



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JULIA CIARLINI JUNGER SOARES

**AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA EXTRAÇÃO COM
CO₂ SUPERCRÍTICO DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata*
(CEREJEIRA-DO-MATO) DA FLORESTA OMBRÓFILA
MISTA DE SANTA CATARINA**

FLORIANÓPOLIS
2017

JULIA CIARLINI JUNGER SOARES

**AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA EXTRAÇÃO COM
CO₂ SUPERCRÍTICO DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata*
(CEREJEIRA-DO-MATO) DA FLORESTA OMBRÓFILA
MISTA DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Coorientadora: Dr^a. Alessandra Marangoni

FLORIANÓPOLIS
2017

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

Soares, Júlia Ciarlini Junger

Avaliação da Seletividade da Extração com CO_2 Supercrítico das Folhas de *Eugenia involucrata* (Cerejeira-do-Mato) da Floresta Ombrófila Mista de Santa Catarina / Júlia Ciarlini Junger Soares ; orientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientadora, Alessandra Marangoni – Florianópolis, SC, 2017.

123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. extração supercrítica. 3. *Eugenia involucrata*. 4. seletividade. 5. β -elemeno. I. Bolzan Ariovaldo. II. Marangon, Alessandra. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Titulo.

Termo de Aprovação

A minha mãe Celita, mulher guerreira que me proporcionou a dádiva de estar viva e todas as oportunidades de desfrutar das belezas e possibilidades que esse mundo oferece.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha mãe, por ter proporcionado toda a base de minha educação e todo o suporte para que um dia eu chegasse até aqui.

A todos os profissionais e colegas envolvidos na minha formação como engenheira química, desde a UFRN (Natal-RN), passando pelo *Rose-Hulman Institute of Technology* (Terre Haute-IN, EUA), e finalizando na *École nationale supérieure des Mines d'Albi-Carmaux* (Albi, França). Sou muito grata a cada professor(a), pesquisador(a), técnico(a) e colega de curso que participou de alguma forma dessa fase intensa de formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Arioaldo Bolzan, pela confiança e orientações neste período de aprendizado.

À equipe da Fundação CERTI e à Fundação Grupo Boticário, pelo projeto Araucária +, motivador do tema deste trabalho, e pela ajuda na coleta de material.

À equipe de trabalho do LCP-EQA-UFSC, Daniela, Alessandra, André, Deise, Thuany e tantos outros, por toda orientação, ajuda, conselhos, descontração e paciência. Sem vocês, tudo seria mais difícil.

À equipe do LATESC-EQA-UFSC, por disponibilizar gentilmente seu tempo e espaço para a realização de diversas etapas deste trabalho, e ao Leandro da Central de Análises do EQA-UFSC, pelas análises cuidadosas e discussões enriquecedoras.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado que viabilizou minha permanência em Florianópolis.

À Capoeira Angola, por tornar meus dias em Florianópolis mais alegres, plenos e cheios de sentido.

A todas as amigas e a todos os amigos que, estando longe ou perto, se preocuparam e torceram para o sucesso dessa etapa de minha vida.

Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar.

Chico Science

RESUMO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), também chamada Floresta com Araucárias, predominante no sul do Brasil, é uma formação florestal cuja biodiversidade é de extrema importância ambiental, econômica e cultural. A intensa e predatória exploração madeireira das araucárias provocou uma drástica redução da área originalmente ocupada pela espécie, levando-a a ser considerada como ameaçada de extinção e como criticamente em perigo desde 2006. No ímpeto de amortecer os danos causados nessa formação florestal, a Fundação Grupo Boticário e a Fundação CERTI uniram-se em 2012 para dar início ao projeto Araucária+, cujo objetivo geral é de estruturar um ambiente de inovação para a conservação da FOM, com foco na valorização das cadeias produtivas do pinhão, da erva-mate e, por que não, de produtos de outras espécies presentes na FOM, como compostos bioativos de interesse farmacêutico, cosmético ou alimentício. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o estudo do extrato das folhas da espécie *Eugenia involucrata*, conhecida como cerejeira-do-mato e nativa dessa formação florestal, com ênfase na utilização da tecnologia de extração com fluido supercrítico (ESC), um método promissor em termos de seletividade, eficiência, pureza do produto e compatibilidade ambiental. Devido ao caráter seletivo dessa técnica, acredita-se que seus extratos possam resultar em um maior teor dos compostos característicos dessa planta do que aqueles obtidos por técnicas convencionais, além de uma melhor qualidade do produto. Para confirmar essa hipótese, foram realizados experimentos de extração com as técnicas Soxhlet com hexano, hidrodestilação em aparato Clevenger e ESC com CO₂ como solvente sob diversas condições operacionais (80-200 bar e 33-47 °C), submetendo todos os tipos de extrato à análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS) e à avaliação de potencial antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico. Seus desempenhos foram comparados também em relação ao rendimento. A técnica de ESC resultou em um rendimento mássico global intermediário entre Soxhlet (4%) e hidrodestilação (0,37%), sendo de cerca de 1% para diversas condições. As curvas de extração e o gráfico da variação do rendimento global com a densidade do CO₂ supercrítico foram obtidos para tentar compreender os fenômenos envolvidos na transferência de massa do processo ESC e para determinar o tempo de extração para componentes específicos. Os

compostos principais encontrados no óleo essencial e extratos hexânico e supercrítico das folhas de *E. involucrata* foram os sesquiterpenos β -elemeno, biciclogermacreno, germacreno D e cariofileno, além de vitamina E para o caso dos extratos ESC. O método ESC se mostrou mais seletivo que o Soxhlet e tão seletivo quanto a hidrodestilação em relação ao teor de β -elemeno e biciclogermacreno em conjunto; ainda, para um determinado momento da sua dinâmica de extração, a ESC demonstrou uma seletividade também superior à hidrodestilação, exibindo um teor de 100% de β -elemeno + biciclogermacreno para a fração volátil do extrato no período entre 50 e 80 minutos de ESC. Os extratos ESC e Soxhlet resultaram em alta atividade antioxidante (>90%), enquanto o óleo essencial foi considerado inativo (<10%). Foi possível concluir que o extrato ESC combina os aspectos positivos dessas duas técnicas convencionais, como o alto teor de β -elemeno e biciclogermacreno do óleo essencial e o alto potencial antioxidante do extrato hexânico.

Palavras-chave: extração supercrítica, *Eugenia involucrata*, seletividade, β -elemeno, biciclogermacreno.

ABSTRACT

The Mixed Rain Forest (MRF), also known as Araucaria Forest, predominant in Southern Brazil, owns a very important biodiversity under environmental, economic and cultural aspects. An intense exploitation of *Araucaria angustifolia* by the wood sector has caused a dramatic decrease of the area originally occupied by this species, leading it to the status of extinction threatened species and critically endangered since 2006. In an attempt to repair the damages caused to this forest, the *Fundação Grupo Boticário* and the *Fundação CERTI* became partners in 2012 to initiate a project called *Araucária+*, aiming to create an innovation environment to the conservation of MRF. The focus of this project lays on the valorization of pinion and yerba mate production chains, and also in the development of new valuable products originated from other MRF native species, such as bioactive compounds with applications in pharmaceutical, cosmetic or food industry. In this context, the current work proposes the evaluation of the extract from the leaves of *Eugenia involucrata*, known as “cerejeira-do-mato”, exploring the supercritical fluid extraction (SFE) technology as the main route, which is a promising method with respect to selectivity, efficiency, purity and environmental compatibility. Owing to its selectivity, the supercritical extracts may result in a higher content of the plant’s main compounds and higher product quality compared to conventional techniques. To confirm this hypothesis, extraction experiments were performed using Soxhlet with hexane, hydrodistillation and SFE with CO₂ as solvent under several operational conditions (80-200 bar and 33-47°C). All the extracts were proceeded to chemical profile analysis in GC/MS and to antioxidant activity evaluation using the β -carotene/linoleic acid method. The performances were also compared with regard to the global yield of extract. The SFE yielded approximately 1% of extract under many conditions, which was lower than the Soxhlet yield (4%) but greater than the essential oil yield by hydrodistillation (0,37%). The extraction curves and a plot of global yield as a function of supercritical CO₂ density were obtained in an attempt to elucidate the phenomena involved in the SFE mass transfer and to determine the extraction time of specific components. The major compounds identified in the essential oil, Soxhlet and SFE extracts were the sesquiterpenes β -elemene, bicyclogermacrene, germacrene D and caryophyllene, besides vitamin E in the case of SFE extracts. The SFE method has shown to be more selective than Soxhlet and as selective as hydrodistillation regarding the β -elemene and bicyclo-

germacrene overall content; additionally, in a given moment of its extraction dynamics (50-80 minutes), the SFE has exhibited an even higher selectivity, with a β -elemene + bicyclogermacrene content of 100% in the volatile fraction of the extract, which is superior than the hydrodistillation content of 65% for both components together. The Soxhlet and SFE extracts resulted in high antioxidant activity (>90%) while the essential oil was considered inactive (<10%). It was possible to conclude that the SFE extracts combines the positive aspects of both conventional techniques tested, such as the high β -elemene + bicyclogermacrene content in the essential oil and the high antioxidant potential of the Soxhlet extract.

Keywords: supercritical extraction, *Eugenia involucrata*, selectivity, β -elemene, bicyclogermacrene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplos de compostos bioativos: alcaloides (A), terpenoides (B) e compostos fenólicos (C).....	38
Figura 2 – Fotografias das árvores (A), frutos (B) e folhas (C) da cerejeira-do-mato.	40
Figura 3 – Microfotografias da estrutura foliar de <i>E. involucrata</i> , mostrando seus feixos vasculares (A) e suas bolsas oleíferas (B).....	40
Figura 4 – Estrutura molecular dos isômeros do elemeno: β -elemeno (A) e γ -elemeno (B).	42
Figura 5 – Estruturas moleculares dos compostos biciclogermacreno (A), germacreno D (B) e cariofileno (C).	43
Figura 6 – Tendência crescente de publicações na área de extração com fluido supercrítico. Consulta realizada no portal Science Direct (sciencedirect.com) em 06 de fevereiro de 2017 com ‘supercritical extraction’ presente no título, resumo ou palavras-chave.	48
Figura 7 – Solubilidade em CO ₂ -SC de diversos componentes de material vegetal. Compostos de OE: limoneno, α -pineno e linalool; compostos fenólicos: ácido protocatecuico, galato de metila e ácido p-cumárico; pigmentos: β -caroteno; ceras: n-C ₂₈ H ₅₈ . Faixa de temperatura de 35 a 50 °C.	51
Figura 8 – Os três diferentes períodos de extração normalmente reportados para o processo de ESC de matrizes vegetais e sua curva de extração.	57
Figura 9 – Tendências do uso de planejamento experimental em artigos sobre ESC entre 2000 e 2013, dentre 547 publicações consideradas. ...	60
Figura 10 – Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente trabalho.....	61
Figura 11 – Aparato utilizado para a extração com solvente orgânico via Soxhlet.....	62

Figura 12 – Sistema utilizado para a extração por hidrodestilação, com destaque para a interface formada entre água e óleo no tubo separador do aparato Clevenger (direita).....	64
Figura 13 – Diagrama do processo de extração supercrítica adotado. B1 – bomba de alta pressão para introdução de CO ₂ ; B2 e B3 – bombas de alta pressão para introdução de cossolvente/eluente; E – vaso extrator; BP – regulador backpressure; H – sistema de aquecimento controlado.	67
Figura 14 – HPLC supercrítico utilizado nos experimentos (esquerda) e cápsula de extração (direita) aberta, carregada de folhas moídas de <i>E. involucrata</i> . O destaque em vermelho indica a posição da cápsula no equipamento durante sua operação.	67
Figura 15 – Representação esquemática da estrutura de uma folha, mostrando a localização das ceras e dos vacúolos onde o óleo essencial é armazenado.	72
Figura 16 – Aparência do extrato hexânico bruto das folhas de cerejeira-do-mato após rotaevaporação do solvente.	76
Figura 17 – Distribuição granulométrica das partículas utilizadas em todos os experimentos (ESC, Soxhlet e HD).	82
Figura 18 – Superfície de resposta gerada pelo Statistica 10 para o DCC da ESC das folhas de cerejeira-do-mato.	84
Figura 19 – Tendência linear da relação entre as variáveis de rendimento e densidade do CO ₂ -SC, incluindo a equação da reta e o coeficiente de determinação R ²	87
Figura 20 – Valores preditos vs. observados e análise de resíduos para o estudo variando a densidade do CO ₂ -SC.	88
Figura 21 – Curva de extração nº1. As barras de erro representam o desvio padrão.....	89
Figura 22 – Curva de extração nº2. As barras de erro representam o desvio padrão.....	89

Figura 23 – Curva de extração nº3. As barras de erro representam o desvio padrão.....	90
Figura 24 – Gráfico comparativo das curvas de extração. As barras de erro representam os desvios padrão.....	91
Figura 25 – Tendência linear de cada etapa da ESC das folhas de cerejeira-do-mato em função da massa de CO ₂ -SC. Utiliza-se como exemplo a dinâmica nº2.....	92
Figura 26 – Tendência linear de cada etapa de ESC das folhas de cerejeira-do-mato em função do tempo de extração. Utiliza-se como exemplo a dinâmica nº2.....	93
Figura 27 – Teste adicional de curva de extração com a condição de 200 bar e 40 °C e duração de 7 h, em duplicata. Destacam-se as primeiras 3 h de ESC. As barras de erro representam os DP.	96
Figura 28 – Testes adicionais de curva de extração com a condição de 200 bar e 40 °C e vazões de 3, 5 e 7 mL/min.....	98
Figura 29 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas pressões de 140 e 200 bar com T = 40 °C.....	101
Figura 30 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas pressões de 98 e 182 bar com T = 35 °C e T = 45 °C.	102
Figura 31 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas temperaturas de 33, 40 e 47 °C a uma pressão fixa de 140 bar.	103
Figura 32 – Estrutura molecular da vitamina E (C ₂₉ H ₅₀ O ₂), um importante antioxidante lipossolúvel identificado em diversas amostras de extrato ESC.	103
Figura 33 – Perfil dinâmico da composição química do extrato supercrítico das folhas de <i>E. involucrata</i> na condição de 200 bar e 40 °C.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação das propriedades termofísicas de fluidos nos estados gasoso, supercrítico e líquido.	50
Tabela 2 – Resumo dos principais efeitos das variáveis de entrada mais estudadas da ESC de matrizes vegetais e suas consequências nos fenômenos envolvidos no processo.	55
Tabela 3 – Codificação das variáveis para o DCC.	68
Tabela 4 – Matriz de planejamento para os experimentos de ESC, incluindo os valores de densidade correspondente de cada par pressão-temperatura.	69
Tabela 5 – Condições empregadas nos experimentos de dinâmica de ESC, sendo n o número de repetições de cada ensaio.	70
Tabela 6 – Valores de densidade de CO ₂ -SC adotados para a elaboração do gráfico Y vs. ρ_f	71
Tabela 7 – Rendimento mássico da extração com hexano via Soxhlet.	75
Tabela 8 – Resultados de GC/MS para o extrato hexânico de <i>E. involucrata</i> do presente trabalho (autora, 2017) e para o óleo volátil isolado pelos autores Paroul et al. (2007) e Ramos et al. (2006).	77
Tabela 9 – Resultados do teste de atividade antioxidante do extrato Soxhlet.	78
Tabela 10 – Resultados dos experimentos de hidrodestilação.	78
Tabela 11 – Resultados de GC/MS para o óleo essencial de <i>E. involucrata</i>	79
Tabela 12 – Resultados do teste de atividade antioxidante para o óleo essencial.	81
Tabela 13 – Características do leito de extração.	83

Tabela 14 – Resultados do DCC para a ESC de <i>E. involucrata</i>	83
Tabela 15 – Estimativa do teor de cera das amostras obtidas com o DCC.	86
Tabela 16 – Rendimentos resultantes do estudo com a densidade do CO ₂ -SC.....	87
Tabela 17 – Taxas de extração das etapas 1, 2 e 3 para as três dinâmicas, com as respectivas médias e DP de cada etapa em função da massa de CO ₂ -SC e do tempo de extração.	94
Tabela 18 – Massa de solvente consumida e tempo de duração de cada etapa para as três dinâmicas com suas respectivas médias e DP.....	94
Tabela 19 – Porcentagem de extrato acumulado ao final de cada etapa em relação ao total extraído nas condições aplicadas com suas respectivas médias e DP.	94
Tabela 20 – Perfil químico dos óleos extraídos nas condições do DCC, mostrando a influência dos parâmetros operacionais na composição química dos extratos.	99
Tabela 21 – Médias e DP do teor de cada composto identificado para o ponto central do DCC.	100
Tabela 22 – Resultados do teste de atividade antioxidante para o extrato ESC (182 bar e 45°C).	106
Tabela 23 – Comparação dos parâmetros e resultados mais relevantes das três técnicas avaliadas.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	β -elemeno
BG	Biciclogermacreno
CER	<i>Constant Extraction Rate</i> (Taxa Constante de Extração)
CERTI	Centro de Referência em Tecnologias Inovadoras
CF	Cariofileno
CO ₂ -SC	Dióxido de Carbono no estado Supercrítico
DCC	Delineamento Composto Central
DP	Desvio Padrão
ESC	Extração com Fluido Supercrítico
FER	<i>Falling Extraction Rate</i> (Taxa Decrescente de Extração)
FOM	Floresta Ombrófila Mista
FSC	Fluido no estado Supercrítico
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa)
GD	Germacreno D
HD	Hidrodestilação
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
IN	Instrução Normativa
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> (União Internacional para Conservação da Natureza)
LATESC- EQA-UFSC	Laboratório de Extração Supercrítica e Termodinâmica – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina
LCP-EQA- UFSC	Laboratório de Controle e Processos Poliméricos – Departamento de Engenharia Química e Engenharia

de Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina

LER	<i>Low Extraction Rate</i> (Baixa Taxa de Extração)
NI	Não identificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
P_{atm}	Pressão atmosférica
SIDOL	Sistema de Identificação Dendrológica Online
TM	Transferência de Massa
VE	Vitamina E

LISTA DE SÍMBOLOS

A	absorbância
AA	atividade antioxidante (%)
d_p	tamanho médio de partícula (mm)
m_p	massa de planta (g)
m_e	massa de extrato (g)
m_f	massa do fluido (CO ₂) supercrítico (g)
P	pressão (bar ou MPa)
P_c	pressão crítica (bar ou MPa)
$P_{c,mistura}$	pressão crítica da mistura (bar ou MPa)
Q	vazão de solvente (mL/min)
T	temperatura (°C)
T_{amb}	temperatura ambiente (°C)
T_c	temperatura crítica (°C)
$T_{c,mistura}$	temperatura crítica da mistura (°C)
$T_{ebulição}$	temperatura de ebulição (°C)
t	tempo de extração (min)
Y	rendimento mássico (g /100 g planta ou %)
ρ_a	densidade aparente do leito (g/cm ³)
ρ_r	densidade real do leito (g/cm ³)
ρ_f	densidade do fluido (CO ₂) supercrítico (kg/m ³)
ε	porosidade do leito (fração de vazios)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	37
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS	38
3.3	MATRIZ VEGETAL: CEREJEIRA-DO-MATO (Eugenia involucrata)	39
3.3.1	Características Gerais	39
3.3.2	Composição Química do Óleo Volátil	41
3.3.3	Extração com CO ₂ Supercrítico do Gênero Eugenia	44
3.4	MÉTODOS CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO DE MATRIZES VEGETAIS	45
3.5	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	47
3.5.1	Visão Geral	47
3.5.2	Tecnologia Supercrítica na Extração de Princípios Ativos	48
3.5.3	Parâmetros Operacionais e seus Efeitos	50
3.5.4	Curva de Extração	56
3.5.5	Planejamento Experimental na Extração Supercrítica	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	FLUXOGRAMA DO TRABALHO	61
4.2	MATERIAL VEGETAL	62
4.3	EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (SOXHLET)	62
4.4	EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	63
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	65
4.5.1	Granulometria	65
4.5.2	Densidade Real	65
4.5.3	Densidade Aparente	65
4.5.4	Porosidade do Leito	66
4.6	EXTRAÇÃO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	66

4.6.1	O Processo.....	66
4.6.2	Planejamento Experimental e Condições Operacionais ...	68
4.6.3	Obtenção das Curvas de Extração	69
4.6.4	Obtenção do Gráfico Rendimento vs. Densidade do CO ₂ -SC	70
4.7	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	71
4.7.1	Rendimento Global.....	71
4.7.2	Teor de Cera	72
4.7.3	Análises Cromatográficas.....	73
4.7.4	Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (SOXHLET)	75
5.1.1	Rendimento	75
5.1.2	Análises Cromatográficas.....	76
5.1.3	Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico	78
5.2	EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO	78
5.2.1	Rendimento	78
5.2.2	Análises Cromatográficas.....	79
5.2.3	Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico	80
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	81
5.3.1	Granulometria.....	81
5.3.2	Densidade Real (ρ_r)	82
5.3.3	Densidade Aparente (ρ_a).....	82
5.3.4	Porosidade do Leito (ϵ).....	83
5.4	EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO	83
5.4.1	Planejamento Experimental.....	83
5.4.2	Teor de Cera	85
5.4.3	Rendimento vs. Densidade do CO ₂ -SC	86
5.4.4	Curvas de Extração.....	88
5.4.5	Análises Cromatográficas.....	99

5.4.6	Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico	106
5.5	RESUMO DOS RESULTADOS: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS	107
6	CONCLUSÃO	109
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM), também conhecida como Floresta com Araucárias, é uma formação florestal pertencente ao Bioma Mata Atlântica (Lei Federal Brasileira nº 11.428/2006), cuja biodiversidade é de extrema importância ambiental, econômica e cultural. Essa formação se dá, principalmente, nos estados brasileiros de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul e é caracterizada pela presença dominante da espécie *Araucaria angustifolia* (araucária). A intensa e predatória exploração madeireira dessa espécie, principalmente na segunda metade do século XX, provocou uma drástica diminuição da área originalmente ocupada por ela, levando-a a ser considerada espécie ameaçada de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente (IN nº 06/2008) e criticamente em perigo, desde 2006, pela *Red List of Threatened Species* da IUCN (THOMAS, 2013).

Atualmente, dos aproximadamente 20 milhões de hectares originalmente ocupados pela Floresta com Araucárias, restam apenas de 1 a 3%. Essa exploração desenfreada é nociva não apenas pela perda de estoques madeireiros, mas também pela perda da biodiversidade; esse fato representa perda de fontes de renda, de oportunidades futuras de inovação e desenvolvimento sustentável (DA-RÉ et al., 2012).

Pensando na conservação da FOM, a Fundação Grupo Boticário e a Fundação CERTI (Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras) firmaram contrato em 2012 para dar início ao projeto Araucária +, cujo objetivo geral é, segundo eles:

Estruturar um ambiente de inovação para a conservação da Floresta Ombrófila Mista, com foco na valorização das cadeias produtivas do pinhão e da ervamate, através da incubação de uma equipe de profissionais (*broker*) que atuará como articulador/facilitador de um sistema inte-grado de produtores sustentáveis, mercado diferenciado, rede de Ciência & Tecnologia & Inovação, Políticas Públicas e investidores, resultando em geração de renda na base da pirâmide e externalidades positivas para o ecos-sistema natural.

