A. U. et al. O Efeito Do Ultra-Som Em Reações Químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTINEZ, J. (Ed.). . **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds.** Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 25–49.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444–3452, 2002.

MAZZUTTI, S. et al. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48–56, 2012.

MCCUTCHEON, A. R. et al. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 157–169, 1994.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: JOSE L. MARTÍNEZ (Ed.). . **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds.** Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 243–274.

MELESE, E. et al. Evaluation of the anti-peptic ulcer activity of the leaf extract of *Plantago lanceolata* L. in rodents. **Phytotherapy research : PTR**, v. 25, n. 8, p. 1174–1180, 2011.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D.

Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533–539, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

METİNER, K. Antibacterial Effects of Ethanol and Acetone Extract of *Plantago major L.* on Gram Positive and Gram Negative Bacteria Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-5824 Gram Pozitif ve Gram Negatif Bakteriler üzerine *Plantago major L.* ' nin Etanol ve Aseton Ek. v. 18, n. 3, p. 503–505, 2012.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–16, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum L.*) oleoresin: Comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 2, p. 131–138, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6615–23, 2009.

MILLER, D. J. et al. Solubility of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Subcritical Water from 298 K to 498 K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 43, p. 1043–1047, 1998.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, fev. 2012.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical**

Carbon Dioxide. [s.l.] CRC Press, 2000.

NHIEM, N. X. et al. Inhibitory activity of *Plantago major* L. on angiotensin I-converting enzyme. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 3, p. 419–23, 2011.

NÚÑEZ GUILLÉN, M. E. et al. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Aqueous Extract of *Plantago major* L. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 2, p. 99–104, jan. 1997.

OLIVEIRA, D. A. et al. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423–432, abr. 2013.

OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, maio 2016.

ONG, E. S.; CHEONG, J. S. H.; GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 92–102, abr. 2006.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PALMA, M. et al. Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5044–5048, dez. 1999.

PAPETTI, A. Isolation and characterization of antimicrobial food components. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 168–173, 2012.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of

bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137–150, 2006.

PLAZA, M. et al. Neof ormation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1123–1129, maio 2010.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, set. 2015.

RAVN, H. W. et al. Plantamajoside — A current review. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 42–53, jun. 2015.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, abr. 1997.

RODRIGUEZ, J. et al. Hypoglycaemic activity of Geranium core-core, Oxalis rosea and Plantago major extract in rats. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 6, p. 372–374, 1994.

RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I. et al. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from Haematococcus pluvialis microalga. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 456–463, 2010.

RØNSTED, N. et al. Chemotaxonomy and evolution of Plantago L. **Plant Systematics and Evolution**, v. 242, n. 1-4, p. 63–82, 2003.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 409–424, 12 fev. 2012.

RUMBALL, W. et al. “Grasslands Lancelot” plantain (*Plantago lanceolata* L.). **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 40, p. 373–377, 1997.

SAMUELSEN, A. B. A Review: The Traditional Uses, Chemical Constituents and Biological Activities of *Plantago major* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 1–21, 2000.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of ...**, v. 35, p. 275–280, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 184–188, 1992.

SEIFI, H. et al. Chemometric Resolution Approaches in Characterisation of Volatile Constituents in *Plantago ovata* Seeds using Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Methodology and Performance Assessment. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 3, p. 273–281, maio 2014.

SIEVERS, G.; NANNIG, S. Effect of the supplementary feeding with *Plantago lanceolata* on the egg output of gastrointestinal nematodes in calves. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 38, n. 3, p. 233–238, 2006.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. [s.l.] UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI J A JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of ethnopharmacology**, v. 45, p. 177–181, 1995.

SMITH, R. M. Superheated water: the ultimate green solvent for separation science. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 385, n. 3, p. 419–421, 2006.

SOARES, L. A. L. et al. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus Niruri*. (Quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Cardernos de farmácia**, v. 14, n. 1/2, p. 21–26, 1998.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 323–331, 2010.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409–414, 1994.

STANISAVLJEVIC, I. et al. Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Extracts from Plantain (*Plantago Major* L.) Leaves. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 14, p. 3652–3662, 2008.