No contexto do projeto Araucária + e no âmbito de um programa de mestrado, o presente trabalho propõe a utilização da tecnologia de extração com fluido supercrítico para realizar um estudo com uma espécie vegetal presente na FOM com potencial para aplicações comerciais. A pesquisa visa a identificação de novos produtos ou compostos bioativos

originados da Floresta com Araucárias, estimulando sua conservação por meio da valorização de cadeias produtivas de espécies nela presentes, combinando a isso o uso de uma tecnologia de extração sob intensa investigação no mundo científico. São utilizados também dois outros métodos convencionais de extração de compostos naturais – hidrodestilação e Soxhlet – para compará-los com a tecnologia supercrítica.

Para a escolha da espécie a ser estudada foram considerados, principalmente, conhecimentos populares sobre a planta, sua disponibilidade na FOM, estudos já publicados e a viabilidade de extraí-la com a tecnologia supercrítica. Feitas essas considerações, a espécie selecionada foi a *Eugenia involucrata*, popularmente conhecida como cerejeira-do-mato. Na literatura, há indicações de que o óleo volátil de suas folhas é rico em biciclogermacreno e isômeros do cariofileno e do elemeno, substâncias sesquiterpênicas com atividade biológica em potencial, sendo os elementos compostos sob intensa investigação devido a sua ação anticancerígena. Não há registros de trabalhos com a extração supercrítica dessa espécie.

A extração com fluido supercrítico utilizando CO₂ como solvente foi escolhida como rota tecnológica por ser um método promissor em termos de seletividade, eficiência, pureza do produto e compatibilidade ambiental. Nos últimos anos, observa-se um crescente interesse nessa técnica como alternativa de extração, sendo considerável o número de publicações sobre o assunto – mais de dois mil e setecentos artigos científicos publicados apenas entre os anos 2000 e 2017, de acordo com o portal *Science Direct* (sciencedirect.com). Devido ao caráter seletivo dessa técnica, acredita-se que sua aplicação na extração do óleo vegetal da cerejeira-do-mato possa resultar em um extrato com maior teor de seus compostos majoritários, quando comparado ao obtido com o emprego de técnicas convencionais como Soxhlet e hidrodestilação, além de uma maior qualidade do extrato em virtude da ausência de resquícios de solvente.

Ao mesmo tempo, a forte demanda por produtos de origem natural no mercado de cosméticos, medicamentos e alimentos impulsiona as pesquisas nesse sentido. O fácil acesso à informação na era das tecnologias traz consigo uma crescente conscientização e preocupação com a qualidade e composição dos produtos por parte dos consumidores, valorizando a busca por matérias-primas e/ou processos que trazem o apelo ambiental. As estatísticas recentes sobre o mercado de cosméticos que utilizam produtos naturais em sua composição traduzem essa demanda. Segundo dados da *Organic Monitor* (2015), o setor de cosméticos orgânicos movimentou cerca de US\$ 9 bilhões em todo o mundo, representan-

do 2% do mercado total. Por último, maiores restrições em termos da legislação são exigidas, em virtude do risco ao meio ambiente e à saúde humana no caso de acidentes com substâncias tóxicas (MAZZUTTI et al., 2012).

Ao se ponderar todos os aspectos aqui abordados, o presente trabalho pode contribuir significativamente para o avanço do conhecimento sobre os compostos bioativos de uma espécie vegetal nativa de uma importante formação florestal – a Floresta com Araucárias – com potencial para aplicações de alto valor no mercado, como nas áreas de cosméticos, farmácia, alimentos, entre outras, além de também expandir o conhecimento sobre uma metodologia de extração não convencional ambientalmente compatível, versátil e potencialmente seletiva.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é identificar compostos bioativos de potencial interesse comercial presentes nas folhas da espécie *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato), planta nativa da Floresta com Araucárias do estado de Santa Catarina, extraídos por meio da técnica com CO₂ no estado supercrítico, aplicando também técnicas tradicionais de extração a baixa pressão para efeito de comparação de suas seletividade e eficiência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O trabalho tem como objetivos específicos:

1. definir as condições operacionais mais adequadas para a extração supercrítica das folhas de *E. involucrata* em termos qualitativos e quantitativos;
2. avaliar a dinâmica do processo de extração supercrítica de *E. involucrata*, i.e. suas curvas de extração;
3. determinar a composição química dos extratos obtidos pelas três diferentes técnicas por meio de método cromatográfico;
4. comparar a extração supercrítica com as técnicas convencionais de extração Soxhlet com hexano e hidrodestilação, em termos de rendimento global, seletividade e atividade biológica;
5. avaliar a atividade antioxidante dos extratos e o interesse na extração ou isolamento de compostos dessa espécie para aplicações comerciais no mercado de produtos naturais, e.g. perfumaria, farmácia, cosméticos e alimentos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Por definição, uma planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (Organização Mundial da Saúde – OMS, 1998). O seu uso se dá em diversas culturas desde os primórdios da humanidade. Várias partes das plantas (folhas, frutos, casca, raiz, semente) vêm sendo exploradas como fonte de cura de doenças, sendo um conhecimento popular e ainda bastante praticado, por exemplo, em culturas indígenas, africanas e orientais. A OMS divulgou, no início da década de 1990, que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento recorriam a plantas medicinais como único meio de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA, PINTO e MACIEL, 2005).

Grande parte das drogas existentes hoje é derivada de princípios ativos encontrados em fontes naturais, ou de moléculas sintetizadas com base em compostos de origem vegetal (PHILLIPSON, 2001). Com os avanços das técnicas de separação e identificação de compostos, como cromatografia e espectroscopia de massa, as funcionalidades das plantas começaram a ser atribuídas a determinadas substâncias ou classes de substâncias. O interesse em isolá-las e concentrá-las surgiu como consequência, visando um uso mais direcionado e economicamente atrativo, principalmente pelo interesse da indústria farmacêutica.

Plantas medicinais tipicamente contêm misturas de diferentes compostos químicos que podem agir individualmente, conjuntamente ou sinergicamente para beneficiar a saúde. Uma única planta, por exemplo, pode conter substâncias que estimulam a digestão, anti-inflamatórios que reduzem inchaço e dor, compostos fenólicos que podem agir como antioxidantes e venotônicos, substâncias diuréticas que melhoram a eliminação de resíduos e toxinas, taninos que agem como antibióticos naturais e alcaloides que melhoram o humor e proporcionam sentimento de bem-estar (GURIB-FAKIM, 2006).

Graças a essas características e ao vasto número de espécies vegetais existentes no Brasil e no mundo, ainda há muito a ser explorado quando se trata de plantas para fins terapêuticos, cosméticos, nutricionais, entre outros (LI e VEDERAS, 2009). Como afirmado por Brusotti et al. (2014), a biodiversidade representa uma fonte ilimitada de novas entidades químicas (metabólitos secundários) com potencial para aplicações farmacêuticas.

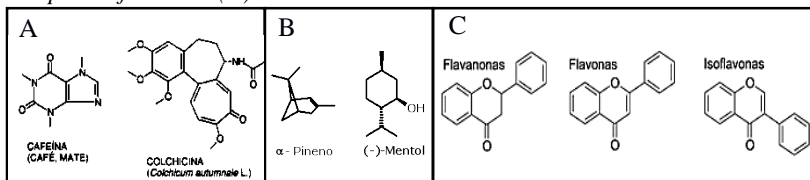
3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos orgânicos originados do metabolismo secundário de vegetais, responsáveis pelo aroma e envolvidos no mecanismo de defesa de diversas plantas, podendo ser produzidos por células, cavidades ou dutos secretores, a depender da família de cada espécie. Embora todas as partes das plantas possam conter OE, sua composição pode variar com a sua localização na estrutura vegetal; além disso, fatores como condições climáticas, práticas de cultivo, nutrientes do solo, tempo de colheita e genética afetam diretamente a qualidade do óleo (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

Geralmente, os OE consistem de uma mistura complexa de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, podendo conter diterpenos e outros compostos específicos, não classificados em nenhuma das famílias de compostos mencionadas. Outros compostos que podem estar presentes em extratos vegetais são ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, esteróis e flavonas (REVERCHON, 1997).

Brusotti et al. (2014) classificam os metabólitos secundários das plantas em três famílias químicas principais: alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (Figura 1). Estes compostos estão normalmente presentes em quantidades muito baixas no material vegetal, o que faz com que sua extração, purificação e caracterização sejam ainda um grande desafio no processo de descoberta de novas moléculas bioativas. Ainda de acordo com Brusotti et al. (2014), os monoterpênos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados são substâncias lipofílicas responsáveis pelo aroma característico dos OE e pela atividade biológica associada a eles.

Figura 1 – Exemplos de compostos bioativos: alcaloides (A), terpenoides (B) e compostos fenólicos (C).



Fonte: a autora (2017).

Diversas atividades biológicas já foram reportadas na literatura e associadas a compostos bioativos extraídos e isolados a partir de matrizes vegetais. Algumas das atividades mais comuns são: antioxidante, antiimi-

crobiana, anti-inflamatória, antifúngica, anticancerígena, antiproliferativa, antiplasmódica e gastroprotetora (BORGES, CONCEIÇÃO e SILVEIRA, 2014).

3.3 MATRIZ VEGETAL: CEREJEIRA-DO-MATO (*Eugenia involucrata*)

3.3.1 Características Gerais

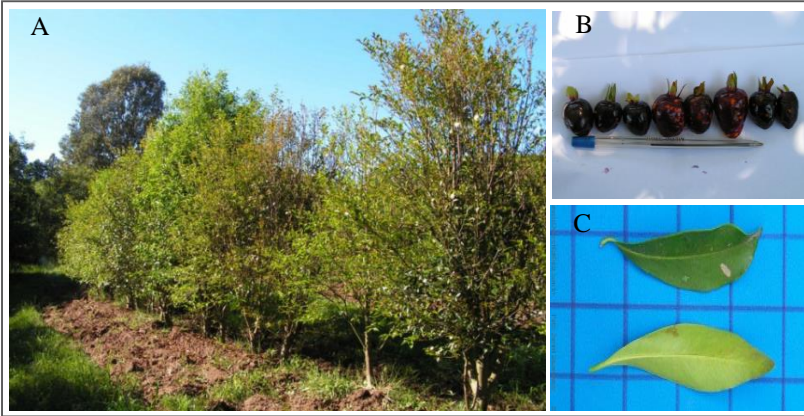
O gênero *Eugenia* é um dos mais importantes da família Myrtaceae, com cerca de 2000 espécies, distribuídas a partir do sul do México, Cuba, Antilhas, Brasil, Uruguai, Argentina e um pequeno número de espécies na África. Muitas dessas espécies possuem valor comercial e nutritivo, além de potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos. Usos medicinais são atribuídos a alguns representantes do gênero, como *E. uniflora* (pitanga), a qual reduz o colesterol, possui ácido úrico que controla a hipertensão e tem função adstringente e digestiva; *E. pyriformis* (uvaia), que possui flavonoides inibidores de xantino-oxidase utilizados no tratamento da gota humana; e as folhas de *E. moraviana* (cambuí), de grande interesse pelo potencial no tratamento do HIV, de alguns tipos de tumores, malária e processos inflamatórios (SILVEIRA e HARTHMAN, 2010).

E. involucrata, conhecida como cerejeira-do-mato ou cerejeira-do-rio-grande, de ampla ocorrência desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, possui potencial econômico, ornamental e paisagístico, sendo facilmente encontrada em pomares domésticos. Ela se encontra na Floresta com Araucárias com densidade absoluta de 0,33 indivíduos por hectare, de acordo com o Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (VIBRANS et al., 2013). Seus frutos (Figura 2B) são consumidos como doces, geleias ou *in natura* (LORENZI, 2002). Suas folhas são usadas na medicina popular em forma de chás por sua ação antidiarreica, digestiva, anti-hipertensiva e antirreumática (SANTOS, 2012).

A árvore da cerejeira-do-mato (Figura 2A) pode atingir de 5 a 15 metros de altura, com folhagem persistente, de folhas simples, glabras e opostas, de 5 a 9 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura, com face superior verde-escuro e brilhosa (Figura 2C). Seu tronco é escamante, de cor cinza amarronzado e verde, e os frutos nascem em ramos finos. O sombreamento não influencia os índices de sobrevivência nem o crescimento de mudas de cerejeira-do-mato (LORENZI, 2002). Apesar de seu potencial ornamental, como espécie componente na recuperação de áreas

degradadas e também com relação aos seus frutos, a *E. involucrata* não vem recebendo grande atenção de pesquisadores (EMBRAPA, 2007).

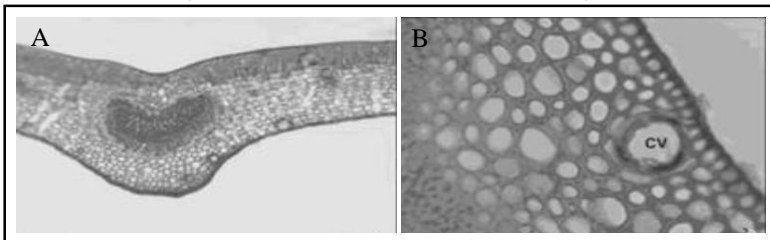
Figura 2 – Fotografias das árvores (A), frutos (B) e folhas (C) da cerejeira-do-mato.



Fonte: EMBRAPA (2007) (A e B) e SIDOL (C).

Silveira e Harthman (2010) estudaram a anatomia foliar da cerejeira-do-mato, caracterizando suas folhas como dorsiventrals, com estômatos projetados em relação às demais células epidérmicas e portadoras de bolsas oleíferas (cavidades secretoras) e feixos vasculares, os quais estão presentes na folha e no pecíolo (Figura 3).

Figura 3 – Microfotografias da estrutura foliar de *E. involucrata*, mostrando seus feixes vasculares (A) e suas bolsas oleíferas (B).



Fonte: Silveira e Harthman (2010).

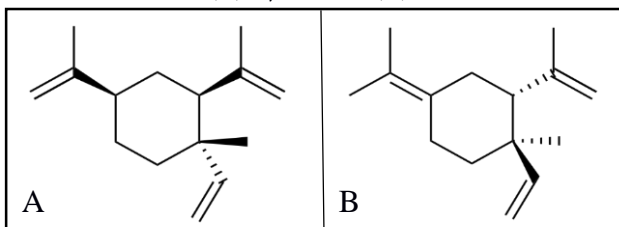
3.3.2 Composição Química do Óleo Volátil

No trabalho de Paroul et al. (2007), a avaliação da composição química do óleo essencial das folhas de cerejeira-do-mato, obtido em aparelho Clevenger, foi capaz de identificar 11 substâncias principais, todas sesquiterpenos cíclicos (fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, peso molecular 204,34), representando, aproximadamente, 92% do conteúdo total de óleos voláteis. As moléculas mais abundantes foram cariofileno, biciclogermacreno, germacreno B e um isômero de elemeno, a maioria delas derivadas das vias de ciclização do germacrano, cariofilano e cadinano. Há estudos que indicam quase 100% de sesquiterpenos em sua composição, sendo biciclogermacreno o composto majoritário (RAMOS et al., 2006). De maneira geral, as espécies desse gênero contêm em abundância os compostos α -pineno, β -cariofileno e biciclogermacreno (COLE, HABER e SETZER, 2007 apud SAUSEN et al., 2009).

O **elemeno**, um medicamento anticâncer derivado de plantas e com baixa toxicidade, pode ser extraído da erva medicinal da tradição chinesa *Curcuma wenyujin* e existe no seu óleo essencial como uma mistura de β -, γ - e δ -elemenos, todos agentes antitumorais efetivos (LU et al., 2013). Ele é usado na China como um agente antitumoral não-citotóxico de classe II, aprovado pelo *Chinese Food and Drug Administration* para o tratamento de câncer em humanos (LI et al., 2013). Existe uma patente americana de um método para preparação de β -elemeno usando uma torre de destilação, desde a obtenção da matriz vegetal até a coleta da fração de destilado com maior concentração dessa substância (CHEN e WU 2002).

Como componente ativo majoritário da mistura, o β -elemeno (1-metil-1-etenil-2,4-isopropenil-ciclohexano), cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 4A, tem fortes efeitos antiproliferativos e proapoptóticos em tumores (*in vitro* e *in vivo*). Devido à sua capacidade antitumoral, o β -elemeno tem sido usado no tratamento de diversos tipos de câncer, como glioblastoma, câncer de mama, fígado, laringe, ovários e leucemia (ZHU et al., 2011). Descobertas realizadas por Zhu et al. (2011) mostraram que o β -elemeno inibe a proliferação de diferentes linhas celulares de glioblastoma, induz apoptose *in vitro* e diminui o volume do tumor em ratos com glioblastoma. Efeitos terapêuticos significativos dessa molécula foram observados em tratamento clínico contra glioblastoma.

Figura 4 – Estrutura molecular dos isômeros do elemeno: β -elemeno (A) e γ -elemeno (B).



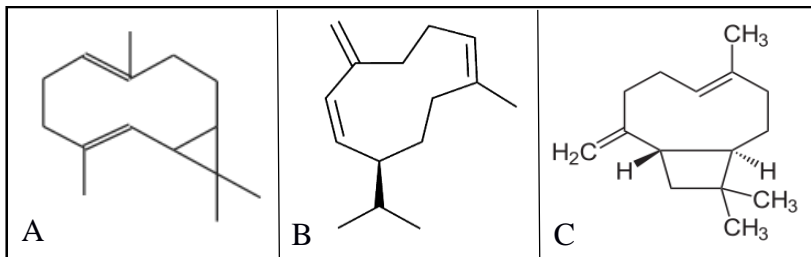
Fonte: a autora (2017).

Além de seu efeito pró-apoptótico, o β -elemeno foi investigado por Li et al. (2013) como modulador de resistência à cisplatina, uma droga citotóxica utilizada em quimioterapias. Segundo os autores, o β -elemeno foi capaz de aumentar a citotoxicidade da cisplatina e a sensibilidade de células humanas cancerígenas que apresentavam resistência ao medicamento, indicando que este composto pode ser eficaz no tratamento de tumores resistentes à cisplatina.

De acordo com a literatura, o β -elemeno é intensamente investigado atualmente como um agente antitumoral, existindo inúmeros trabalhos recentes que estudam a ação deste sesquiterpeno para o aumento de sensibilidade à quimio e à radioterapia, a reversão de resistência a drogas, a indução à apoptose e a inibição de crescimento e proliferação de células cancerígenas (BAO, QIU e ZHANG, 2012; EDRIS, 2009; GUO et al., 2014; LI et al., 2015, 2011, 2009; LIU et al., 2014, 2015; QIN, 2012; YANG, 2012; YAO et al., 2014; ZHANG et al., 2011, 2012; ZHAO et al., 2007; ZHU et al., 2011, 2014a, 2014b).

O composto **biciclogermacreno** muitas vezes está presente em óleos vegetais juntamente com algum composto da série dos germacrenos, como o **germacreno D** ou B, e do **cariofileno** (CZAIKOSKI et al., 2015; FALASCA et al., 2016; GARMUS et al., 2014; LAGO et al., 2008; MARIN et al., 2008), assim como foi detectado para a cerejeira-domato. Suas estruturas moleculares podem ser visualizadas na Figura 5. Em seu trabalho sobre o óleo essencial de espécies do gênero *Piper*, Perigo et al. (2016) associaram positivamente a inibição do crescimento *in vitro* da bactéria patógena *E. coli* aos conteúdos de biciclogermacreno e γ -muuroleno, enquanto germacreno D e *trans*-cariofileno foram associados à atividade inibitória contra todas as bactérias testadas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Figura 5 – Estruturas moleculares dos compostos biciclogermacreno (A), germacreno D (B) e cariofileno (C).



Fonte: a autora (2017).

Existem registros na literatura que apresentam óleos essenciais ricos em sesquiterpenos, frequentemente com (E)-cariofileno como principal componente, com atividade antimicrobiana e antifúngica; igualmente, óleos ricos na mistura (E)-cariofileno/biciclogermacreno ou (E)-cariofileno/germacreno D exibem elevada atividade antimicrobiana (MAIA et al., 2010). A presença frequente do germacreno D em diversas espécies vegetais pode ser explicada pelo fato de essa entidade química ser um intermediário comum na biossíntese de outros hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como o biciclogermacreno, que, por sua vez, originam derivados de estruturas mais complexas (ANGÉLICO et al., 2012; FRANCESCATO et al., 2007).

Em seu trabalho, Francescato et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius*, cujo extrato diclorometânico tem como componente majoritário o germacreno D. Embora o extrato tenha apresentado atividade inibitória de moderada a boa, o germacreno D isoladamente não foi associado a essa atividade. Todavia, segundo os autores, esse composto é um dos principais constituintes de diversos óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada, extraídos de diferentes espécies vegetais, e pode estar contribuindo para a atividade antimicrobiana do(s) constituinte(s) ativo(s) do extrato de *S. heterotrichius*. Segundo Cowan (1999), a natureza lipofílica dos sesquiterpenos permite a ruptura da membrana celular lipídica, melhorando sua permeabilidade, o que pode facilitar a penetração de agentes antimicrobianos no interior da célula e, assim, proporcionar aumento de atividade por ação sinérgica.

Capello et al. (2014) determinaram a composição química (GC/MS) e o potencial citotóxico do óleo volátil das folhas de *Piper cernuum*, sendo identificados os componentes β -elemeno (30%), biciclo-

germacreno (19,9%), germacreno D (12,7%) e (E)-cariofileno (16,3%) como constituintes majoritários, o que representa um perfil parecido com a espécie *E. involucrata* do presente estudo. O óleo bruto mostrou forte atividade contra todas as linhas celulares testadas, superior ao controle positivo (cisplatina). Para reconhecer as substâncias ativas do óleo, foi realizado seu fracionamento, isolando o biciclogermacreno, o (E)-cariofileno, o germacreno D e o β -elemeno, seguido do teste *in vitro* de cada componente contra as mesmas linhagens celulares. Foi observada uma atividade citotóxica ainda mais elevada para todos eles, com destaque para o germacreno D e o (E)-cariofileno. Os autores concluíram que a alta atividade citotóxica detectada em comparação à cisplatina pode ser atribuída a esses compostos.

Considerando o que já se sabe sobre a composição química do óleo essencial das folhas da cerejeira-do-mato, é possível que seu óleo apresente alta atividade biológica, com ação antitumoral, citotóxica, antimicrobiana e/ou antifúngica. Como os outros compostos bioativos que não são extraídos com o óleo essencial da *E. involucrata* ainda não foram identificados, existe também a possibilidade de seu extrato apresentar potencial antioxidante, o que será avaliado no presente trabalho.

3.3.3 Extração com CO₂ Supercrítico do Gênero *Eugenia*

Foram reportados alguns trabalhos com a extração supercrítica de espécies do gênero *Eugenia*, a exemplo da pitanga (GALHIANE et al., 2006; GARMUS et al., 2014; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; SANTOS, 2012). Em seu trabalho, Martinez-Correa et al. (2011) tinham como objetivo testar diferentes solventes na extração das folhas de *E. uniflora*, incluindo etapas com CO₂ no estado supercrítico (CO₂-SC), para obtenção de compostos polifenólicos. O tamanho de partícula utilizado foi de 0,817 mm, sua densidade real de 1,48 g/cm³ e a porosidade resultante no leito de extração foi de 0,789. Todas as extrações supercríticas foram realizadas a 400 bar, 60 °C e vazão de solvente de 4×10⁻⁵ kg/s. Ao observarem o resultado obtido para as curvas de extração da pitanga, os autores concluíram que os solutos apresentavam baixa resistência à transferência de massa e alta solubilidade devido à elevada taxa de extração observada. O rendimento global da etapa com CO₂-SC foi de cerca de 3,5 g/100 g de planta. Observou-se que cada tipo de extrato analisado, a depender do solvente, apresentava perfil químico diferente.

No trabalho de Galhiane et al. (2006), em que se compararam três diferentes técnicas de extração para a obtenção do extrato das folhas de pitanga, observou-se que a ESC resultava em maior rendimento, porém

menor seletividade, enquanto a extração em aparato Clevenger apresentava análise qualitativa mais interessante, a despeito de seu rendimento cerca de seis vezes menor que o da ESC. As pressões variaram de 275,8 a 620,5 bar, sendo a pressão de 551,6 bar a que rendeu mais extrato. A vazão de CO₂-SC utilizada foi de 10 mL/min com tempo de extração de 10 min. A temperatura de operação não foi fornecida.

Garmus et al. (2014) utilizaram 400 bar e 60 °C na extração supercrítica das folhas de pitanga, adotando um período estático de meia hora e período dinâmico de 6 h a uma vazão de CO₂-SC de 1,5 L/min. Em seguida, também se utilizou etanol e água para extrair os resíduos da extração com dióxido de carbono supercrítico. Para a etapa de extração com CO₂-SC puro, obteve-se um rendimento de 5 g/100 g de planta, sendo o extrato composto, principalmente, de flavonoides e, em menor proporção, polifenóis.

No trabalho de Santos (2012), sementes de pitanga foram extraídas com CO₂-SC nos níveis de pressão de 83, 110, 175, 240, 267 bar e de temperatura de 31, 35, 45, 55, 59 °C, sendo o melhor rendimento obtido no ensaio a 175 bar e 45 °C, seguido de 240 bar e 35 ou 45 °C.

3.4 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE EXTRAÇÃO DE MATRIZES VEGETAIS

Os compostos bioativos de materiais vegetais podem ser extraídos adotando-se diversas técnicas tradicionais, as quais são normalmente baseadas no poder de extração de diferentes solventes e na aplicação de calor ou agitação no sistema, sendo os métodos de hidrodestilação, Soxhlet e maceração os mais adotados para matrizes vegetais. Normalmente, o sucesso de novas tecnologias de extração é medido comparando-se seu rendimento e sua seletividade com os resultados obtidos pelos métodos tradicionais aqui mencionados (AZMIR et al., 2013).

A **hidrodestilação** (HD) é um dos métodos mais antigos para a obtenção de óleos essenciais de plantas, seja na escala laboratorial ou industrial (JELEŇ e GRACKA, 2015). Duas das grandes vantagens dessa técnica são a ausência de solventes orgânicos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana e a possibilidade de realizá-la antes mesmo da desidratação do material vegetal (AZMIR et al., 2013). Por outro lado, a temperatura utilizada na sua operação pode levar à degradação de compostos termossensíveis e o solvente pode levar à hidrólise parcial daqueles sensíveis à água (PEREIRA e MEIRELES, 2010; REVERCHON, SESTI OSSEO e GORGOGLIONE, 1994), o que altera seu aroma e suas propriedades, resultando até mesmo em odor desagradável. Essa técnica, por

obter apenas o óleo essencial da planta, normalmente não resulta em altos rendimentos de extrato.

O extrator **Soxhlet** foi proposto a primeira vez pelo químico alemão Franz Ritter von Soxhlet em 1879 e foi projetado, principalmente, para a extração de lipídeos. Hoje, o aparato não é destinado apenas para esse uso, sendo amplamente adotado para a extração de compostos bioativos de alto valor a partir de diversas fontes naturais (AZMIR et al., 2013).

De acordo com Luque de Castro e García-Ayuso (1998), as principais vantagens dessa técnica são: (1) a amostra é repetidamente colocada em contato com frações puras do solvente, auxiliando a transferência de massa; (2) não é necessária uma etapa de filtração; (3) maiores quantidades de amostra podem ser processadas em paralelo, devido ao baixo custo do equipamento; (4) é uma metodologia simples, que requer pouco treinamento especializado; (5) obtém maiores rendimentos que a maioria dos métodos mais recentes; e (6) não depende da estrutura da matriz vegetal.

No entanto, suas desvantagens são significativas, como: (1) longo tempo de operação; (2) elevado desperdício de solvente, o que não só representa altos custos para o seu descarte apropriado como também ameaças ambientais; (3) as amostras são normalmente extraídas sob a temperatura de ebulição do solvente por um longo período, não sendo possível negligenciar a decomposição térmica de alguns componentes; (4) o aparato Soxhlet convencional não permite agitação da mistura, o que aceleraria o processo; (5) uma etapa de evaporação/concentração do produto é obrigatória para se obter o extrato puro; (6) a técnica é restrita à seletividade do solvente; e (7) não é facilmente automatizada.

Atualmente, restrições legais com respeito a resíduos de solventes orgânicos, tanto por questões ambientais como de saúde humana, limitam a aplicação comercial dessa técnica convencional, cujo uso vem se restringindo apenas à caracterização de matérias-primas e parâmetro de comparação com novas tecnologias de extração em escala laboratorial (KNEZ et al., 2013).

3.5 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

3.5.1 Visão Geral

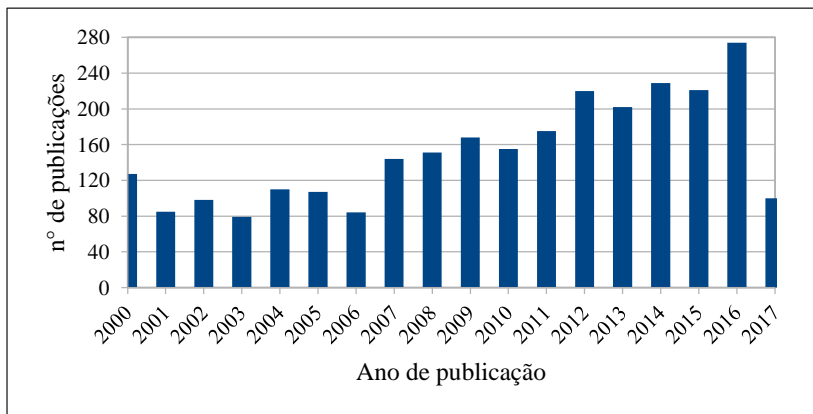
A extração com fluido supercrítico (ESC) é uma tecnologia que utiliza como solvente uma substância em seu estado supercrítico, ou seja, sob condições de temperatura e pressão acima ou próximas do seu ponto crítico (T_c e P_c). Essa técnica vem sendo desenvolvida nos últimos anos em diversos países, motivada pela possibilidade de aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, além de outras aplicações minoritárias (DA SILVA, ROCHA-SANTOS e DUARTE, 2016).

O fluido mais adotado como solvente nessa tecnologia é o dióxido de carbono (CO_2) devido às suas inúmeras vantagens: é relativamente não tóxico e não inflamável, possui parâmetros supercríticos acessíveis (73,8 bar e 31,06 °C), encontra-se comercialmente disponível em alta pureza e é ambientalmente amigável (TAYLOR, 1996). Além disso, ao retornar às condições ambientes, o CO_2 deixa o extrato praticamente livre de resíduos de solvente, eliminando o problema de impurezas ou toxicidade no produto desejado (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

A tecnologia com fluido supercrítico, seja extração ou outros processos de transferência de massa, ganhou grande atenção nas últimas décadas, estimulando o surgimento de companhias especializadas na utilização de fluido supercrítico, por exemplo, na indústria farmacêutica, como Phasex (Estados Unidos, desde 1981), SEPAREX (França, desde 1986), Natex (Áustria, desde 1993) e XSpray (Suécia, desde 2003), que trabalham tanto em escalas laboratorial e piloto (pesquisa e desenvolvimento) quanto em escala industrial, oferecendo soluções para os entraves encontrados em outras técnicas tradicionais e para as novas restrições ambientais, de segurança e de qualidade.

Em termos de produção científica, é notável a tendência crescente de publicações na área de extração com fluido supercrítico. Na Figura 6, pode-se visualizar o número de artigos científicos publicados por ano, apenas para o período entre 2000 e fevereiro de 2017, totalizando 2729 publicações, de acordo com o portal *Science Direct*. *The Journal of Supercritical Fluids* foi o periódico com o maior número de publicações nessa área – quase 32% dos artigos contabilizados nessa consulta –, seguido pelo *Journal of Chromatography A*, com 5,5% das publicações, e pelo *Food Chemistry*, com 4%. As pesquisas desenvolvidas utilizam diversas estratégias e trazem diferentes focos na utilização da tecnologia supercrítica.

Figura 6 – Tendência crescente de publicações na área de extração com fluido supercrítico. Consulta realizada no portal Science Direct (*sciencedirect.com*) em 06 de fevereiro de 2017 com 'supercritical extraction' presente no título, resumo ou palavras-chave.



Fonte: a autora (2017).

As diversas aplicações da ESC são possíveis graças à versatilidade e relativa simplicidade dos processos com fluido supercrítico. Com essas tecnologias, torna-se possível trabalhar com moléculas termossensíveis sem degradá-las, criar processos com menos etapas a fim de economizar tempo, energia e espaço, obter produtos de alta qualidade e de uso seguro devido a sua pureza e sua reprodutibilidade, gerar menos impactos ao meio ambiente e valorizar comercialmente os produtos devido a sua origem predominantemente natural.

3.5.2 Tecnologia Supercrítica na Extração de Princípios Ativos

A extração com fluido supercrítico encontra uma das suas principais aplicabilidades na descoberta e/ou obtenção de princípios ativos a partir de fontes naturais (plantas, algas e microalgas, tecidos animais, fungos, entre outros), sendo possível acessar inúmeras referências nessa área. Diversas pesquisas trazem comparações entre diferentes técnicas de extração de uma mesma matriz (BOGDANOVIC et al., 2016; DOMINGUES et al., 2012; FORNARI et al., 2012; MARTINS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013; SOVOVA, SAJFRTOVA e TOPIAR, 2015; ZHAO e ZHANG, 2014), provando que a ESC normalmente resulta em extratos de qualidade superior, devido ao produto praticamente livre

de resíduos de solvente, à capacidade de conservar as propriedades do composto desejado e à seletividade.

Em um estudo realizado com folhas de *Eucalyptus* (ZHAO e ZHANG, 2014), as técnicas de hidrodestilação e Soxhlet utilizando dois solventes diferentes foram comparadas com a ESC com e sem modificador (etanol) na obtenção do seu óleo. Os autores observaram que a HD resultou no menor rendimento e que o óleo obtido por essa técnica era rico em compostos voláteis. Já a extração por Soxhlet resultou no maior rendimento, porém foi menos seletiva, gerando um óleo composto de todos os tipos de substâncias presentes nas folhas. A ESC resultou em um rendimento intermediário, mas com uma concentração do composto dominante (1,8-cineol ou eucaliptol, um monoterpene) mais elevada que no óleo extraído por Soxhlet, dando um caráter mais seletivo a essa técnica.

Além dos estudos comparativos entre as técnicas tradicionais e a ESC, muitos trabalhos visam modelar e otimizar a extração supercrítica de uma determinada matriz natural, investigando a influência dos parâmetros operacionais no extrato obtido, quali- e quantitativamente (BOGDANOVIC et al., 2016; DEL VALLE, 2015; DENIZ, OZEN e YESIL-CELIK TAS, 2016; HUANG, SHI e JIANG, 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Nesse sentido, há um outro trabalho com o gênero *Eucalyptus*, no qual se extrai sua casca em busca de substâncias de alto valor, como ácidos triterpênicos e compostos fenólicos (DOMINGUES et al., 2012).

Recentemente, foram realizadas também extrações supercríticas de compostos fenólicos e de pigmentos com atividade anticancerígena a partir de algas e microalgas (DENIZ, OZEN e YESIL-CELIK TAS, 2016; HERRERO et al., 2015; PILAVTEPE e YESIL-CELIK TAS, 2013), de polifenóis a partir do própolis (DE ZORDI et al., 2014), de esqualeno a partir de resíduos da produção de vinho (NAZIRI et al., 2016) e mesmo de metabólitos a partir de amostras de sangue seco visando sua análise (MATSUBARA et al., 2014).

O uso de enzimas para o tratamento das amostras antes de serem submetidas a ESC também é uma abordagem que tem gerado bons resultados na obtenção de moléculas bioativas como, por exemplo, na extração da casca de romã (MUSHTAQ et al., 2015). A extração de princípios ativos de matrizes naturais ainda se apresenta como um campo promissor, visto que novas fontes de compostos de alto valor podem ser encontradas e uma infinidade de estratégias de ESC é possível.

3.5.3 Parâmetros Operacionais e seus Efeitos

Sabe-se que os fluidos no estado supercrítico possuem propriedades de transporte melhoradas em relação a líquidos e gases, combinando características relacionadas ao transporte de matéria (e.g. difusividade e viscosidade) próximas a do estado gasoso e propriedades relacionadas à capacidade de solubilização (e.g. densidade) próximas a de líquidos, como pode ser visto na Tabela 1. Além disso, a tensão superficial de fluidos no seu estado supercrítico é praticamente nula, permitindo uma melhor penetração na matriz da amostra quando comparado a líquidos (TAYLOR, 1996).

Tabela 1 – Comparação das propriedades termofísicas de fluidos nos estados gasoso, supercrítico e líquido.

Propriedade	Gás (T_{amb})	FSC (T_c, P_c)	Líquido (T_{amb})
Densidade (kg/m ³)	0,6-2	200-500	600-1600
Viscosidade dinâmica (mPa·s)	0,01-0,3	0,01-0,03	0,2-3
Viscosidade cinemática (10 ⁶ m ² /s)	5-500	0,2-0,1	0,1-5
Condutividade térmica (W/mK)	0,01-0,025	máximo	0,1-0,2
Coefficiente de difusão (10 ⁶ m ² /s)	10-40	0,07	0,0002-0,002

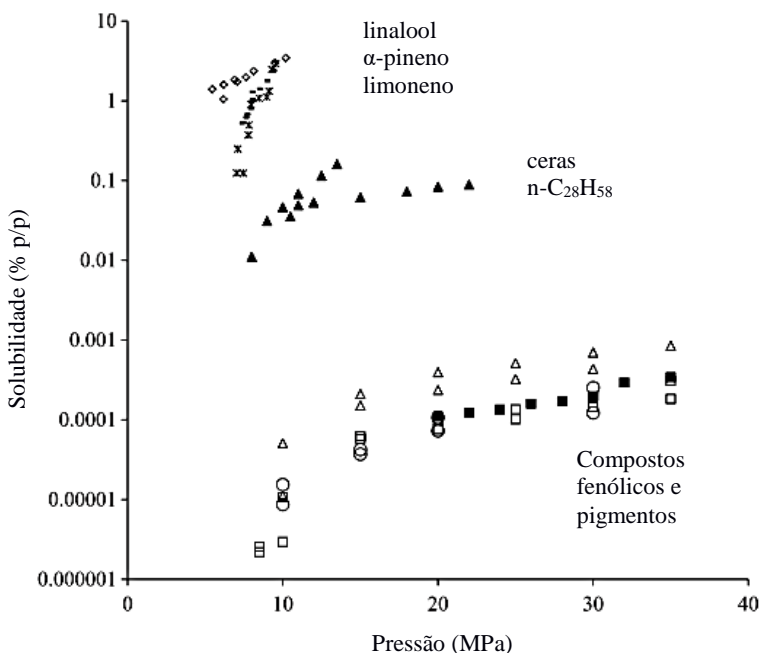
Fonte: adaptado de Martinez (2008) apud Zibetti (2012).

Essas propriedades termofísicas podem ser ajustadas por meio de mudanças na temperatura e pressão do fluido, diferentemente do estado líquido, por exemplo (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013). Ao se elevar a pressão a uma temperatura fixa, os valores de difusividade, viscosidade e densidade se aproximam àqueles do estado líquido. O contrário acontece ao se elevar a temperatura a uma pressão fixa, aproximando essas propriedades àquelas do estado gasoso.

A correta seleção dos parâmetros operacionais da ESC é uma etapa que exige conhecimento sobre as famílias de compostos presentes na matéria-prima, visto que cada uma delas apresenta um comportamento particular de solubilidade de acordo com variações nos parâmetros do processo, e.g. pressão (Figura 7). O **peso molecular** e a **polaridade** dos componentes do extrato devem ser levados em consideração para cada caso específico devido à natureza apolar do CO₂. Porém, apesar de ser

apolar, o CO_2 também apresenta certa afinidade com solutos polares, provavelmente devido ao seu momento quadrupolar. A presença de hidroxilas e grupos amino e nitro, principalmente se houver mais de um grupo na molécula, diminui a solubilidade no CO_2 -SC (TAYLOR, 1996). Embora seja necessário analisar cada caso em particular, algumas regras gerais podem ser aplicadas para servir de orientação inicial na escolha das condições a serem empregadas (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Figura 7 – Solubilidade em CO_2 -SC de diversos componentes de material vegetal. Compostos de OE: limoneno, α -pineno e linalool; compostos fenólicos: ácido protocatecuico, galato de metila e ácido *p*-cumárico; pigmentos: β -caroteno; ceras: $n\text{-C}_{28}\text{H}_{58}$. Faixa de temperatura de 35 a 50 °C.



Fonte: adaptado de Fornari et al. (2012).

A **densidade** do FSC está diretamente ligada ao seu poder de solvente. A explicação é relativamente simples e instintiva: quanto maior a densidade, maior a massa de fluido por unidade de volume, ocasionando uma maior interação soluto-fluido. Seu valor pode variar de cerca de 0,15

a 1,00 g/cm³ de acordo com a pressão e a temperatura; essa variação é fortemente não linear, exigindo o uso de tabelas precisas sobre as propriedades do fluido para uma seleção apropriada das condições operacionais (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Para fluidos ligeiramente acima de sua temperatura crítica, densidades próximas a de líquido são rapidamente alcançadas com pequenas elevações da pressão; já para temperaturas muito superiores à T_c, grandes aumentos na pressão são necessários para se chegar a essas mesmas densidades (TAYLOR, 1996).

A **pressão** é considerada o parâmetro mais relevante do processo de ESC, visto que ela pode ser usada para modular a seletividade do FSC. Como regra geral, quanto maior a pressão, maior o poder de solvente e menor a seletividade de extração (REVERCHON e DE MARCO, 2006). Pressões mais amenas (9-12MPa) são necessárias para a extração dos componentes do OE da matriz vegetal, enquanto pressões mais elevadas (>12MPa) são empregadas para se obter, além do OE, outros compostos bioativos presentes na planta. Além do interesse nos outros constituintes da espécie, altas pressões também oferecem a vantagem do efeito de compressão da célula vegetal, melhorando a transferência de massa e a liberação do seu óleo (FORNARI et al., 2012).

Em seu *review*, Reverchon e de Marco (2006) sugerem que a **temperatura** de extração supercrítica deve permanecer entre 35 e 60 °C, enquanto Fornari et al. (2012) sugerem um intervalo ainda menor, entre 35 e 50 °C; isto é, nas vizinhanças do ponto crítico e o mais baixa possível a fim de preservar os compostos termossensíveis normalmente presentes nos óleos essenciais. Segundo Mazzutti et al. (2012), o efeito da temperatura no rendimento de extração, à pressão constante, pode ocorrer de duas maneiras:

- a) o aumento da temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao aumento na pressão de vapor do soluto, causando menor interação soluto-soluto;
- b) o aumento da temperatura resulta em menor solubilidade devido à redução da densidade do solvente.

Esses dois efeitos, que competem entre si, podem resultar no cruzamento das isotermas de extração supercrítica para um determinado intervalo de pressão, em um fenômeno conhecido como retrogradação. Considerando que, sob pressões mais elevadas, um fluido supercrítico é menos compressível do que perto do seu ponto crítico, observa-se uma redução do efeito da temperatura sobre a densidade do solvente, normalmente acima de 300 bar.

A **vazão de solvente** afeta a força motriz local e, particularmente, a taxa de extração do soluto de fácil acesso. Em um extrator real, ocorre

dispersão axial, a qual é mais pronunciada quanto menor for a razão comprimento/diâmetro do leito de extração. Além disso, para baixas velocidades médias intersticiais no leito, solventes supercríticos tendem a convecção natural devido a sua baixa viscosidade cinemática (SOVOVÁ, 2005). Geralmente, uma alta vazão aumenta a capacidade de extração; entretanto, valores muito altos podem diminuir o rendimento devido ao tempo de contato insuficiente entre soluto e solvente, além de tornarem os custos de operação mais elevados, o que deve ser ponderado em termos de aplicações industriais (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

De acordo com Reverchon e de Marco (2006), a vazão de CO₂-SC é um parâmetro relevante se o processo for limitado por uma resistência à transferência de massa externa ou pelo equilíbrio; a quantidade de FSC alimentado ao extrator, neste caso, determina a taxa de extração. Para os autores, existe um compromisso entre a termodinâmica (solubilidade) e a cinética (transferência de massa) do processo de extração: o mecanismo que o controla será aquele que for mais lento, determinando a sua velocidade global. Normalmente, a composição dos extratos não será alterada em virtude de diferenças de vazão.

A formação de canais ou caminhos preferenciais pode ocorrer em leitos muito compactados, especialmente quando o **tamanho de partícula** é menor do que 0,4 mm e/ou quando o diâmetro do extrator é grande; esse fato leva a uma redução drástica no desempenho do processo (SOVOVÁ, 2005). Para produtos naturais, o tamanho de partícula utilizado nos leitos de extração supercrítica varia de 0,25 a 1,80 mm (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

A **umidade** da biomassa a ser extraída pode interferir na interação soluto-fluido e provocar reduções de rendimento, além de outros efeitos indesejáveis, como formação de gelo nas tubulações do equipamento devido à rápida depressurização provocada para precipitar os solutos e a hidrólise de alguns compostos (FORNARI et al., 2012). Matérias-primas contendo mais de 10-18% de umidade requerem uma etapa de secagem anterior à extração supercrítica, para que o rendimento do processo não seja drasticamente reduzido. Segundo Meireles (2003), a secagem deve ser feita sob condições moderadas (30 a 40 °C) no caso de plantas aromáticas, a fim de evitar perdas ou degradação de compostos voláteis ou termossensíveis.

Para contornar os problemas de baixa polaridade do FSC quando se deseja extrair compostos mais pesados e de alta polaridade, frequentemente se adota o uso de modificadores ou **cosolventes** de natureza polar, mas que sejam miscíveis com o fluido principal, como acetonitrila, acetona, metanol e, principalmente, etanol (SANTOS et al., 2017). Entre-

tanto, segundo Taylor (1996), sistemas de solvente com mistura de fluidos são complicados por causa de seu comportamento de fases: T_c e P_c são alterados, sendo $T_{c,mistura}$ um valor intermediário entre as T_c dos componentes puros, enquanto $P_{c,mistura}$ geralmente mostra um máximo a uma composição intermediária entre os dois solventes, existindo métodos termodinâmicos mais elaborados para o cálculo dessas propriedades.

Ao passo que a incorporação de cossolvente melhora o poder de solvente (termodinâmica), os efeitos na transferência de massa (cinética) também são alterados, especialmente se o cossolvente interage com o soluto. Devido à interação, o coeficiente de difusão pode diminuir, piorando o transporte de matéria. O efeito positivo de FSC modificado que é bem aceito na literatura de engenharia química é o agrupamento de moléculas de cossolvente polar em torno de moléculas de soluto polar em um grande excesso de FSC; os solutos podem ser “englobados” por uma esfera de solubilização contendo uma alta concentração local de cossolvente. Tal agrupamento se torna mais pronunciado à medida que a diferença de polaridade entre FSC e cossolvente aumenta (TAYLOR, 1996). Essa estratégia tem a desvantagem de diminuir a seletividade do processo devido ao alto poder de solvente, extraíndo moléculas polares e apolares, grande e pequenas, e também de perder o grande trunfo da ESC, que é a obtenção de um produto totalmente livre de solventes orgânicos líquidos, exigindo mais etapas de separação *downstream* (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Considerando todos esses pontos negativos da modificação do FSC, e sabendo que o foco do trabalho é na fração mais leve e apolar da cerejeira-do-mato (componentes do seu OE), optou-se por não adotar cossolvente no presente estudo.