STARMANS, D. A. J.; NIJHUIS, H. H. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 191–197, 1996.

STENHOLM, Å.; GÖRANSSON, U.; BOHLIN, L. Bioassay-guided supercritical fluid extraction of cyclooxygenase-2 inhibiting substances in *plantago major* L. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 2, p. 176–183, 2013.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.

SUFLUX. **Supercritical plant**. Disponível em:
<<http://www.suflux.com>>. Acesso em: 2 maio. 2014.

SULTANBAWA, Y. Plant antimicrobials in food applications: Minireview. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). . **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Microbiology Book Series. [s.l.] Formatex Research Center, 2011. p. 1084–1093.

SUS. **Plantas de Interesse ao SUS**. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277>. Acesso em: 15 ago. 2014.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199–1218, 2010.

TALANSIER, E. et al. Supercritical fluid extraction of vetiver roots: A study of SFE kinetics. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 200–208, 2008.

TIAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 173–179, 2009.

TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 175, p. 366–73, 15 maio 2015.

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 85–99, 2004.

TÜREL, I. et al. Hepatoprotective and Anti-inflammatory Activities of *Plantago major* L. **Indian journal of pharmacology**, v. 41, n. 3, p. 120–124, 2009.

VALGAS, C. et al. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369–380, 2007.

VENKATA RAMAN, B. et al. Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. SUPPL 2, p. 99–106, 2012.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando à produção de substâncias antibacterianas.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303–313, 2001.

VOON, H. C.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34–55, 2012.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WANG, Y. S. et al. New monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**, v. 13, p. 931–937, 2008.

WEENEN, H. et al. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 56, n. 4, p. 368–370, 1990.

WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E. et al. **COMMERCIALY IMPORTANT PROPERTIES OF PLANTS OF.** v. 65, n. 1, p. 11–20,

2012.

WESCH, A.; DAHMEN, N.; EBERT, K. H. Measuring the static dielectric constants of pure carbon dioxide and carbon dioxide mixed with ethanol and toluene at elevated pressures. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 100, n. 8, p. 1368–1371, ago. 1996.

WHO. Fructus Hippophaës recens. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). n. Geneva, p. 187–197, 2010.

WIKIMEDIA. **Plantago major**. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plantago_major_Blanco1.20cropped.jpg>. Acesso em: 12 fev. 2014.

WONG, I. Y. et al. Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3113–9, 2001.

XIAO, W.; HAN, L.; SHI, B. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 614–618, set. 2008.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4251–4260, 14 maio 2014.

XU, C. et al. Antidepressant effect of three traditional Chinese medicines in the learned helplessness model. **Proceedings - Geometric Modeling and Processing 2004**, v. 91, p. 345–348, 2004.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 41–48, 2006.

YOSHIDA, T. et al. *Plantago lanceolata* L. leaves prevent obesity in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet. **Natural product research**, v. 27, n. 11, p. 982–987, 2013.

ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. **Compilation of batch SFE-Models for natural products**Iberoamerican Conference On Supercritical fluids (PROSCIBA). **Anais...Foz do Iguaçu: Cadernos de Resumos do PROSCIBA 2007**, 2007

ZHANG, M. et al. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1530–1536, dez. 2011.

ZHAO, Z. P. et al. Concentration of ginseng extracts aqueous solution by vacuum membrane distillation. 1. Effects of operating conditions. **Desalination**, v. 234, n. 1-3, p. 152–157, 2008.

ZHENG, C. J. et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS letters**, v. 579, n. 23, p. 5157–5162, 2005.

ZHOU, Q. et al. Identification and Quantification of Phytochemical Composition and Anti-inflammatory, Cellular Antioxidant, and Radical Scavenging Activities of 12 *Plantago* Species. **J. Agric. Food Chem.**, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Curva analítica de ácido gálico

APÊNDICE 1: Curva analítica de ácido gálico

Figura 39 - Curva analítica de ácido gálico utilizada no cálculo de TFT dos extratos de *P. major* e *P. lanceolata* do Capítulo 3.