Por último, um resumo prático dos efeitos de todos os parâmetros de entrada aqui abordados é apresentado na Tabela 2, a qual pode ser consultada para entender a futura discussão dos resultados. Nessa tabela, ao se analisar uma variável de entrada, consideram-se fixas todas as outras. Com relação ao impacto no processo, foi elaborada uma escala de classificação que o caracteriza como positivo (+) ou negativo (-), sendo ele forte (3 sinais), médio (2 sinais) ou fraco (1 sinal), tendo como critério a capacidade global de extração de acordo com observações feitas pela própria autora.

Tabela 2 – Resumo dos principais efeitos das variáveis de entrada mais estudadas da ESC de matrizes vegetais e suas consequências nos fenômenos envolvidos no processo.

Aumento de...	Provoca...	Consequência	Impacto no processo
P	$\uparrow\rho$	Maior interação soluto-fluido	+++
	$\downarrow D$	Piora o transporte de matéria	-
	$\uparrow\mu$	Piora o transporte de matéria	-
T	$\downarrow\rho$	Menor interação soluto-fluido	---
	$\uparrow D$	Melhora o transporte de matéria	+
	$\downarrow\mu$	Melhora o transporte de matéria	+
	$\uparrow P^{\text{vap}} _{\text{soluto}}$	Maior volatilidade dos componentes da mistura	++
$\vec{\mu}_r _{\text{soluto}}$	$\downarrow C_s$	Menor massa de soluto por unidade de massa de CO ₂ -SC na saturação	--
Q	$\downarrow\tau$	Menor tempo de contato entre CO ₂ -SC e matriz vegetal	--
	$\uparrow u$	Maior força de arraste e taxa de extração	+++
d_p	$\downarrow a_s$	Piora o acesso do CO ₂ aos compartimentos oleíferos	---
	\downarrow Solute livre	Menor taxa de extração inicial (convecção)	--
% CS	$\uparrow \vec{\mu}_r _{\text{solvente}}$	Aumenta a solubilidade de compostos polares no FSC, porém diminui a seletividade	++
	mudança no equilíbrio de fases	Pode piorar as propriedades de transporte ou formar mais de uma fase no leite	-
Umidade	mudança no equilíbrio de fases	Formação de duas fases no leite, dificultando o transporte de matéria e diminuindo a vida útil do equipamento devido a possíveis danos	---

P: pressão; *T*: temperatura; $\vec{\mu}_r|_{\text{soluto}}$: polaridade do soluto; *Q*: vazão de solvente; *d_p*: tamanho de partícula da matriz vegetal; %CS: porcentagem de cossolvente; $\vec{\mu}_r|_{\text{solvente}}$: polaridade do solvente; ρ : densidade do solvente; *D*: difusividade; μ : viscosidade dinâmica; $P^{\text{vap}}|_{\text{soluto}}$: pressão de vapor do soluto; *C_s*: solubilidade; τ : tempo de residência; *u*: velocidade média intersticial no leite; *a_s*: área superficial específica do leite.

Fonte: a autora (2017).

3.5.4 Curva de Extração

Na tecnologia de ESC, o gráfico cujo eixo das ordenadas é o rendimento de extração e o eixo das abscissas é o tempo, a massa de solvente ou a razão mássica de solvente/matéria-prima é chamado de curva de extração, constituindo os dados experimentais mais facilmente obtidos sobre a dinâmica dos processos de ESC (SOVOVÁ, 2012). Essas curvas são necessárias, por exemplo, nos casos de ampliação de escala e de estimativa de custo de manufatura. Del Valle (2015) explica que a relação entre rendimento e o tempo de extração depende de variáveis específicas de cada escala, como a altura do leito empacotado e, em plantas de ESC industriais com três ou mais extratores, o número de vasos extratores. Em seu *review*, o autor destaca que nem sempre as curvas coincidem para as escalas laboratorial, piloto e industrial.

A forma da curva de extração diz muito sobre os mecanismos que controlam a transferência de massa (TM) em diferentes estágios da extração. Aceita-se que, de modo geral, no início da extração, a convecção é o mecanismo dominante, pois há soluto prontamente disponível sobre a superfície das partículas. Quando este soluto se esgota, compostos do interior das partículas começam a ser extraídos e, então, a difusão se torna o mecanismo que controla o processo (MAZZUTTI et al., 2012).

De um ponto de vista prático, a ESC ocorre basicamente em duas etapas: a solubilização das entidades químicas presentes na matriz sólida e sua separação para o solvente supercrítico; depois, na saída do extrator, esses compostos se tornam livres do solvente pela redução de pressão. Porém, para entender e poder melhorar os processos ESC, deve-se elucidar mais detalhadamente o que acontece em cada estágio. Primeiramente, a matriz vegetal absorve o FSC, inchando sua estrutura celular, membranas e dilatando os canais intercelulares, conduzindo a uma redução na resistência à TM; ao mesmo tempo, a dissolução do extrato ocorre e a TM acontece, devido ao gradiente de concentração, do interior da matriz vegetal para sua superfície, e daí, finalmente, para o FSC (BRUNNER, 1994 apud DA SILVA, ROCHA-SANTOS e DUARTE, 2016).

A tendência da curva de extração pode ser facilmente afetada pela vazão de solvente e tamanho de partícula, não sendo possível comparar curvas obtidas de diferentes matérias-primas e diferentes aparatos instrumentais. No entanto, diversas informações fornecidas por curvas de extração, como a duração da taxa constante de extração, permite a comparação entre diferentes experimentos com a mesma matriz vegetal e equipamento. Da Silva, Rocha-Santos e Duarte (2016) afirmam também

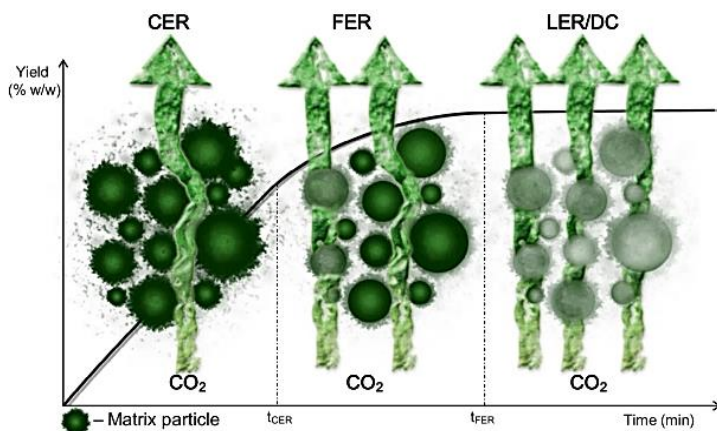
que o estudo dessas curvas e o conhecimento dos efeitos das variáveis operacionais permitem a determinação do volume do extrator e da vazão de solvente.

Segundo diversos pesquisadores da área, as curvas de extração globais são claramente divididas em três períodos (DA SILVA, ROCHA-SANTOS e DUARTE, 2016):

- a) **Período de Taxa Constante de Extração** ou *Constant Extraction Rate* (CER): a superfície externa das partículas encontra-se coberta com soluto de fácil acesso e a convecção é o mecanismo dominante de TM;
- b) **Período de Taxa Decrescente de Extração** ou *Falling Extraction Rate* (FER): a camada de óleo externa começa a se esgotar e o mecanismo de difusão se inicia, operando juntamente com a convecção;
- c) **Período de Baixa Taxa de Extração** ou *Low Extraction Rate/Diffusion-Controlled* (LER/DC): a camada de óleo externa já não existe mais e a TM ocorre principalmente por difusão dentro das partículas sólidas.

Esses períodos podem ser visualizados na Figura 8, onde são apresentados esquemas dos fenômenos descritos e uma curva genérica de ESC (rendimento *versus* tempo).

Figura 8 – Os três diferentes períodos de extração normalmente reportados para o processo de ESC de matrizes vegetais e sua curva de extração.



Fonte: da Silva, Rocha-Santos e Duarte (2016).

Normalmente, durante o período CER, de 50 a 90% da quantidade total de extrato é obtida. Portanto, para muitas aplicações, o tempo de extração é definido como o fim do período CER, exceto em casos onde um composto específico não é muito solúvel no FSC ou está localizado em estruturas celulares de difícil acesso. As condições operacionais consideradas melhores serão aquelas em que altos rendimentos de óleo são alcançados em um tempo relativamente curto, isto é, no período CER. Os parâmetros de processo do período CER que podem ser estimados são: (1) a taxa de extração (M_{CER}); (2) o tempo de duração (t_{CER}); (3) o rendimento do período CER (Y_{CER}); (4) a razão mássica de soluto na fase supercrítica na saída do extrator (S/F_{CER}) (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

Muitos autores assumem que a concentração na primeira parte da curva (CER) corresponde à solubilidade do extrato no FSC para aquela condição operacional; entretanto, Brunner (2005) explica que, embora a inclinação da reta da primeira parte da curva de extração possa corresponder à saturação, uma linha reta pode ser também causada por uma resistência constante à TM, e **não** representa uma prova de que as condições de equilíbrio foram alcançadas durante a extração. O autor considera também que os fenômenos que ocorrem durante a ESC podem incluir uma distribuição radial do solvente na entrada do extrator e a retromistura do FSC à medida que ele flui através do leito fixo, em virtude de irregularidades de tamanhos, superfícies e distribuição de sólidos. Devido à dinâmica da TM, a concentração das substâncias extraídas no FSC apresenta perfil axial correspondente ao perfil axial no sólido. Além disso, um perfil de concentração radial nas fases fluida e sólida sobrepõe o axial.

Quando a resistência à TM é completamente localizada na fase fluida, apenas uma linha reta aparece, cuja inclinação representa a taxa de extração. Porém, quando existem resistências nas fases fluida e sólida, a extração segue o curso de uma função exponencial de crescimento restrito. Caso não haja o esgotamento total dos componentes extraíveis, o que é possível, a curva de extração se aproxima de uma assíntota (BRUNNER, 2005).

Sovová (2005), referência clássica na área de modelagem de ESC, afirma que, no primeiro período da extração, a fase fluida deixando o extrator está em equilíbrio ou próxima ao equilíbrio. Portanto, essa etapa contém informações sobre o tipo de equilíbrio entre as fases sólida e fluida. Quando a concentração inicial do soluto na fase sólida é alta, como em sementes, a concentração de equilíbrio na fase fluida é independente da matriz vegetal e igual à solubilidade. Quando a concentração inicial de soluto na planta é muito baixa, o que é típico para óleos essenciais e é o

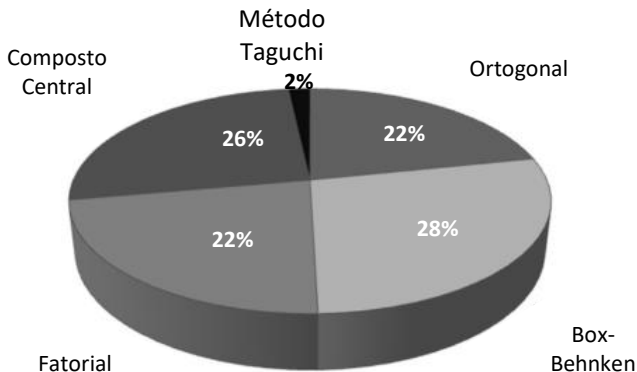
caso do presente trabalho, o equilíbrio é normalmente limitado pela interação soluto-matriz e a concentração na fase fluida é muito menor que a solubilidade. O equilíbrio é então simulado como uma relação linear entre as concentrações nas fases sólida e fluida, sendo a constante de proporcionalidade chamada de coeficiente de partição. Essa autora adota o conceito de células rompidas e intactas resultantes do pré-tratamento da planta para explicar a fenomenologia da ESC e modelar as curvas de extração, explicando que as partículas do leito possuem uma camada externa de células rompidas, com óleo mais acessível, e um núcleo com células intactas, com soluto de difícil acesso.

3.5.5 Planejamento Experimental na Extração Supercrítica

Os recursos para a realização de experimentos em laboratório com a tecnologia supercrítica nem sempre são abundantes, em função do custo das peças do equipamento, do solvente, da pouca disponibilidade de matéria-prima, elevado gasto energético, entre outros motivos. O planejamento experimental é uma estratégia estatística que permite a obtenção de informações completas e dados precisos de um fenômeno estudado experimentalmente, recorrendo a um número mínimo de ensaios e de recursos (DE MELO, SILVESTRE e SILVA, 2014). Por isso, é uma abordagem de grande interesse para os trabalhos que utilizam essa técnica de extração.

Em seu *review*, de Melo, Silvestre e Silva (2014) identificaram uma tendência, desde o ano 2000, de uma maior utilização de modelagem estatística nos artigos publicados na área de extração com fluido supercrítico, como o planejamento experimental. Os autores notaram grande utilização de planejamentos experimentais do tipo Box-Behnken, delineamento composto central (DCC), fatorial completo e fatorial fracionado, sendo os dois primeiros os que dominaram dentre os artigos revisados, como pode ser visto na Figura 9. Também observaram que, em muitos casos, se recorre à metodologia de superfície de resposta na análise dos dados do planejamento.

Figura 9 – Tendências do uso de planejamento experimental em artigos sobre ESC entre 2000 e 2013, dentre 547 publicações consideradas.



Fonte: adaptado de Melo, Silvestre e Silva (2014)

Quanto às variáveis selecionadas como fatores dos planejamentos, os autores constataram que a pressão e a temperatura foram escolhidas em mais de 90% dos casos. O terceiro fator mais adotado dentre os artigos avaliados foi o tempo de extração (42%), seguido da concentração de cosolvente (20%), tamanho de partícula (15%) e vazão de solvente (16%).

O planejamento composto central requer pelo menos cinco níveis para cada fator, o que pode ser útil para confirmar influências quadráticas na resposta, embora isso implique em maior número de ensaios a serem realizados do que, por exemplo, no Box-Behnken. Uma grande vantagem do planejamento composto central, ainda segundo de Melo, Silvestre e Silva (2014), é a garantia de uma uniformidade de precisão dentro de toda a faixa experimental, não apenas na região central de resposta, o que evita interpretações enviesadas.

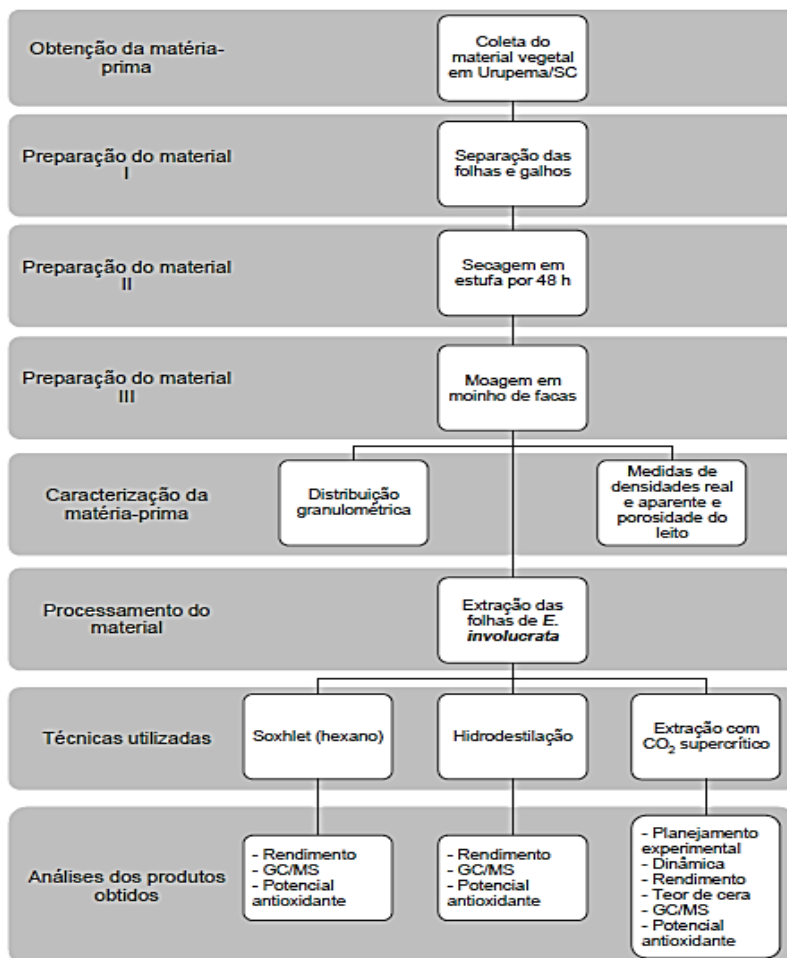
Diante do exposto nessa revisão bibliográfica, a qual tem como função justificar as metodologias empregadas e fundamentar a futura discussão dos resultados do presente trabalho, dar-se-á início agora à seção de materiais e métodos experimentais adotados em todas as etapas da pesquisa, seguida da apresentação e explicação dos resultados obtidos por meio de tais técnicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, será apresentado, em um primeiro momento, um fluxograma contemplando todas as etapas desenvolvidas no presente trabalho (Figura 10), seguido de informações mais detalhadas sobre as metodologias adotadas para cada uma dessas etapas.

4.1 FLUXOGRAMA DO TRABALHO

Figura 10 – Fluxograma das atividades desenvolvidas no presente trabalho.



Fonte: a autora (2017).

4.2 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Eugenia involucrata* foram coletadas na área rural do município de Urupema/SC (latitude 27° 54' S e longitude 49° 47' W) entre os meses de fevereiro e abril de 2016. A equipe da Fundação CERTI e a própria autora realizaram as coletas e o transporte do material para o laboratório (LCP-EQA-UFSC). As folhas foram, então, separadas dos galhos manualmente e submetidas à secagem em estufa a 35 °C por aproximadamente 48 h. Em seguida, as folhas secas foram moídas em moinho de facas, peneiradas para análise granulométrica e suas frações pesadas em balança analítica, como descrito mais detalhadamente na seção 4.4.1. As folhas moídas foram mantidas em refrigerador doméstico até o momento das extrações.

4.3 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (SOXHLET)

A extração via Soxhlet foi realizada no LATESC-EQA-UFSC para quantificar o extrato das folhas de cerejeira-do-mato, utilizando hexano como solvente ($\rho_{20\text{ }^\circ\text{C}} = 0,659\text{ g/cm}^3$ e $T_{\text{ebulição}} = 68,7\text{ }^\circ\text{C}$). O aparato consistiu de um condensador Allihn e de uma câmara de extração com sifão para saída do solvente contendo o extrato (Figura 11).

Figura 11 – Aparato utilizado para a extração com solvente orgânico via Soxhlet.



Fonte: a autora (2017).

Cartuchos de papel-filtro foram adaptados para inserir as amostras de plantas (cerca de 5 g) nos aparelhos Soxhlet. Estes foram, então, submetidos à secagem em estufa a 30 °C por 24 h antes das extrações, para que não houvesse imprecisões nas pesagens devido à umidade das amostras e do papel-filtro. A pesagem foi realizada imediatamente após a retirada da estufa e antes da sua introdução no aparelho extrator.

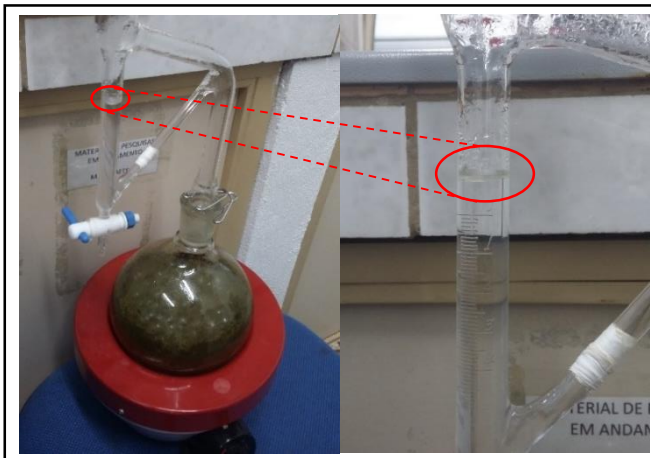
Balões de fundo chato de 250 mL foram utilizados para comportar 150 mL de hexano, os quais eram aquecidos por mantas de aquecimento até a sua temperatura de ebulição. Neste processo, o solvente do balão evapora, atinge as paredes frias do condensador e condensa na câmara, deixando os cartuchos completamente imersos em hexano. Ao atingir o nível máximo do sifão, o solvente retorna ao balão, reiniciando a operação, até que haja a saturação do solvente com os compostos da planta. As extrações Soxhlet foram feitas em triplicata, com duração de 6 h.

Ao fim do processo, os balões continham o extrato dissolvido em hexano. Para realizar sua separação, foi utilizado um rotaevaporador (BUCHI R-100) para evaporar o hexano e deixar apenas o extrato no balão, sendo assim possível determinar a sua massa por gravimetria. Paralelamente, os cartuchos foram deixados à temperatura ambiente por 24 h e depois colocados em estufa a 30 °C por 3 h antes da pesagem, para determinação da massa perdida das amostras. A massa contida no balão e a massa perdida nos cartuchos deve ser aproximadamente a mesma, reconhecendo as devidas limitações experimentais. Essa massa foi então dividida pela massa inicial de planta (base seca) para determinar o rendimento do processo, obtendo a média e o desvio padrão das replicatas.

4.4 EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

A hidrodestilação, considerada uma técnica tradicional de extração, foi realizada no LATESC-EQA-UFSC a fim de compará-la com as técnicas de ESC e Soxhlet em termos de rendimento, composição do extrato e atividade antioxidante. O produto obtido por esse método pode ser considerado o óleo essencial da espécie estudada. Seguindo a metodologia proposta por Santos et al. (2004), com algumas adaptações, foram pesados 30 g (base seca) de material vegetal moído, de mesma granulometria (0,349 mm) daquele utilizado nas técnicas de ESC e Soxhlet, em um balão de fundo redondo com capacidade para 1000 mL. Em seguida, introduziram-se pequenas esferas de vidro e 500 mL de água destilada no balão, conectando-o ao aparato Clevenger e posicionando o sistema sobre uma manta de aquecimento, como mostra a Figura 12.

Figura 12 – Sistema utilizado para a extração por hidrodestilação, com destaque para a interface formada entre água e óleo no tubo separador do aparato Clevenger (direita).



Fonte: a autora (2017).

A manta foi então regulada de modo a fornecer calor suficiente para borbulhar a mistura (ponto de ebulição da água) e fazer com que os vapores de água e voláteis atingissem o condensador posicionado acima do aparelho Clevenger, dando início ao processo de hidrodestilação, o qual teve duração de 6 h. As esferas de vidro serviram para quebrar o borbulhamento intenso, evitando que o conteúdo líquido do balão atingisse o aparato Clevenger.

A mistura condensada flui para o tubo separador, onde o óleo extraído se separa da água, alojando-se na parte superior do tubo, por ser menos denso que a água. A água retorna para o balão através do tubo de retorno, repetindo o ciclo continuamente até completar o tempo de extração. Ao final do processo, a leitura do volume de óleo essencial extraído foi feita diretamente na escala volumétrica do tubo separador. A válvula do aparelho Clevenger foi aberta, permitindo o escoamento da água e a coleta do óleo obtido em frasco âmbar de 10 mL com tampa e batoque, previamente pesado. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

4.5.1 Granulometria

Para a determinação do tamanho médio de partícula, utilizaram-se peneiras padronizadas da série Tyler de 35 a 80 *mesh* (500 μm e 180 μm , respectivamente) e um agitador de peneiras. As folhas foram previamente moídas em moinho de facas e secas em estufa, como anteriormente descrito.

Como visto na revisão bibliográfica, partículas muito grandes dificultam o processo de extração em termos de transferência de massa, devido à menor área disponível para o contato entre solvente/matriz vegetal; já partículas muito pequenas podem causar problemas de formação de caminhos preferenciais de $\text{CO}_2\text{-SC}$, diminuindo o seu contato com a totalidade das células vegetais. Assim, todo o material vegetal disponível foi passado pelas peneiras para que pudessem ser descartadas as frações acima de 500 μm e abaixo de 180 μm .

4.5.2 Densidade Real

A densidade real (ρ_r) do material vegetal moído foi determinada no LATESC-EQA-UFSC com o uso da técnica de picnometria a gás (AccuPyc II 1340 V1.05, Micromeritics), sendo adotado gás hélio como o meio de deslocamento. Esse método, que tem a Lei de Boyle como princípio de funcionamento, é considerado um dos mais confiáveis para a obtenção da densidade real de sólidos, por sua acurácia e reprodutibilidade.

4.5.3 Densidade Aparente

A densidade aparente (ρ_a) do leito de partículas vegetais foi determinada pesando-se a cápsula do extrator supercrítico vazia (volume de 10 cm^3) e, depois, a mesma cápsula contendo o leito de material vegetal sistematicamente compactado, repetindo-se o processo por dez vezes e calculando-se a média das massas pesadas. A média foi então dividida pelo volume da cápsula para o cálculo da densidade aparente do leito (Equação 1):

$$\rho_a (\text{g}/\text{cm}^3) = \frac{m_p (\text{g})}{\text{volume da cápsula} (\text{cm}^3)} \quad (1)$$

4.5.4 Porosidade do Leito

A porosidade do leito (ε), ou seja, a porcentagem de vazios no interior da cápsula de extração, foi calculada utilizando-se os valores obtidos das densidades real e aparente das partículas de material vegetal pela Equação 2. Este parâmetro se faz necessário, por exemplo, na estimativa de parâmetros na modelagem do processo de extração supercrítica e na reprodução dos experimentos.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (2)$$

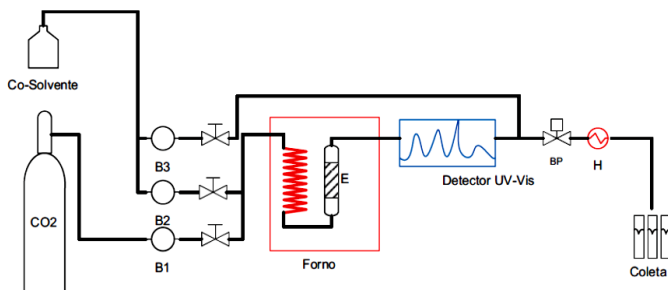
4.6 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

4.6.1 O Processo

As extrações foram realizadas em uma unidade laboratorial com opção de extração e cromatografia supercrítica (HPLC-SC, Jasco Inc., Japão) constituída por três bombas de alta pressão, estufa de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-Vis em linha, válvula *back-pressure* automatizada, sistema de aquecimento controlado e vaso extrator de capacidade de 10 cm³ com filtro de 10 μm na saída (Zibetti, 2012). Todos os ensaios foram realizados no LCP-EQA-UFSC.

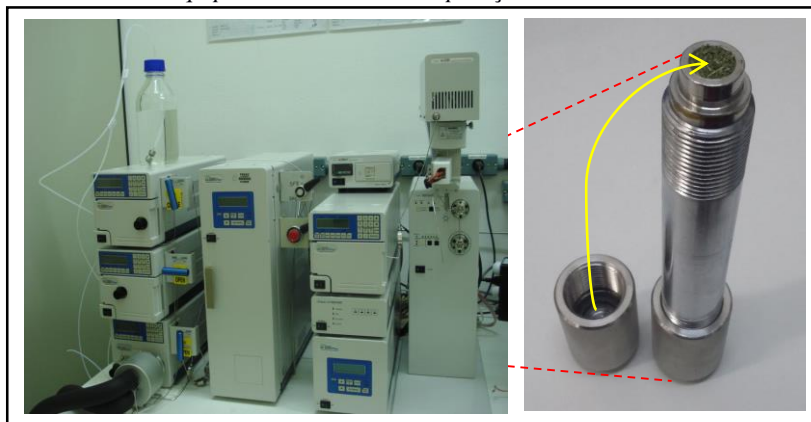
O dióxido de carbono, o qual é mantido a -10 °C por um resfriador (Julabo FL12F01) na entrada do sistema, é alimentado ao vaso extrator através da bomba de alta pressão B1 (Figura 13) e uma válvula. O vaso extrator, cápsula de extração ou simplesmente extrator, contém o material vegetal a ser extraído e se encontra em um forno para manter a temperatura de operação constante (Figura 14). A válvula *back-pressure* se mantém fechada até que o sistema seja pressurizado até o *setpoint* desejado, momento em que ela abre automaticamente para dar início ao fluxo de solvente supercrítico + extrato.

Figura 13 – Diagrama do processo de extração supercrítica adotado. B1 – bomba de alta pressão para introdução de CO₂; B2 e B3 – bombas de alta pressão para introdução de cossolvente/eluente; E – vaso extrator; BP – regulador backpressure; H – sistema de aquecimento controlado.



Fonte: Zibetti (2012).

Figura 14 – HPLC supercrítico utilizado nos experimentos (esquerda) e cápsula de extração (direita) aberta, carregada de folhas moídas de *E. involucrata*. O destaque em vermelho indica a posição da cápsula no equipamento durante sua operação.



Fonte: a autora (2017).

O extrato é arrastado pelo CO₂-SC e passa pela válvula *back-pressure* e pelo sistema de aquecimento, que ameniza o efeito de resfriamento provocado pela expansão do solvente. Na saída do sistema, o extrato se separa do CO₂ (liberado para a atmosfera) e é coletado em tubos de ensaio com tampa, os quais são previamente pesados para cálculo de rendimento e análises posteriores.

Foi utilizado CO₂ 99,99% puro (White Martins) e não houve uso de cossolventes ou eluentes em nenhum ensaio devido às desvantagens descritas na seção 3.5.3. Foram realizados testes de 3 a 7 h de extração, com vazões de 3 a 7 mL/min de CO₂-SC, pressões de 80 a 200 bar e temperaturas de 33 a 47 °C, como será especificado em seções posteriores deste trabalho. Ao final de cada extração, era realizada uma limpeza do sistema utilizando 25% de etanol e 75% de CO₂-SC por 10 a 20 min com vazão de 5 mL/min, seguida de CO₂-SC puro a 5 mL/min por 10 a 20 min, ou até que não houvesse mais etanol na linha do equipamento.

4.6.2 Planejamento Experimental e Condições Operacionais

A faixa de condições operacionais (temperatura e pressão) utilizadas para a extração supercrítica das folhas de *E. involucrata* foi definida a partir dos diversos estudos publicados sobre a extração com CO₂ supercrítico de óleos essenciais de matrizes vegetais (ver seção 3.5.3). Um planejamento experimental do tipo composto central (DCC), com codificação de variáveis exibida na Tabela 3, foi elaborado para determinar as condições mais adequadas em termos de rendimento e qualidade dos extratos dentro do intervalo adotado. O α adotado foi de $\sqrt{2}$ (corresponde a 1,414) e a vazão foi de 3 mL/min para todas as condições.

Tabela 3 – Codificação das variáveis para o DCC.

Nível (x _i)	P [bar] (x ₁)	T [°C] (x ₂)
-1,414	80	33
-1	98	35
0	140	40
1	182	45
1,414	200	47

Fonte: a autora (2017).

As condições empregadas são mostradas na matriz de planejamento gerada pelo software *Statistica 10* na Tabela 4. Optou-se por repetir o ponto central cinco vezes gerando, assim, 13 (treze) ensaios. As densidades do solvente supercrítico foram determinadas a partir do diagrama densidade vs. pressão (NIST *Standard Reference Database Number 69*) a 33, 35, 40, 45 e 47 °C, de acordo com cada condição, sendo o intervalo de densidades resultante de 277,90 a 849,93 kg/m³.

Tabela 4 – Matriz de planejamento para os experimentos de ESC, incluindo os valores de densidade correspondente de cada par pressão-temperatura.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	x ₁	x ₂	ρ _r (kg/m ³)
1	98	35	-1	-1	704,94
2	182	35	1	-1	849,93
3	98	45	-1	1	466,43
4	182	45	1	1	791,8
5	140	40	0	0	763,27
6	140	40	0	0	763,27
7	140	40	0	0	763,27
8	140	40	0	0	763,27
9	140	40	0	0	763,27
10	80	40	-1,414	0	277,90
11	140	47	0	1,414	701,84
12	200	40	1,414	0	839,81
13	140	33	0	-1,414	815,57

Fonte: a autora (2017).

4.6.3 Obtenção das Curvas de Extração

As curvas de extração das folhas de *E. involucrata* foram construídas com o rendimento acumulado de extrato em função do tempo de extração e/ou da massa de CO₂-SC utilizada, sendo a curva composta por, pelo menos, vinte pontos experimentais. Para o ensaio da dinâmica de extração, foram utilizados vinte ou mais tubos de ensaio com tampa, previamente pesados em balança analítica, para realizar a coleta em intervalos de tempo preestabelecidos, entre 0 e 180 min, 0 e 200 min e 0 e 420 min. Após a coleta, os tubos foram novamente pesados para a medida da

massa de extrato obtida em cada intervalo de tempo. No *Excel* foram calculadas as massas de extrato acumuladas e, em seguida, determinou-se o rendimento para cada ponto da curva.

As condições operacionais adotadas para os ensaios de dinâmica foram escolhidas baseadas nos resultados do DCC e das análises cromatográficas. Alguns testes extras variando o tempo de extração e a vazão de solvente foram realizados com fins qualitativos para reforçar o entendimento do mecanismo do processo. Os valores de temperatura, pressão, vazão e tempo utilizados em cada etapa estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições empregadas nos experimentos de dinâmica de ESC, sendo **n** o número de repetições de cada ensaio.

Dinâmica	P (bar)	T (°C)	ρ_f (kg/m ³)	t (min)	*t _{estático} (min)	Q (mL/min)	n
1	162	43	778,82	180	0	3,00	3
2	200	40	839,81	180	0	3,00	3
3	140	47	701,84	180	0	3,00	3
4	200	40	839,81	420	0	3,00	2
5	200	40	839,81	420	40	3,00	1
6	200	40	839,81	200	0	5,00	1
7	200	40	839,81	200	0	7,00	1

*O t_{estático} corresponde ao período estático, em que se mantém o sistema sob as condições operacionais do ensaio por um determinado tempo sem abrir a válvula back-pressure. Após a sua abertura, inicia-se o período dinâmico.

Fonte: a autora (2017).

Os ensaios que foram realizados com uma ou duas repetições (4, 5, 6 e 7) são de natureza apenas qualitativa, com o propósito de elucidar alguns comportamentos observados ao longo da pesquisa.

4.6.4 Obtenção do Gráfico Rendimento vs. Densidade do CO₂-SC

Os resultados do planejamento permitiram visualizar que, como normalmente esperado para um processo de extração supercrítica, o que realmente parece ter uma relação causa-efeito no rendimento de extrato da cerejeira-do-mato é a densidade do solvente supercrítico. Percebe-se que, quanto maior a densidade, maior o rendimento obtido, pois há uma maior interação soluto-fluido; ou seja, mais massa de CO₂ em contato com a matriz vegetal. Essa correlação pareceu ser mais forte do que a existente entre rendimento e pressão, como será explicado nos resultados.

A partir dessa observação, optou-se por realizar mais experimentos abrangendo mais valores de densidade, com o objetivo de plotar um gráfico de rendimento em função da densidade de CO₂-SC e determinar a relação entre essas variáveis para essa espécie. Foram escolhidas 8 (oito) condições para esse estudo, as quais são apresentadas na Tabela 6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, adotando-se o tempo de 180 min e vazão de solvente de 3 mL/min, sem período estático. Os valores de densidade foram encontrados na base de dados do NIST, como relatado na seção 4.5.2.

Tabela 6 – Valores de densidade de CO₂-SC adotados para a elaboração do gráfico *Y* vs. ρ_f .

Condição	P (bar)	T (°C)	ρ_f (kg/m ³)
1	80	40	277,90
2	98	45	466,43
3	83	35	574,13
4	115	45	633,87
5	162	43	778,82
6	182	45	791,80
7	140	33	815,57
8	200	40	839,81

Fonte: a autora (2017).

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

4.7.1 Rendimento Global

O rendimento global (*Y*) de cada extração foi calculado como o quociente da massa de matéria extraída por 100 g de massa inicial de matriz vegetal (Equação 3):

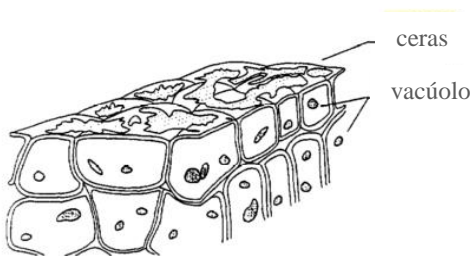
$$Y \left(\frac{g \text{ extrato}}{100 g \text{ planta}} \right) = \frac{m_e}{m_p} \cdot 100 \quad (3)$$

O resultado também pode ser expresso como porcentagem em massa (%) sem prejuízo da interpretação dos resultados.

4.7.2 Teor de Cera

As ceras estão localizadas na superfície da folha (Figura 15), onde exercem o papel de controle de perspiração por impermeabilização. Elas não possuem afinidade com outras partes da folha, sendo, portanto, extraídas praticamente sem resistências à transferência de massa, enquanto o óleo essencial, mesmo que apresente maior solubilidade, tem que superar grandes resistências à difusão interna (REVERCHON, 1997).

Figura 15 – Representação esquemática da estrutura de uma folha, mostrando a localização das ceras e dos vacúolos onde o óleo essencial é armazenado.



Fonte: Reverchon (1997).

Além disso, como visto na Figura 7 da seção 3.5.3, as ceras são facilmente coextraídas com hidrocarbonetos terpênicos. Por isso, é importante saber se a quantidade de cera extraída com o óleo da planta em estudo é alta ou baixa, dentro das condições empregadas, visto que, em regra, ceras não possuem aplicabilidade de grande interesse comercial. O teor de cera presente nos extratos supercríticos das folhas de cerejeira-domato foi estimado para as condições testadas no planejamento composto central.

Para isso, os extratos puros contidos nos tubos de ensaio foram diluídos em etanol na mesma proporção etanol/extrato (em massa) e deixados em repouso por 1 dia em refrigerador para que a porção cerosa pudesse se precipitar. Os tubos foram, então, centrifugados a 3500 rpm por 30 min para separar os sólidos contidos nas amostras. O sobrenadante contendo a fração oleosa foi transferido para outro tubo de ensaio, para posterior análise cromatográfica, e os tubos contendo a cera foram submetidos a secagem em estufa a 40 °C por 24 h para eliminar os resquícios

de etanol e/ou umidade e, assim, determinar a massa de cera presente na amostra por gravimetria.

4.7.3 Análises Cromatográficas

As análises dos extratos por GC/MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa) foram realizadas em um equipamento Agilent GC 7890A acoplado a um detector MS Agilent 5975C. A coluna capilar HP-5MS (Agilent) de sílica fundida (30 m de comprimento \times 250 μ m de diâmetro interno \times 0,25 μ m de espessura do filme, composta de 5% de fenilmetilpolisiloxano) foi conectada a um detector quadrupolo operando em modo EI a 70 eV. Hélio foi adotado como gás carreador a uma vazão de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e da interface foram ambas de 250 °C, com uma razão de *split* de 1:50. O volume de amostra injetado foi de 1 μ L com um auto injetor de amostras Agilent GC *Sampler* 80. O programa de temperatura do forno consistiu em subir de 40 °C por 2 min, 3 °C/min até 145° C e, finalmente, 10 °C/min até 250 °C por 10 min. Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa com os fornecidos pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2011).

A preparação das amostras para GC/MS consistiu em diluir os extratos em etanol (grau HPLC) a uma concentração próxima a 4,7 mg/mL, a qual apresentou bons resultados de picos no cromatograma. As amostras de Soxhlet foram enviadas para a análise no próprio solvente de extração (hexano). Em resumo, foram submetidos ao GC/MS os seguintes extratos:

- a) soxhlet com hexano;
- b) óleo essencial obtido por HD;
- c) extratos ESC do planejamento experimental, para observar a influência da condição operacional na composição do óleo;
- d) extratos ESC das dinâmicas 1 e 2, para observar os tempos em que são obtidos determinados componentes.

4.7.4 Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico

O procedimento para o teste de atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico baseou-se na metodologia proposta por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006). Os testes foram realizados no LATESC-EQA-UFSC. Foram submetidos ao teste o extrato hexânico (Soxhlet), o óleo essencial (HD) e o extrato ESC da condição de 182 bar

e 45 °C, todos eles diluídos em etanol, o qual é o solvente adotado nessa metodologia.

O método, adotado normalmente para substâncias lipofílicas, tem como fundamento medidas espectrofotométricas da descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Nesta metodologia, o sistema formado por β -caroteno e ácido linoleico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um anti-oxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoleico e por um átomo de hidrogênio, retirado de um dos grupos metila da molécula de β -caroteno. A taxa de descoloração da solução de β -caroteno, que representa o potencial antioxidante da amostra (AA%), é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica a 470 nm (A) inicial e após 120 minutos (Equação 4):

$$AA(\%) = \left(1 - \frac{A_{amostra,t=120} - A_{amostra,t=0}}{A_{controle,t=120} - A_{controle,t=0}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, em um primeiro momento, serão apresentados os resultados de rendimento, cromatografia e teste de atividade antioxidante para cada uma das técnicas e a caracterização do leito de partículas – granulometria, densidades real e aparente e porosidade – separadamente, com breves discussões sobre suas implicações. Em seguida, esses resultados serão confrontados para a discussão das vantagens e desvantagens dos métodos empregados, com foco na seletividade de cada um para os compostos majoritários β -elemeno e biciclogermacreno.

5.1 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO (SOXHLET)

5.1.1 Rendimento

A extração Soxhlet com hexano das folhas da cerejeira-do-mato resultou em um rendimento mássico de **4,0338 \pm 0,1473 g/100 g de planta** (média \pm desvio padrão [DP]). Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Rendimento mássico da extração com hexano via Soxhlet.

Cartucho	Massa inicial de planta (g)	Massa perdida dos cartuchos (g)	Y (g/ 100 g planta)
1	4,9829	0,1954	3,9214
2	4,9808	0,1982	3,9793
3	4,9779	0,2091	4,2006
Média			4,0338
DP			0,1473

Fonte: a autora (2017).

É comum o rendimento da extração Soxhlet com hexano resultar em valores superiores a outras técnicas, visto que esse é um solvente com altíssimo poder de solubilização, o que o torna não seletivo. O hexano é aplicado, por exemplo, na determinação do conteúdo residual de óleo de uma amostra que já tenha passado por um outro processo de extração, como no trabalho de Richter, del Valle e Núñez (2015). Ou seja, pode-se considerar que ele é capaz de extrair o conteúdo total de óleo, compostos bioativos e até mesmo pigmentos, o que é assumido por diversos autores, como Kehili et al. (2017), que falam em **quantidade máxima extraível** ao se referirem aos teores de licopeno e β -caroteno da casca de tomate seca obtidos por Soxhlet com hexano. A própria coloração verde escura e

a textura gordurosa do extrato hexânico da cerejeira-do-mato (Figura 16) refletem esse poder de solvatação, e explica também o porquê de se ter um rendimento elevado em comparação às técnicas de HD e ESC.

Figura 16 – Aparência do extrato hexânico bruto das folhas de cerejeira-do-mato após rota-
evaporação do solvente.



Fonte: a autora (2017).

Um dos grandes problemas dessa metodologia para aplicações em isolamento de biocompostos reside justamente na baixa seletividade do solvente, dificultando as etapas posteriores de separação e resultando em produtos de baixa pureza. Por exemplo, Oliveira et al. (2013) constataram que o teor de cumarina do extrato Soxhlet das folhas de guaco era muito menor que o teor dessa substância em extratos supercríticos, apesar de o rendimento global do extrato bruto ser mais elevado para a técnica convencional. Em suma, optar pela utilização da extração via Soxhlet com hexano depende fortemente da finalidade de aplicação do extrato, levando em consideração a exigência de pureza e de qualidade do produto final.

5.1.2 Análises Cromatográficas

Os compostos majoritários identificados por GC/MS no produto da extração Soxhlet das folhas de *E. involucrata* foram: β -elemeno, biciclogermacreno, D-limoneno, cariofileno e germacreno D, todos esses da família dos terpenos, seguidos de uma pequena porcentagem de benzociclobuteno. Na Tabela 8, estão relacionados os componentes voláteis detectados na análise cromatográfica e sua respectiva composição na amostra, comparando com o que já se encontra na literatura sobre a composição química do óleo volátil das folhas de *E. involucrata*.

Tabela 8 – Resultados de GC/MS para o extrato hexânico de *E. involucrata* do presente trabalho (autora, 2017) e para o óleo volátil isolado pelos autores Paroul et al. (2007) e Ramos et al. (2006).

Composição (%)			
Composto	A autora (2017)	Paroul et al. (2007)	Ramos et al. (2006)
β-elemeno/ elemenos	30,44	9,01	12,70
Biciclogermacreno	21,43	36,80	19,00
D-limoneno	16,74	-	-
Cariofileno	11,65	18,11	3,00
Humuleno	-	2,41	1,40
Germacreno D	6,65	-	5,20
Germacreno B	-	15,05	-
Benzociclobuteno	2,91	-	-
Total	89,82	-	96,00
Não identificados	10,18	-	4,00

Fonte: a autora (2017).

Nota-se que o perfil químico qualitativo do extrato hexânico das folhas da cerejeira-do-mato coletada na FOM do estado de Santa Catarina se assemelha razoavelmente àquele observado por Paroul et al. (2007) e Ramos et al. (2006) para o óleo essencial dessa espécie, à exceção do D-limoneno, não detectado por nenhum dos autores. O biciclogermacreno (21,43%), no presente trabalho, também foi identificado como sendo um dos constituintes principais, com composição intermediária em relação à encontrada pelos dois autores (36,80% e 19,00%). Vale salientar que o óleo essencial analisado nos trabalhos anteriores continha outros compostos não exibidos na Tabela 8, não detectados no presente estudo.

Porém, é considerável a diferença do teor de β-elemeno (30,44%) do extrato hexânico em relação ao teor de isômeros do elemeno do óleo essencial obtido nos outros estudos (9,01% e 12,70% de elemenos). Essas diferenças, principalmente quantitativas, podem ser atribuídas às diferentes localidades e épocas em que a coleta foi realizada, pois, como discutido na seção 3.2, as condições sob as quais a planta se desenvolve afetam significativamente a composição do seu óleo, bem como a técnica de extração adotada.

5.1.3 Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico

Este método resultou em uma atividade antioxidante de **99,34 \pm 0,63%** (média \pm DP) para os extratos das folhas de *E. involucrata* utilizando a técnica de Soxhlet com hexano, o que corresponde a um valor muito expressivo de potencial antioxidante (Tabela 9). Isso significa que o extrato bruto foi capaz de inibir quase 100% da oxidação do β -caroteno por duas horas, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (ALVES et al., 2010). Tal potencial é comparável ao de substâncias antioxidantes sintéticas utilizadas comumente na indústria, como BHT, BHA, TBHQ e PG (ANDRADE et al., 2013; DARTORA et al., 2011).

Tabela 9 – Resultados do teste de atividade antioxidante do extrato Soxhlet.

Tubo	AA (%)
1	99,30
2	100,00
3	98,74
Média	99,34
DP	0,63

Fonte: a autora (2017).

5.2 EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO

5.2.1 Rendimento

A extração por hidrodestilação das folhas de cerejeira-do-mato resultou em um rendimento volumétrico ($Y_{vol.}$) médio de **0,5 mL/100 g planta**. O rendimento mássico ($Y_{más.}$) teve uma média de **0,3693 \pm 0,0231 g/100 g planta** (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados dos experimentos de hidrodestilação.

Ensaio	Massa de óleo (g)	Volume de óleo (mL)	$Y_{vol.}$ (mL/100 g planta)	$Y_{más.}$ (g/100 g planta)
2	0,1059	0,1500	0,5000	0,3530
3	0,1157	0,1500	0,5000	0,3857
Média	0,1108	0,1500	0,5000	0,3693
DP	0,0069	0,0000	0,0000	0,0231

Fonte: a autora (2017).

Houve um erro experimental no primeiro ensaio devido ao transbordamento causado pelo forte borbulhamento do líquido, o que impediu seu uso para análises posteriores. Foram contabilizadas apenas as duas últimas replicatas, para as quais adotou-se o uso de esferas de vidro para diminuir o efeito do borbulhamento.

O valor relativamente baixo de rendimento para óleos essenciais de folhas é comumente observado para diversas espécies, sendo que para as folhas da cerejeira-do-mato já foram obtidos rendimentos de 0,08% usando arraste a vapor por quatro horas (RAMOS et al., 2006) e 0,8% (p/v) utilizando aparelho tipo Clevenger por duas horas (PAROUL et al., 2007). Novamente, a quantidade de óleo essencial, assim como sua composição, varia de acordo com o ambiente no qual a planta se desenvolve e com a época do ano em que é coletada.

5.2.2 Análises Cromatográficas

Os compostos majoritários identificados no óleo essencial obtido por hidrodestilação de *E. involucrata* foram: β -elemeno, biciclogermacreno e cariofileno, seguidos dos minoritários (<5% da amostra): germacreno D, α -selineno, humuleno e allo-aromadendreno. Na Tabela 11, encontram-se os compostos voláteis do óleo essencial das folhas de cerejeira-do-mato e sua respectiva composição na amostra.

Tabela 11 – Resultados de GC/MS para o óleo essencial de *E. involucrata*.

Composto	Composição (%)
β -elemeno	42,41
Biciclogermacreno	22,96
Cariofileno	13,94
Germacreno D	4,02
α -selineno	2,42
Humuleno*	1,71
Allo-aromadendreno	1,33
Total (sesquiterpenos)	88,79
Não identificados	11,21

*isômero de cariofileno, outrora chamado α -cariofileno.

Fonte: a autora (2017).

Foram identificados 88,79% dos compostos que compõem o óleo volátil, todos classificados como sesquiterpenos (fórmula molecular:

C₁₅H₂₄; massa molar: 204,36 g/mol). Nota-se no óleo essencial a presença dos compostos principais encontrados no perfil cromatográfico do extrato hexânico, porém com uma proporção significativamente maior de β-elemeno (42,41% OE contra 30,44% Soxhlet). Biciclogermacreno, cariofileno e germacreno D são encontrados em ambos os extratos em proporções semelhantes. Os compostos α-selineno, humuleno e allo-aromadendreno foram identificados apenas no OE, enquanto o D-limoneno foi detectado apenas para o produto do Soxhlet, sendo sua porcentagem considerável naquele extrato (consultar Tabela 8).

Em comparação com a literatura (PAROUL et al, 2007; RAMOS et al., 2006), o OE das folhas de *E. involucrata* da Floresta com Araucárias do estado de Santa Catarina diferencia-se, principalmente, pelo seu alto teor de β-elemeno, sendo cerca de quatro vezes maior que o reportado na literatura para outras localidades (norte do Rio Grande do Sul e Campinas, São Paulo). O teor de biciclogermacreno é bastante próximo do valor de 19% determinado por Ramos et al. (2006) e significativamente inferior ao valor de 36,8% determinado por Paroul et al. (2007).

Ramos et al. (2006) também detectaram baixos teores dos compostos germacreno D, selineno, humuleno e allo-aromadendreno no OE dessa espécie. Já o teor de cariofileno foi bem próximo ao detectado por Paroul et al. (2007), de cerca de 14%. Em suma, pode-se observar que, apesar de os constituintes principais se repetirem para a mesma espécie em diferentes regiões e épocas de coleta, a sua composição pode variar significativamente segundo esses fatores.

5.2.3 Atividade Antioxidante pelo Método β-caroteno/ácido linoleico

Este método resultou em um potencial antioxidante de **6,41 ± 0,77%** para o óleo essencial das folhas de *E. involucrata* obtido por hidrodestilação, o que significa que ele é praticamente inativo como antioxidante (Tabela 12). Esse resultado, face à expressiva atividade antioxidante do extrato hexânico, pode ser explicado pelo fato de que óleos essenciais contêm em abundância hidrocarbonetos terpênicos não oxigenados, os quais normalmente não são responsáveis pelo potencial antioxidante de extratos vegetais.

Além disso, a técnica de GC/MS é capaz de identificar apenas os compostos voláteis; isto é, os compostos de massa molar superior ou de baixa volatilidade, como os compostos oxigenados, mesmo que presentes no extrato Soxhlet, não puderam ser detectados por esse método. Assim, provavelmente existem muitos outros constituintes no extrato hexânico

aos quais pode ser atribuída sua elevada atividade antioxidante, enquanto que, no óleo essencial, aqueles compostos identificados por GC/MS provavelmente compõem a totalidade ou quase totalidade do óleo.

Tabela 12 – Resultados do teste de atividade antioxidante para o óleo essencial.

Tubo	AA (%)
1	5,90
2	7,30
3	6,04
Média	6,41
DP	0,77

Fonte: a autora (2017).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

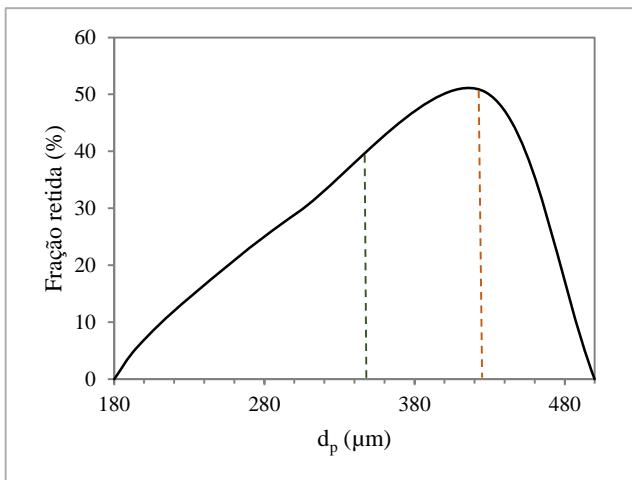
A caracterização das partículas da matriz vegetal é de fundamental importância para o entendimento do processo de ESC, dada a influência das propriedades do sólido na compactação do leito e, conseqüentemente, na área de contato disponível para a transferência de massa entre as fases sólida e fluida. Igualmente, afeta a TM em qualquer outra técnica de extração aplicada, o que se reflete no valor do coeficiente global de TM do processo.

Espera-se que, quanto menor o tamanho de partícula, maior a área superficial disponível para a passagem do soluto da fase sólida para a fase fluida. Além disso, no caso de matrizes vegetais, a redução do diâmetro médio de partícula provoca um maior grau de rompimento de células e maior acessibilidade aos compartimentos oleíferos da planta, aumentando a capacidade global de extração.

5.3.1 Granulometria

O total em massa disponível para todos os experimentos foi de cerca de 1300 g de folhas moídas de cerejeira-do-mato, com tamanho de partícula entre 0,180 e 0,500 mm, sendo o diâmetro médio de 0,349 mm, determinado pela média ponderada dos diâmetros das malhas. A distribuição granulométrica resultante, utilizada em todos os experimentos de extração, pode ser visualizada na Figura 17, com destaque para os diâmetros de 0,428 mm, de maior probabilidade de ser encontrado, e 0,349 mm, a média ponderada dos diâmetros.

Figura 17 – Distribuição granulométrica das partículas utilizadas em todos os experimentos (ESC, Soxhlet e HD).



Fonte: a autora (2017).

5.3.2 Densidade Real (ρ_r)

A técnica de picnometria de gás hélio resultou em uma densidade real das partículas de cerejeira-do-mato de $1,4358 \pm 0,0006 \text{ g/cm}^3$ (média \pm DP). Esse valor é próximo ao encontrado para as folhas de pitanga ($1,48 \pm 0,04 \text{ g/cm}^3$), uma planta do gênero *Eugenia*, no trabalho de Martinez-Correa et al. (2011), utilizando o mesmo método de picnometria a gás. O valor de densidade real de partículas de matriz vegetal é frequentemente omitido em publicações na área de extração de óleos essenciais.

5.3.3 Densidade Aparente (ρ_a)

O cálculo de densidade aparente do leito de partículas na cápsula de extração utilizando a Equação 1 resultou no valor de $0,4674 \pm 0,0037 \text{ g/cm}^3$ (média \pm DP). Esse valor é função das características geométricas das partículas, do vaso extrator e do grau de compactação. No trabalho de Martinez-Correa et al. (2011), esse valor foi menor do que o encontrado no presente estudo ($0,312 \pm 0,047 \text{ g/cm}^3$), o que afetou a porosidade resultante do leito. A maior densidade aparente obtida no presente trabalho pode ser em virtude do menor tamanho de partícula (0,349 mm) comparado ao obtido por esses autores (0,817 mm).

5.3.4 Porosidade do Leito (ϵ)

O resultado da Equação 2 para a porosidade do leito de extração foi de **0,6745**. Isto é, o leito é composto aproximadamente de 67,45% de vazios, espaço entre as partículas por onde o CO₂-SC flui. Na Tabela 13, encontram-se reunidos os resultados da caracterização do leito. No trabalho de Martinez-Correa et al. (2011), esse valor foi de 0,789, devido à menor densidade aparente como discutido na seção 5.3.3.

Tabela 13 – Características do leito de extração.

ρ_r (g/cm ³)	ρ_a (g/cm ³)	ϵ	d_p (mm)
1,4358	0,4674	0,6745	0,349

Fonte: a autora (2017).

5.4 EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO

5.4.1 Planejamento Experimental

As condições de pressão e temperatura testadas para o planejamento composto central resultaram nas respostas listadas na Tabela 14. Dentro da faixa estudada, a temperatura não mostrou efeito significativo na resposta; isto é, o rendimento é estatisticamente independente da temperatura, segundo análise realizada no *Statistica* 10.

Tabela 14 – Resultados do DCC para a ESC de *E. involucrata*.

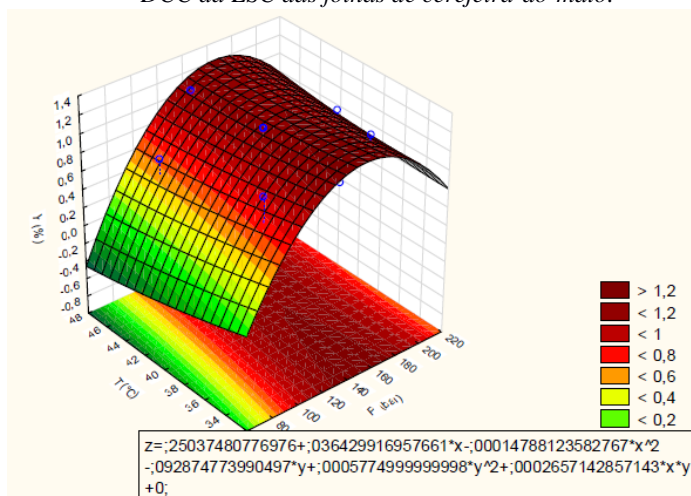
Ensaio	P (bar)	T (°C)	x ₁	x ₂	ρ_r (kg/m ³)	Y (g/100 g planta)
1	98	35	-1	-1	704,94	1,0293
2	182	35	1	-1	849,93	1,1784
3	98	45	-1	1	466,43	0,7188
4	182	45	1	1	791,8	1,0911
5	140	40	0	0	763,27	1,1481
6	140	40	0	0	763,27	1,0062
7	140	40	0	0	763,27	1,0487
8	140	40	0	0	763,27	1,1453
9	140	40	0	0	763,27	1,1539
10	80	40	-1,414	0	277,9	0,0386
11	140	47	0	1,414	701,84	1,0829
12	200	40	1,414	0	839,81	1,0127
13	140	33	0	-1,414	815,57	1,0696

Fonte: a autora (2017).

Já a pressão mostrou ter um impacto maior na resposta dentro das condições experimentais adotadas, embora de maneira não linear, com termo quadrático significativo. Houve uma pequena queda no rendimento para a pressão máxima utilizada, a qual foi de 200 bar. A condição de 80 bar e 40 °C praticamente não foi capaz de extrair compostos da matriz vegetal, resultando em rendimento menor que 0,04 g/100 g de planta.

De acordo com as análises estatísticas, a condição que forneceria o maior rendimento seria de 162 bar e 43 °C, correspondendo ao ponto máximo da superfície de resposta gerada nesse planejamento (Figura 18). Devido a esse resultado, a condição de 162 bar e 43 °C, na mesma vazão de 3 mL/min de CO₂-SC, foi selecionada para o primeiro ensaio da dinâmica de extração. No geral, os resultados do DCC serviram para se ter uma maior noção do rendimento que se pode obter a partir das folhas de cerejeira-do-mato com a técnica de ESC, visto que não há registros na literatura desse processo com essa espécie.

Figura 18 – Superfície de resposta gerada pelo Statistica 10 para o DCC da ESC das folhas de cerejeira-do-mato.



Fonte: a autora (2017).

É importante ressaltar que o tempo de armazenamento pode afetar a qualidade ou quantidade do óleo vegetal presente no material moído (GARMUS et al., 2014). Como todo o material disponível foi previamente moído antes de todas as extrações, e não imediatamente antes de cada experimento, pode ter ocorrido degradação ou perda de compostos

voláteis, mesmo entre uma corrida e outra, no caso de um intervalo de muitos dias. Esse fato, além da própria heterogeneidade inerente a sistemas biológicos, pode ter afetado os resultados do DCC.

Embora existam certas limitações, com o DCC foi possível notar que as condições do planejamento – com exceção dos ensaios 3 e 10, cujas densidades eram as menores testadas – renderam em torno de 1 g de extrato/100 g de planta, com pouca variação para mais ou para menos. A condição para a construção da curva de extração (162 bar e 43 °C) não necessariamente fornece o maior rendimento possível, devido à variabilidade do processo e heterogeneidade da amostra, mas deve resultar em um valor próximo aos obtidos nos ensaios do planejamento. Ela foi escolhida como ponto de partida para as seguintes etapas da pesquisa, sem levar em consideração ainda o perfil químico para cada condição.

Como o rendimento obtido para esses ensaios se mostrou suficiente para a preparação das amostras para a cromatografia, não se julgou necessário adotar um período de extração mais longo ou explorar outras faixas de condições operacionais, até mesmo pela limitação técnica imposta pelo equipamento e outros recursos. Além disso, tempos maiores de extração também aumentam o teor de ceras coextraídas com o óleo essencial e outros compostos bioativos, o que não é vantajoso quando o interesse são os compostos mais voláteis (SOVOVÁ, SAJFRTOVA e TOPIAR, 2015).

Os treze extratos obtidos com o DCC foram diluídos em etanol, chegando a uma concentração de aproximadamente 4,67 mg/mL, para efetuar a separação das ceras mais pesadas e posterior identificação de compostos em GC/MS. As soluções foram mantidas sob refrigeração até o momento da filtração e análise no cromatógrafo.

5.4.2 Teor de Cera

O teor de cera das amostras obtidas com o DCC é apresentado na Tabela 15. A aparência do sólido precipitado nos tubos utilizados para essa quantificação era de uma massa branca. A amostra do ensaio 10 não pôde ser quantificada devido ao seu baixíssimo rendimento. Pela metodologia empregada na quantificação das ceras, não foi possível observar efeitos da condição operacional nessa medida. No entanto, pode-se afirmar que o teor de cera coextraída com o extrato supercrítico das folhas de cerejeira-do-mato varia, em média, de 3 a 5%, o qual pode ser considerado um valor baixo (REVERCHON, 1997).

Tabela 15 – Estimativa do teor de cera das amostras obtidas com o DCC.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	Teor de cera (%)
1	98	35	3,92
2	182	35	2,89
3	98	45	3,61
4	182	45	3,94
5	140	40	3,90
6	140	40	2,32
7	140	40	4,22
8	140	40	3,13
9	140	40	4,01
10	80	40	-
11	140	47	5,75
12	200	40	4,90
13	140	33	4,82

Fonte: a autora (2017).

5.4.3 Rendimento vs. Densidade do CO₂-SC

Para além das análises estatísticas, os resultados do planeamento permitiram visualizar que, como na maioria dos processos ESC, o que realmente parece ter uma relação causa-efeito no rendimento é a densidade do solvente supercrítico. A partir dessa observação, como explicado na seção 4.5.4, optou-se por realizar mais experimentos, em triplicata, abrangendo mais valores de densidade, com o objetivo de obter o gráfico de rendimento *versus* densidade de CO₂-SC e determinar a relação entre essas variáveis para essa espécie. Os experimentos foram realizados no menor intervalo de dias possível para evitar degradação ou perda de compostos voláteis da matéria-prima e, conseqüentemente, interpretações equivocadas dos resultados. Os rendimentos obtidos para esse estudo são apresentados na Tabela 16.

A tendência observada para o gráfico (Figura 19) foi claramente linear, com R² superior a 0,99. Os gráficos de valores preditos *versus* observados e de análise de resíduos foram plotados para se avaliar a adequabilidade do modelo de regressão linear, confirmando que a relação entre as variáveis é de fato linear e que a variância é constante (Figura 20). O gráfico é válido no intervalo de condições operacionais estudadas (33-45 °C, 80-200 bar e 3 mL/min). A partir desses resultados pode-se inferir que, dentro das condições empregadas, o efeito da temperatura na solubilidade dos componentes extraíveis da planta devido à elevação da pressão de vapor não supera o efeito da densidade; isto é, provavelmente

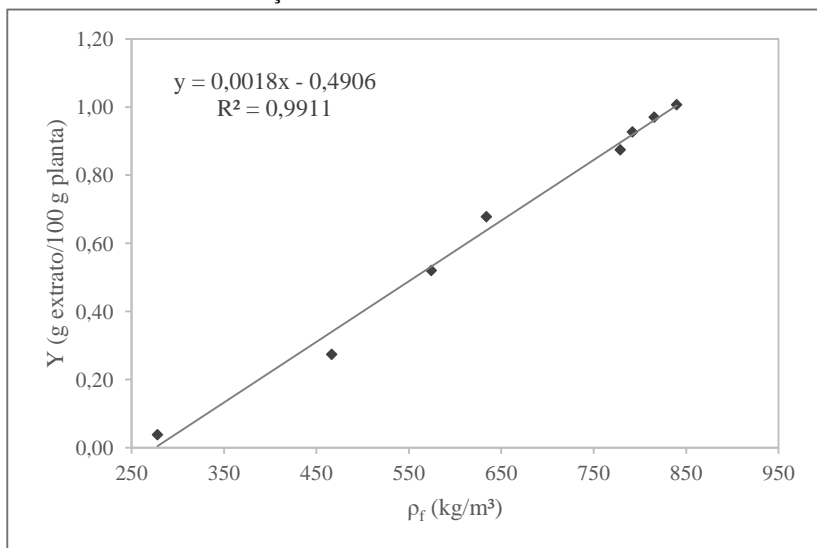
em nenhum dos experimentos realizados se atingiu a região retrógrada da extração supercrítica, onde há inversão das isotermas. Como esse fenômeno ocorre normalmente acima de 300 bar (MAZZUTTI et al., 2012) e a máxima pressão utilizada foi de 200 bar, esse fato já era esperado.

Tabela 16 – Rendimentos resultantes do estudo com a densidade do CO₂-SC.

ρ_f (kg/m ³)	Y ₁ (g/100 g planta)	Y ₂ (g/100 g planta)	Y ₃ (g/100 g planta)	Y _{médio} (g/100 g planta)
277,90	0,0386	0,0321	0,0451	0,0386
466,43	0,2528	0,2636	0,3070	0,2745
574,13	0,5901	0,5043	0,4656	0,5200
633,87	0,6585	0,6732	0,7042	0,6787
778,82	0,8899	0,8528	0,8807	0,8745
791,80	1,0100	0,8621	0,9112	0,9278
815,57	1,0696	1,0319	0,8108	0,9708
839,81	1,0127	0,9820	1,0257	1,0068

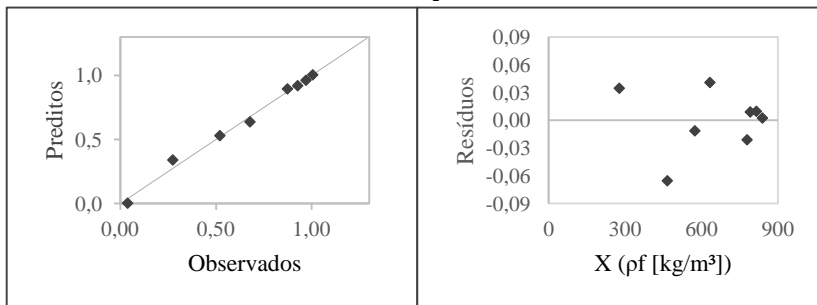
Fonte: a autora (2017).

Figura 19 – Tendência linear da relação entre as variáveis de rendimento e densidade do CO₂-SC, incluindo a equação da reta e o coeficiente de determinação R².



Fonte: a autora (2017).

Figura 20 – Valores preditos vs. observados e análise de resíduos para o estudo variando a densidade do CO₂-SC.



Fonte: a autora (2017).

5.4.4 Curvas de Extração

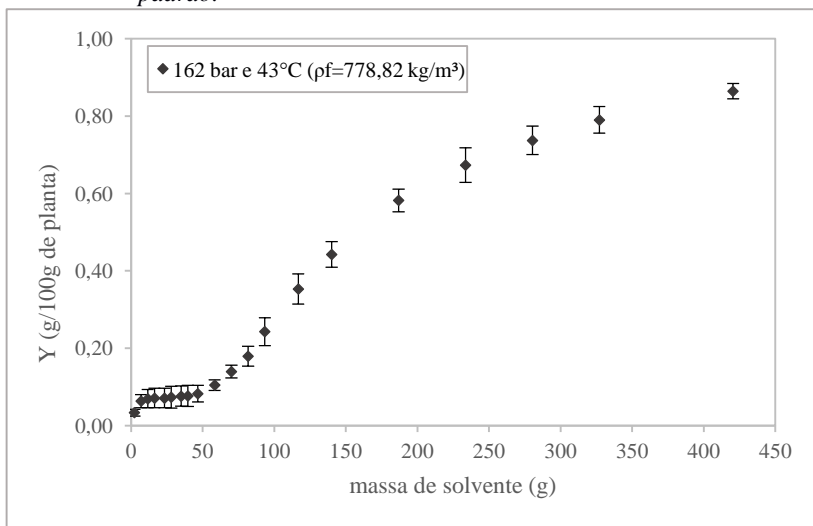
Foram realizados ensaios de dinâmica de extração para sete condições operacionais diferentes, conforme apresentado na Tabela 5 da seção 4.5.3. As curvas de extração em função da massa de CO₂-SC para as três primeiras condições são mostradas a seguir (Figuras 21-23).

A discussão será feita primeiramente em função da massa de solvente, pois, assim, a diferença dos parâmetros da curva devido à variação de densidade para cada condição já será contemplada. A forma das curvas é indiferente à escolha do tempo ou da massa do CO₂-SC como eixo horizontal, visto que a massa de solvente é uma função linear do tempo do processo para vazão de solvente constante. A massa de CO₂-SC é calculada com a fórmula:

$$m_f(\text{g}) = Q(\text{mL}/\text{min}) \cdot \rho_f(\text{kg}/\text{m}^3) \cdot t(\text{min}) \cdot 10^{-3} \quad (5)$$

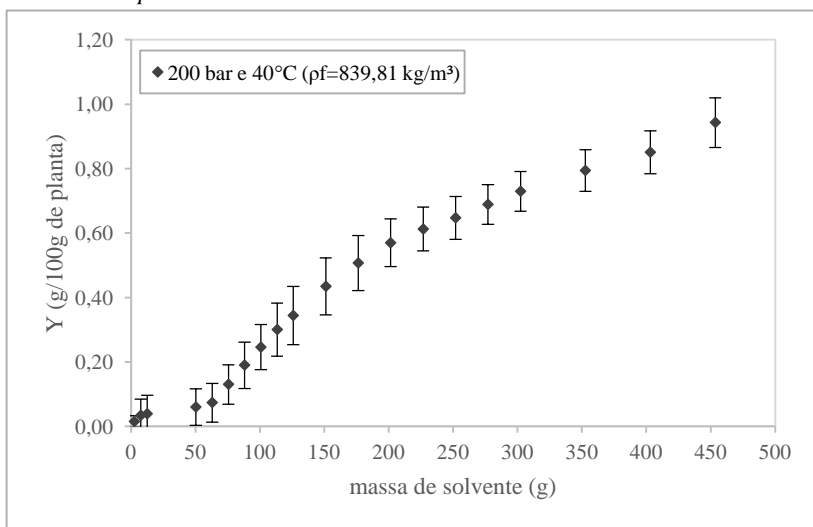
De forma global, o comportamento da dinâmica de extração das folhas de *E. involucrata* se mostrou atípico em relação à dinâmica comumente encontrada para a ESC de plantas, em que se tem as etapas de CER, FER e LER claramente demarcadas, como explicado na seção 3.5.4. No caso da cerejeira-do-mato, pode-se observar uma curva sigmoide na qual, em um primeiro momento, até aproximadamente 50 g de CO₂-SC, há uma taxa de extração extremamente baixa, como se correspondesse ao período LER, o qual se dá normalmente quando os compostos extraíveis começam a se esgotar e só restam aqueles de difícil acesso, com a difusão sendo o mecanismo dominante do processo.

Figura 21 – Curva de extração n°1. As barras de erro representam o desvio padrão.



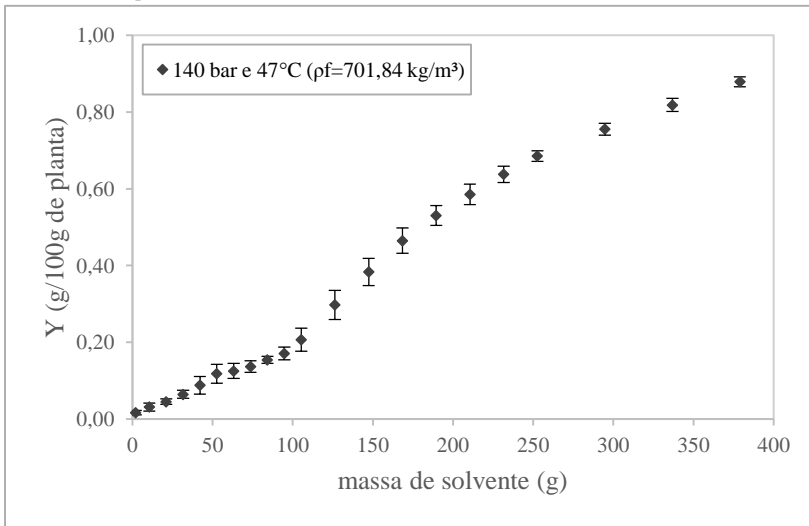
Fonte: a autora (2017).

Figura 22 – Curva de extração n°2. As barras de erro representam o desvio padrão.



Fonte: a autora (2017).

Figura 23 – Curva de extração nº3. As barras de erro representam o desvio padrão.



Fonte: a autora (2017).

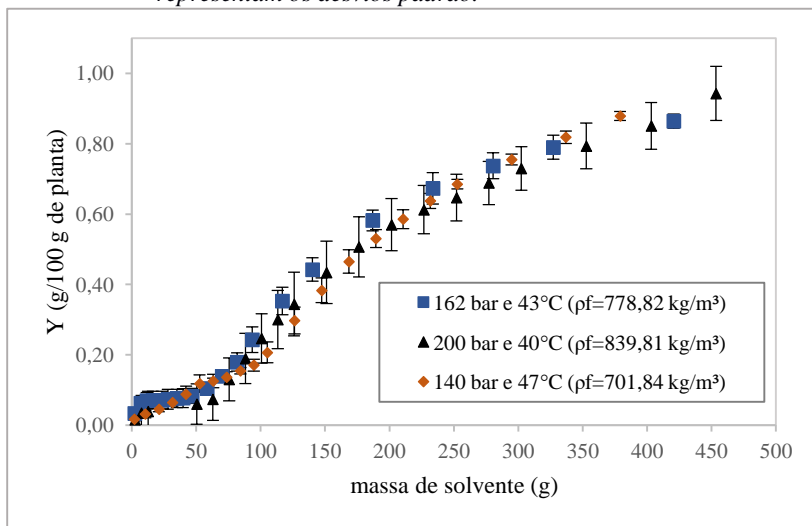
Após esse momento (massa de solvente > 50 g), o extrato começa a sair com mais facilidade para as dinâmicas 1 e 2, aumentando consideravelmente a taxa de extração, como pode ser observado nas Figuras 21 e 22. Para a dinâmica 3 (Figura 23), o comportamento parece ligeiramente diferente: até 50 g, observa-se também uma baixa taxa de extração, porém um pouco maior que as observadas para as dinâmicas 1 e 2, seguida por uma taxa ainda menor até cerca de 100 g de solvente, a partir da qual, finalmente, essa taxa cresce consideravelmente. No entanto, o gráfico comparativo das três curvas de extração com seus respectivos desvios padrão representados (Figura 24) sugere que não há diferença estatisticamente significativa entre elas, visto que os desvios se sobrepõem para praticamente todos os pontos das curvas.

Portanto, de um ponto de vista global para o comportamento das curvas de extração, algumas informações sobre os mecanismos de transferência de massa podem ser inferidas:

- o pré-tratamento da matéria-prima aparentemente não facilitou o acesso a uma certa fração do óleo vegetal tanto quanto para outras espécies estudadas na literatura, dada a ausência de um período CER na primeira parte da curva. Observa-se uma forte resistência nos primeiros 25 a 35 min de extração (50-100 g de solvente), em

que se mostra uma taxa de extração quase nula. Isso sugere que não há uma etapa inicial em que prevalece a convecção de soluto livre como mecanismo de TM;

Figura 24 – Gráfico comparativo das curvas de extração. As barras de erro representam os desvios padrão.



Fonte: a autora (2017).

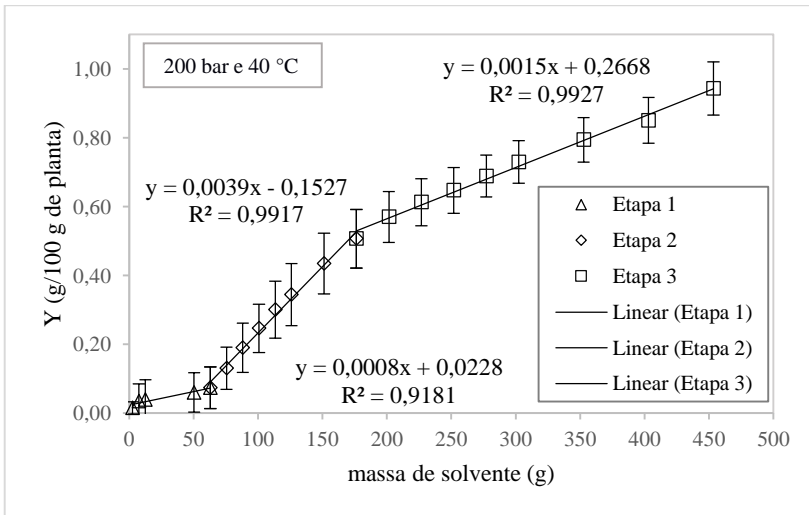
- b) para nenhuma das condições foi alcançado o que se consideraria o período LER característico do final das curvas de extração, em que se observa claramente um comportamento assintótico, isto é, um período de taxa de extração baixa e decrescente no qual o esgotamento de compostos extraíveis da matéria-prima se aproxima. Nesse caso, nota-se que existe uma tendência de o rendimento continuar crescendo a uma taxa mais ou menos constante mesmo após 180 min de processo, havendo ainda compostos extraíveis;
- c) de forma geral, pode-se dizer que três retas aproximadas se ajustam a essa curva, representando três estágios diferentes. A primeira delas corresponde a um período de baixa taxa de extração, em que se tem uma grande resistência à TM provavelmente em ambas as fases sólida e fluida; a segunda corresponde a um período de taxa de extração constante e elevada, em que há pouca resistência na fase sólida, porém ainda persistente na fase fluida devido à tendência linear, como explicado por Brunner (2005); e a terceira corresponde a uma taxa de extração intermediária e constante, em

que já se tem menos soluto disponível nas camadas mais externas das partículas, voltando a existir resistência na fase sólida, porém não tão forte como na primeira fase;

- d) provavelmente em nenhum momento se atingiu o equilíbrio termodinâmico (saturação) do solvente supercrítico, sendo todas as etapas governadas pelo mecanismo de difusão, tanto na fase sólida quanto na fase fluida. Sugere-se que há uma forte interação soluto-matriz.

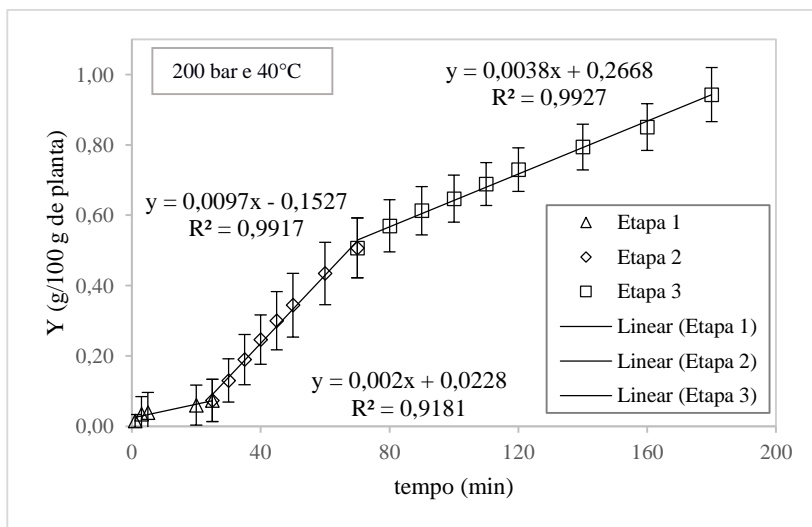
Uma demonstração do que foi explicado em (c) pode ser visualizada nas Figuras 25 e 26, em que fica claro o ajuste de três retas para as três diferentes etapas sugeridas, adotando tanto a massa de solvente quanto o tempo como eixo horizontal. As equações de cada reta são exibidas no próprio gráfico, juntamente com o seu coeficiente de determinação (R^2).

Figura 25 – Tendência linear de cada etapa da ESC das folhas de cerejeira-domato em função da massa de CO_2 -SC. Utiliza-se como exemplo a dinâmica n^o2.



Fonte: a autora (2017).

Figura 26 – Tendência linear de cada etapa de ESC das folhas de cerejeira-do-mato em função do tempo de extração. Utiliza-se como exemplo a dinâmica n^o2.



Fonte: a autora (2017).

A inclinação das retas, ou seja, seu coeficiente angular, corresponde à taxa de extração de cada etapa. Os outros parâmetros que se podem determinar para cada estágio de extração a partir desses gráficos são: tempo de duração, massa de solvente consumida e porcentagem de extrato acumulado obtida ao fim da etapa em relação ao total extraído. Nas Tabelas 17 a 19, encontram-se os parâmetros para as três curvas, determinados usando o mesmo artifício das Figuras 25 e 26, juntamente com a média e DP para cada etapa, chamadas a partir daqui de etapas 1, 2 e 3.

Ao se analisar cada condição de extração separadamente, pode-se destacar que a maior taxa de extração observada na etapa 2 foi para a condição de 200 bar e 40 °C (dinâmica 2), o que pode ser atribuído à sua maior densidade e, conseqüentemente, maior poder de solvente, seguida da dinâmica 1 e, por último, a dinâmica 3.

Com respeito às médias das três condições, a taxa de extração da etapa 2 foi 3,5 vezes maior que a etapa 1 e 2,6 vezes maior que a etapa 3, enquanto a etapa 3 foi 30% mais rápida que a etapa 1 (Tabela 17). Ao final da etapa 2, obteve-se de 54 a 67% do total extraído para cada condição, com média de 62,6% (Tabela 19), valor que corresponde ao que se espera de um período CER da curva de extração global padrão para o

processo ESC (50-90%). Isso significa que, para 45% do consumo total de $\text{CO}_2\text{-SC}$ e em pouco menos da metade do tempo total do processo (Tabela 18), obteve-se mais de 60% do total extraído nas condições empregadas.

Tabela 17 – Taxas de extração das etapas 1, 2 e 3 para as três dinâmicas, com as respectivas médias e DP de cada etapa em função da massa de $\text{CO}_2\text{-SC}$ e do tempo de extração.

Dinâmica	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3	
	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot (g_f)^{-1}$	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot (g_f)^{-1}$	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot (g_f)^{-1}$	$g_e \cdot (100 g_p)^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
1	0,0008	0,0020	0,0039	0,0091	0,0012	0,0028
2	0,0008	0,0020	0,0039	0,0097	0,0015	0,0038
3	0,0017	0,0036	0,0037	0,0078	0,0017	0,0036
Média	0,0011	0,0025	0,0038	0,0089	0,0015	0,0034
DP	0,0005	0,0009	0,0001	0,0010	0,0003	0,0005

g_e – grama de extrato; g_p – grama de planta; g_f – grama de $\text{CO}_2\text{-SC}$

Fonte: a autora (2017).

Tabela 18 – Massa de solvente consumida e tempo de duração de cada etapa para as três dinâmicas com suas respectivas médias e DP.

Dinâmica	Etapa 1		Etapa 2		Etapa 3	
	m_f (g)	duração (min)	m_f (g)	duração (min)	m_f (g)	duração (min)
1	58,41	25,00	128,51	55,00	233,65	100,00
2	62,99	25,00	113,37	45,00	277,14	110,00
3	94,75	45,00	115,80	55,00	168,44	80,00
Média	72,05	31,67	119,23	51,67	226,41	96,67
DP	19,79	11,55	8,13	5,77	54,71	15,28

m_f – massa de $\text{CO}_2\text{-SC}$

Fonte: a autora (2017).

Tabela 19 – Porcentagem de extrato acumulado ao final de cada etapa em relação ao total extraído nas condições aplicadas com suas respectivas médias e DP.

Dinâmica	Etapa 1 (%)	Etapa 2 (%)	Etapa 3 (%)
1	12,10	67,32	100,00
2	7,80	53,74	100,00
3	19,42	66,63	100,00
Média	13,11	62,56	100,00
DP	5,88	7,65	0,00

Fonte: a autora (2017).

Esse tipo de análise ao se estudar um processo de ESC é importante pois, para cada finalidade, são estabelecidas diferentes prioridades, e.g. duração do processo, consumo de solvente ou gasto energético. Se, por exemplo, com 70% do total extraível já se tem quantidade e qualidade (composição) suficientes para uma determinada aplicação, não há necessidade de se consumir o dobro de solvente ou gastar o dobro de tempo para se obter os outros 30%, sendo mais vantajoso reiniciar o processo com nova matéria-prima. No caso de se constatar que pressões e temperaturas mais elevadas não oferecem vantagens **significativas** para o processo, como foi o caso estudado em termos de rendimento, também não se faz necessário aumentar o consumo energético de bombas e fornos, fora o investimento em equipamentos mais resistentes.

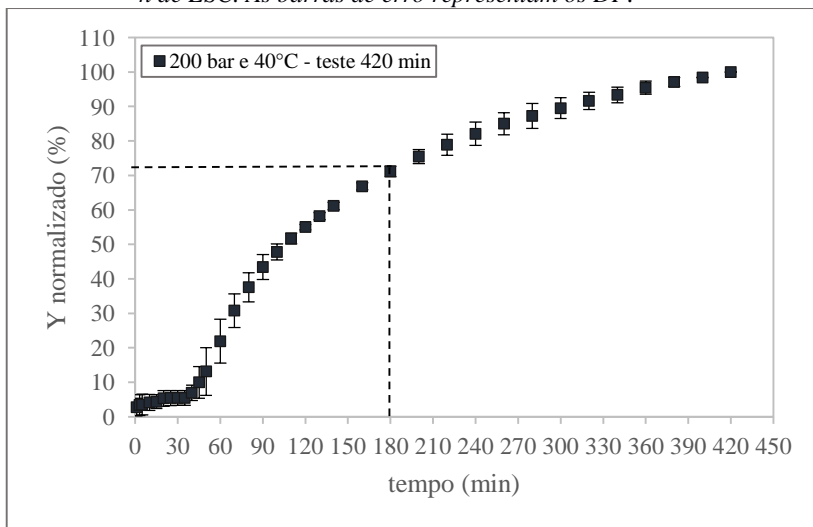
Testes Adicionais:

Após o estudo das curvas de extração para essas três condições, foram realizados alguns testes extras para se investigar as razões do comportamento tão diferente das curvas de extração das folhas de *E. involucrata* frente ao padrão esperado, tanto no início quanto no final delas. A condição de 200 bar e 40 °C foi selecionada por ser aquela de maior densidade dentre as estudadas e por ter mostrado resultados cromatográficos mais interessantes, como será mostrado na seção seguinte (5.4.5).

A ideia inicial foi de realizar extrações nessa condição até que se esgotasse completamente o soluto extraível; contudo, ao final de 7 h de processo ainda havia saída de extrato do equipamento, não se atingindo um patamar constante na curva de extração. Como o gasto de solvente é bastante elevado para tempos mais longos e o rendimento não aumenta expressivamente após as 3 h adotadas durante todo o trabalho, optou-se por realizar esse teste apenas mais uma vez a título de confirmação, com as mesmas 7 h de duração (420 min).

Os resultados são exibidos na Figura 27, sendo o eixo vertical o rendimento normalizado (%) em relação ao total extraído no experimento e o eixo horizontal, o tempo.

Figura 27 – Teste adicional de curva de extração com a condição de 200 bar e 40 °C e duração de 7 h, em duplicata. Destacam-se as primeiras 3 h de ESC. As barras de erro representam os DP.



Fonte: a autora (2017).

Até aqui, confirmou-se o comportamento observado para as primeiras 3 h de extração, com três etapas bem definidas, porém com a etapa 1 cerca de 10 min mais longa que o observado anteriormente. Isso pode ser atribuído ao fato de que houve um intervalo de aproximadamente 2 meses entre os primeiros ensaios e os testes adicionais, durante os quais a planta moída ficou armazenada, havendo possibilidade de degradação ou perda de compostos voláteis, além da própria heterogeneidade da amostra e condições climáticas diferentes nos dias de experimentos.

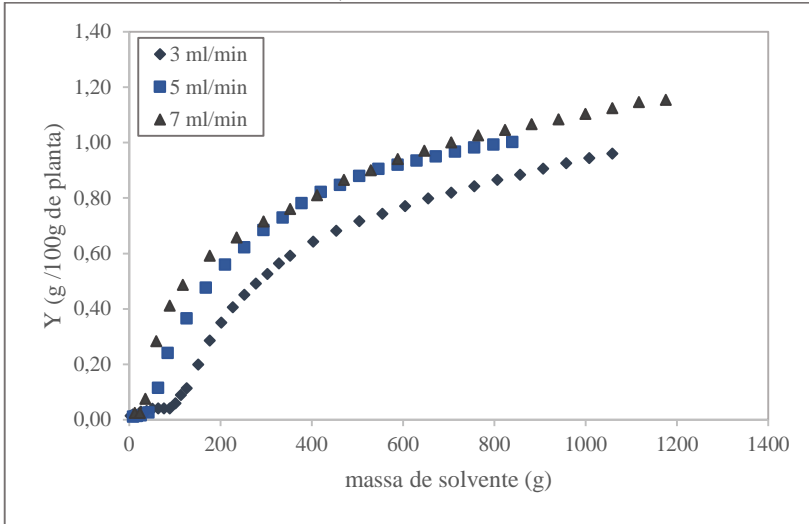
Após os 180 min iniciais, quando já havia sido extraído mais de 70% do total, a taxa da etapa 3 persiste mais alguns instantes e decresce ligeiramente aos 220 min, permanecendo constante até 380 min, quando se reduz mais uma vez, permanecendo a mesma até os 420 min. Essas observações reforçam a hipótese de que: (1) a planta em estudo possui uma forte interação soluto-matriz; (2) o mecanismo que domina todas as etapas da extração é a difusão; (3) não se alcançam condições de equilíbrio termodinâmico (saturação do solvente); e (4) a estrutura das folhas de cerejeira-do-mato oferece muita resistência à TM, bem como o CO₂-SC ao transporte dos compostos nela presente (fases sólida e fluida resistentes à TM).

Adicionalmente, para investigar se o tempo de contato entre CO₂-SC e matriz vegetal era um fator preponderante para o resultado observado no início das curvas (etapa 1, de baixíssima taxa de extração), procedeu-se mais um teste nas mesmas condições, porém introduzindo um **período estático** de 40 min; isto é, a partir do momento que o sistema atingiu 200 bar e 40 °C, aguardaram-se 40 min até a abertura da válvula *back-pressure*. A suposição era de que, ao se permitir um maior tempo de contato antes da extração dinâmica, o sistema se aproximaria da saturação e haveria uma maior saída de extrato imediatamente após a abertura da válvula, adiantando a etapa 1.

Todavia, apesar da aplicação do período estático, o comportamento se mostrou exatamente o mesmo da Figura 27, com aproximadamente 40 min de etapa 1. Dessa forma, pôde-se inferir que: (1) o problema não era de equilíbrio termodinâmico; (2) de fato, não parece haver soluto livre na superfície das partículas, o que impossibilita um período CER padrão; e (3) é possível que o fator realmente preponderante para o comportamento inicial da curva seja a velocidade do fluido, que afetaria o coeficiente de TM global e causaria maiores modificações na estrutura das partículas vegetais. Com essa última consideração, optou-se por realizar mais dois testes finais, nos quais se empregariam maiores vazões de solvente, de 5 e de 7 mL/min, por 200 min (3 h e 20 min).

Os resultados dos testes com maiores vazões são mostrados na Figura 28, sendo o eixo vertical o rendimento acumulado e o eixo horizontal a massa de CO₂-SC consumida, garantindo que a diferença entre as curvas não seja devida apenas à quantidade de solvente que passou pela amostra (o que poderia acontecer no caso de se analisar apenas o tempo como eixo horizontal) e sim a uma influência significativa do fator vazão de solvente ou velocidade do fluido. A curva de 3 mL/min é resultante do teste com 7 h de extração.

Figura 28 – Testes adicionais de curva de extração com a condição de 200 bar e 40 °C e vazões de 3, 5 e 7 mL/min.



Fonte: a autora (2017).

Os dois últimos testes, embora sejam apenas qualitativos por não haver repetições, revelam muito sobre os mecanismos que governam o transporte de matéria no processo de ESC da *E. involucrata*. Como explicado por Sovová (2005), para baixas velocidades intersticiais no leito, solventes supercríticos tendem à convecção natural devido a sua baixa viscosidade cinemática, o que afeta negativamente a capacidade de extração. É possível que a vazão de 3 mL/min resulte em uma velocidade intersticial insuficiente para evitar esse fenômeno, retardando o início do processo. A vazão de 5 mL/min foi capaz de reduzir o tempo da etapa 1 de 40 para 10 min, e a vazão de 7 mL/min, por sua vez, diminuiu ainda mais esse tempo para 5 min. À parte do adiantamento significativo da primeira etapa, o comportamento seguiu semelhante para todas as vazões testadas, mostrando um perfil dinâmico de características similares às descritas para as etapas 2 e 3 da ESC, não chegando a um patamar de taxa de extração nula em nenhum dos casos.

Embora mais testes sejam necessários para se confirmarem as hipóteses, todos os resultados levam a crer que: (1) a velocidade do fluido exerce um importante papel na força motriz local, diminuindo as resistências à TM inicial e, provavelmente, aumentando o coeficiente global de TM; (2) a difusão é o mecanismo dominante no processo de ESC da cerejeira-do-mato por todo o período de extração; e (3) não se alcançam

condições de equilíbrio termodinâmico, impossibilitando a determinação da solubilidade do extrato em CO₂-SC dentro da faixa operacional empregada.

5.4.5 Análises Cromatográficas

Os compostos majoritários encontrados nos extratos supercríticos de *E. involucrata* foram: β -elemeno (BE), biciclogermacreno (BG), cariofileno (CF), germacreno D (GD), vitamina E (VE) ou tocoferol e, em baixa proporção, D-limoneno (DL). Isso significa que os componentes mais abundantes do óleo essencial da cerejeira-do-mato (BE, BG, CF e GD) estão presentes nos seus extratos supercríticos sob diversas condições, todos com reconhecida atividade biológica, como mostrado na seção 3.3.2. Os resultados da composição química dos extratos originados do DCC são exibidos na Tabela 20.

Tabela 20 – Perfil químico dos óleos extraídos nas condições do DCC, mostrando a influência dos parâmetros operacionais na composição química dos extratos.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	BE	BG	GD	CF	DL	VE	Total (%)	NI (%)
1	98	35	39,73	23,32	7,57	5,65	1,15	-	77,43	22,57
2	182	35	45,72	20,54	8,56	8,85	-	-	83,67	16,33
3	98	45	35,99	23,20	6,33	5,03	1,51	15,20	87,25	12,75
4	182	45	41,82	23,19	7,61	7,36	-	9,76	89,74	10,26
5	140	40	16,14	9,41	2,88	2,54	0,53	7,77	39,26	60,74
6	140	40	22,54	13,29	4,25	3,38	-	8,13	51,58	48,42
7	140	40	18,36	11,38	3,10	2,74	0,59	7,42	43,59	56,41
8	140	40	19,28	11,96	3,51	3,18	0,70	8,40	47,03	52,97
9	140	40	20,22	12,86	3,48	3,26	0,64	8,12	48,57	51,43
10	80	40	-	-	-	-	-	-	-	-
11	140	47	40,50	26,28	7,66	7,58	1,33	-	83,34	16,66
12	200	40	41,78	28,40	7,37	6,69	1,60	-	85,84	14,16
13	140	33	28,34	18,89	4,78	4,25	1,34	21,95	79,55	20,45

BE – β -elemeno; BG – biciclogermacreno; GD – germacreno D; CF – cariofileno; DL – D-limoneno; VE – vitamina E; NI – não identificados.

Fonte: a autora (2017).

Os dados da Tabela 20 mostram que, embora exista uma diferença significativa na porcentagem de pelo menos um constituinte para cada condição, o perfil químico do óleo vegetal de *E. involucrata* não segue um padrão claro em função das variáveis estudadas, utilizando as metodologias descritas no presente trabalho. De qualquer maneira, os resulta-

dos trazem novas informações em relação a essa espécie nunca antes estudada com a ESC, como a presença de vitamina E no extrato de suas folhas, e podem ser analisados sob diversos aspectos.

Observando o resultado do ponto central (140 bar e 40 °C), pode-se dizer que existe uma repetibilidade razoável para esse processo no que diz respeito à composição química dos extratos, considerando que se trata de material biológico e que muitas variáveis podem perturbar o sistema. A metodologia do GC/MS pode ser considerada adequada para este caso. Na Tabela 21, são apresentados as médias e os desvios padrão para a composição do ponto central.

Tabela 21 – Médias e DP do teor de cada composto identificado para o ponto central do DCC.

Ensaio	P (bar)	T (°C)	BE	BG	GD	CF	DL	VE	Total (%)	NI (%)
5	140	40	16,14	9,41	2,88	2,54	0,53	7,77	39,26	60,74
6	140	40	22,54	13,29	4,25	3,38	-	8,13	51,58	48,42
7	140	40	18,36	11,38	3,10	2,74	0,59	7,42	43,59	56,41
8	140	40	19,28	11,96	3,51	3,18	0,70	8,40	47,03	52,97
9	140	40	20,22	12,86	3,48	3,26	0,64	8,12	48,57	51,43
Média	140	40	19,31	11,78	3,44	3,02	0,61	7,97	46,01	53,99
DP	140	40	2,36	1,52	0,52	0,36	0,07	0,38	4,74	4,74

BE – β -elemeno; BG – biciclogermacreno; GD – germacreno D; CF – cariofileno; DL – D-limoneno; VE – vitamina E; NI – não identificados.

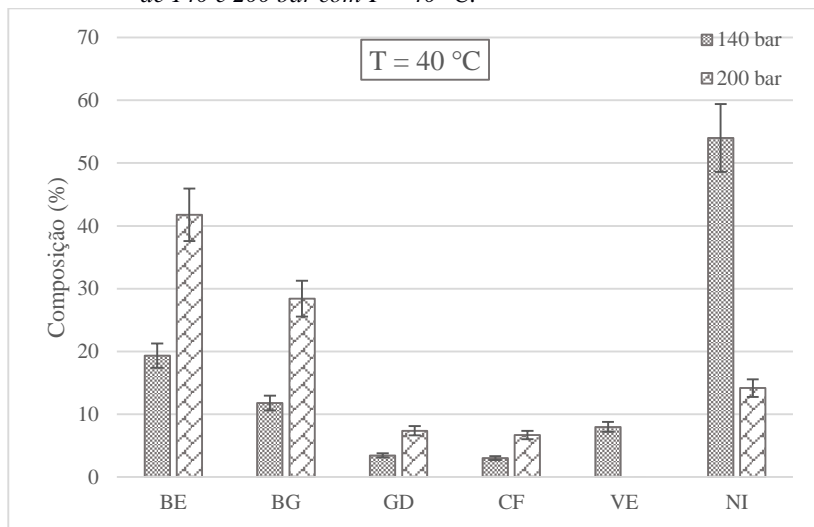
Fonte: a autora (2017).

Os valores dos desvios padrão representam de 5 a 15% das respectivas médias, para mais ou para menos, o que é um valor aceitável para o sistema investigado. Com isso, é plausível apoiar a discussão sobre a seletividade de cada condição estudada na ESC e das técnicas convencionais de extração nesses resultados. É importante ressaltar que a técnica de GC/MS limita-se à identificação dos compostos da fração mais volátil do extrato vegetal e, portanto, a composição fornecida é sempre em relação ao óleo volátil das folhas de *E. involucrata*. Será assumido, a partir de agora, o valor de 10% de desvio padrão para os outros pontos do DCC, estendendo a variabilidade do ponto central para todas essas condições do DCC que não foram feitas com repetições. Esse artifício foi adotado a fim de se evitar uma interpretação enviesada nos casos de valores pertencentes à mesma família de dados, i.e. insignificância estatística.

Os compostos tidos como não identificados (NI) normalmente correspondem à fração de compostos mais pesados ou de maior polaridade, como ceras e vitaminas, mas que ainda são detectáveis pela téc-

nica, visto que eles pertencem aos grupos de moléculas com maiores tempos de retenção no cromatograma. Isso dito, pode-se afirmar que a condição de 140 bar e 40 °C parece favorecer a extração de compostos mais pesados e/ou de maior momento dipolar resultante presentes no extrato da cerejeira-do-mato, sendo o teor de vitamina E considerável (quase 8%). Os teores de BE, BG, GD e CF são menores que os encontrados para o OE e para o extrato hexânico, ambos obtidos da mesma matéria-prima, o que significa que essa condição não é seletiva para os componentes de maior interesse no presente trabalho. Quando se compara o perfil cromatográfico para a mesma temperatura, variando a pressão de 140 para 200 bar, percebe-se que a seletividade para os sesquiterpenos do óleo volátil é consideravelmente aumentada, como mostra a Figura 29.

Figura 29 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas pressões de 140 e 200 bar com $T = 40\text{ °C}$.



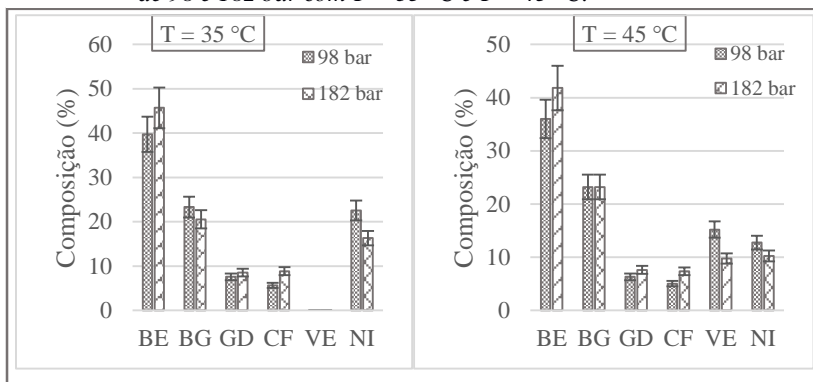
Fonte: a autora (2017).

Pela Figura 29, nota-se que o teor dos componentes voláteis BE, BG, GD e CF para a pressão de 200 bar é mais que o dobro daquele encontrado na condição de 140 bar; enquanto isso, a VE só foi detectada para a condição de 140 bar e o teor de compostos NI é cerca de 4 vezes maior para essa pressão. Isso pode significar que, para pressões mais elevadas, a uma determinada temperatura, tem-se uma maior solubilidade desses compostos no $\text{CO}_2\text{-SC}$, o que corrobora com os dados de solubilidade encontrados na literatura para a família dos terpenos (Figura 7, se-

ção 3.5.3). A solubilidade dos terpenos aumenta mais significativamente que aquela da fração cerosa.

O mesmo acontece para outras temperaturas na extração dos compostos BE, GD e VE (Figura 30), porém de maneira menos pronunciada, sendo os desvios padrão sobrepostos para a maioria dos componentes. Nas temperaturas de 35 °C e 45 °C, o aumento de pressão praticamente não alterou a proporção de BG.

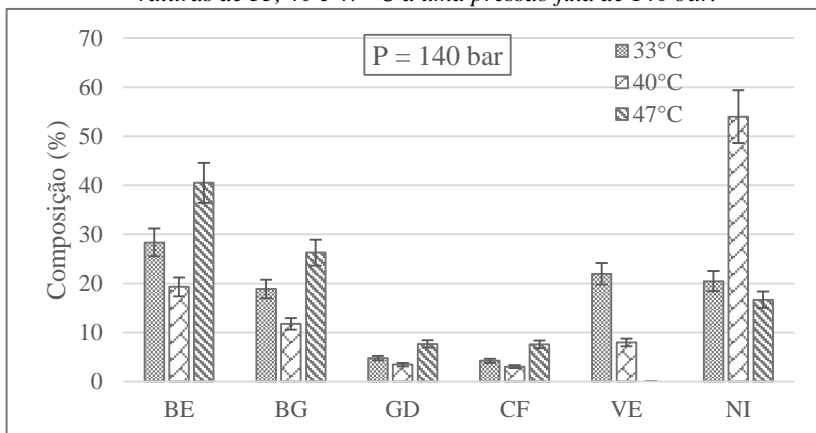
Figura 30 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas pressões de 98 e 182 bar com $T = 35\text{ °C}$ e $T = 45\text{ °C}$.



Fonte: a autora (2017).

Outra abordagem para a comparação dos dados obtidos é fixar uma pressão e avaliar a influência da temperatura nos teores de cada composto (Figura 31). A interpretação dos efeitos dos parâmetros operacionais da ESC não é uma tarefa fácil, visto que a maioria deles está relacionada entre si, com efeitos complementares ou antagônicos, o que se conclui após a leitura da seção 3.5.3. Por exemplo, para a Figura 31, dois efeitos poderiam ser esperados do aumento da temperatura a uma pressão fixa: (1) o aumento da temperatura diminui a densidade e, conseqüentemente, o poder de solvente do FSC, extraíndo menos compostos de maneira global; ou (2) o aumento da temperatura eleva a pressão de vapor dos componentes, facilitando a sua passagem para a fase fluida e, por conseguinte, sua extração. No entanto, o que parece ocorrer na Figura 31 é uma dominância alternada desses efeitos.

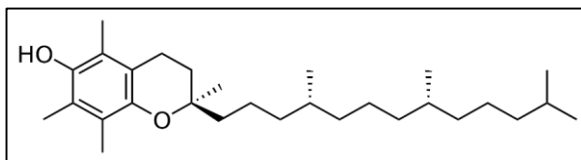
Figura 31 – Comparação dos perfis químicos dos extratos obtidos nas temperaturas de 33, 40 e 47 °C a uma pressão fixa de 140 bar.



Fonte: a autora (2017).

Em outras palavras, o que se pode interpretar da Figura 31 é: (1) para os compostos do óleo volátil e a vitamina E, de 33 para 40 °C, o efeito dominante parece ser da redução do poder de solvente, diminuindo a fração dos compostos majoritários; e (2) para o aumento tanto de 33 para 47 °C quanto de 40 para 47 °C, embora haja uma redução do poder de solvente devido à diminuição da densidade, o efeito do aumento da pressão de vapor dos constituintes mais voláteis (BE, BG, GD e CF) parece agora dominar, aumentando suas proporções na fração volátil do extrato, enquanto para a vitamina E (Figura 32), um composto de maior peso molecular e polaridade, o efeito parece ser o mesmo do caso (1).

Figura 32 – Estrutura molecular da vitamina E ($C_{29}H_{50}O_2$), um importante antioxidante lipossolúvel identificado em diversas amostras de extrato ESC.

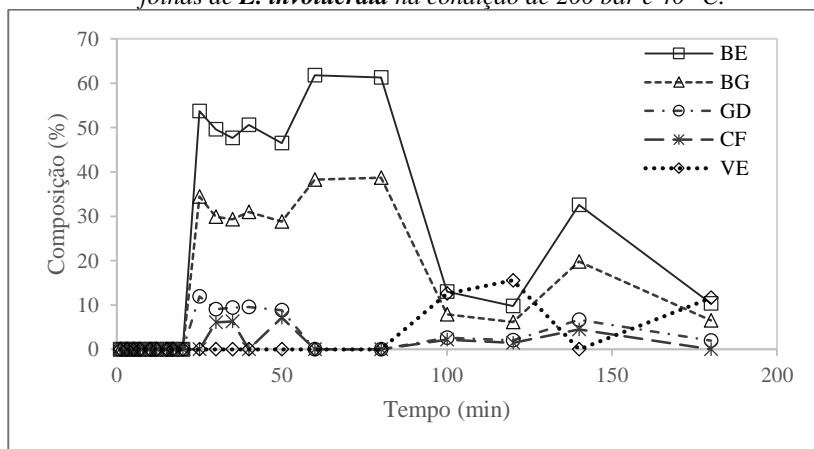


Fonte: a autora (2017).

Esse comportamento pode ser explicado termodinamicamente em virtude da natureza exponencial do crescimento da pressão de vapor com a temperatura, tanto para substâncias puras como para sistemas multi-componentes. Em uma função exponencial, quanto mais se avança no domínio da função, maiores são os impactos de pequenas variações da variável independente. Isto é, para o caso em discussão, para valores mais avançados no eixo da temperatura, mudanças pequenas nessa variável provocam grandes aumentos de pressão de vapor, sendo significativo a partir de certo ponto, o qual pode estar entre as temperaturas de 40 e 47 °C, causando essa maior seletividade para os componentes voláteis. Contudo, vale destacar que o comportamento global pode continuar sendo dominado pelo efeito do poder de solvente (maior densidade, maior rendimento global), enquanto para certos compostos individualmente o efeito do aumento da pressão de vapor pode prevalecer. Embora essa seja uma hipótese que demanda maiores investigações para ser verificada, ela pode explicar o fenômeno visualizado.

Além das comparações entre as diferentes condições, pode-se também avaliar o momento da extração no qual se obtém os compostos majoritários em maior abundância por meio da avaliação da dinâmica de ESC. Como explicado em seções anteriores, a condição de 200 bar e 40 °C foi escolhida para o estudo de sua curva de extração devido à qualidade do seu extrato, o qual contém um teor de compostos majoritários (BE + BG) de 70,18%, procedendo a análise em GC/MS das porções obtidas em cada instante. Na Figura 33, o perfil dinâmico da composição de BE, BG, GD, CF e VE é apresentado.

Figura 33 – Perfil dinâmico da composição química do extrato supercrítico das folhas de *E. involucrata* na condição de 200 bar e 40 °C.



Fonte: a autora (2017).

Pela Figura 33, pode-se constatar que, para essas condições: (1) os compostos BE e BG seguem o mesmo curso ao longo da dinâmica de extração, estando de alguma forma intimamente relacionados; a razão BE/BG é de cerca de 1,6 vezes em todos os instantes analisados; (2) GD e CF seguem um curso razoavelmente similar aos compostos majoritários BE e BG, porém sempre estão em menor proporção; (3) a vitamina E, provavelmente por pertencer à outra família de compostos, de maior massa molecular e maior polaridade, começa a ser detectada apenas após 80 min de ESC, seguindo um curso oposto aos sesquiterpenos majoritários (quando o teor deles aumenta, o dela diminui e vice-versa); (4) para os extratos dos instantes de 60 e 80 min, o cromatograma apresentou exclusivamente os picos de BE e BG, totalizando 100% da amostra (cerca de 62% BE e 38% BG), o que significa que houve uma altíssima seletividade para esses compostos especificamente entre 50 e 80 min; e (5) aparentemente os compostos majoritários são extraídos, principalmente, até os 80-100 min de processo, começando a apresentar sinais de esgotamento a partir desse momento, provavelmente dando lugar à extração de compostos menos voláteis, como a vitamina E.

Esses resultados sugerem que existe um momento específico do processo de ESC no qual as substâncias β -elemeno e biciclogermacreno, principais compostos encontrados para essa espécie neste trabalho, estão presentes em maior pureza. Esse fato, caso comprovado por meio de testes mais detalhados e com um número de repetições considerável, seria

uma grande descoberta no sentido de isolamento de tais compostos, dado que as etapas de separação e purificação seriam enormemente facilitadas. O interesse em um método de preparação da substância β -elemento já existe, como mencionado em 3.3.2 (CHEN e WU, 2002).

5.4.6 Atividade Antioxidante pelo Método β -caroteno/ácido linoleico

Este método resultou em atividade antioxidante de $93,82 \pm 1,35\%$ (Tabela 22) para os extratos das folhas de *E. involucrata* utilizando a técnica de ESC com CO_2 puro como solvente na condição de 182 bar e 45 °C, o que pode ser considerado um elevado potencial antioxidante. Esse resultado é bastante próximo daquele obtido para os extratos Soxhlet (99,34%). Todavia, os compostos responsáveis pela atividade antioxidante em cada um dos extratos não são necessariamente os mesmos, visto que eles são misturas complexas de compostos que podem apresentar interações sinérgicas ou antagônicas.

Tabela 22 – Resultados do teste de atividade antioxidante para o extrato ESC (182 bar e 45°C).

Tubo	AA (%)
1	94,38
2	94,80
3	92,28
Média	93,82
DP	1,35

Fonte: a autora (2017).

A alta atividade resultante pelo método β -caroteno/ácido linoleico pode ser em virtude da presença da vitamina E nos extratos supercríticos, a qual é um antioxidante natural de caráter lipofílico amplamente reconhecido na literatura. Além disso, o fato de essa metodologia utilizar uma emulsão como sistema reacional faz com que extratos de baixa polaridade tenham suas atividades antioxidantes reveladas com mais força, pois eles ficam concentrados na interface água/lipídeo, protegendo a emulsão e inibindo a oxidação do β -caroteno (MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

5.5 RESUMO DOS RESULTADOS: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS

Nesta seção, serão apresentadas as comparações dos resultados quantitativos e qualitativos obtidos para as três técnicas estudadas para a obtenção do extrato vegetal das folhas da cerejeira-do-mato. Na Tabela 23, encontra-se um resumo prático dos resultados e parâmetros mais relevantes dos três tipos de extração.

Tabela 23 – Comparação dos parâmetros e resultados mais relevantes das três técnicas avaliadas.

Técnica	Solvente	P (bar)	T (°C)	t (h)	Y _{máx} (g/100 g _p)	X _{máx} (%) (BE + BG)	AA (%)
Soxhlet	Hexano	P _{atm}	68,7	6	4,03	51,87	99,34
HD	Água	P _{atm}	100	6	0,37	65,37	6,41
ESC	CO ₂ -SC	80-200	33-47	3	1,17 ^a	70,18 ^b	93,8 ^c

^a Máximo obtido para a ESC: condição de 182 bar e 35 °C

^b Máximo obtido para a ESC: condição de 200 bar e 40 °C

^c Máximo obtido para a ESC: condição de 182 bar e 45 °C

g_p – gramas de planta.

Fonte: a autora (2017).

Quanto às propriedades organolépticas dos extratos, os três possuem cor, odor e textura diferenciados entre eles. O extrato hexânico é de aparência esverdeada e opaca, com odor de notas verdes marcantes, similar àquele de mato, e textura mais sólida. O óleo essencial é incolor, brilhoso, com odor desagradável e textura totalmente oleosa. Já os extratos ESC são de tom amarelado e brilhoso, com odor agradável, muito semelhante ao da planta *in natura*, e textura intermediária entre oleosa e sólida. A partir desses aspectos, já se pode ter a certeza de que o perfil químico resultante é particular de cada método empregado, visto que os aromas, cores e texturas são características atribuídas às moléculas que compõem os extratos.

Pode-se dizer que a tecnologia ESC resultou em boa seletividade dos compostos majoritários do óleo volátil de *E. involucrata* em comparação ao Soxhlet e à HD, alcançando até 70% de β-elemeno e biciclogermacreno, ou mesmo 100% durante um determinado período da sua dinâmica de extração, o que é de extremo interesse para possíveis etapas de isolamento desses compostos. Porém, de maneira geral, abrangendo todas as condições de ESC empregadas e o tempo total de extração, percebe-se que esse teor é muito parecido com aquele obtido para a hidrodestilação (65%), técnica que extrai apenas o óleo essencial da

matriz vegetal. Em contrapartida, além de conseguir extrair os componentes do OE em uma proporção similar à hidrodestilação, a ESC traz a vantagem de preservar os constituintes da planta devido à operação em menores temperaturas, resultando em um produto rico tanto em óleo essencial quanto em outros compostos bioativos de alto valor.

A ESC se mostrou bem mais seletiva que a extração Soxhlet com hexano, com uma diferença de quase 20% a mais no teor de BE+BG, além de também ter maior capacidade de prevenir a degradação dos componentes graças às menores temperaturas empregadas, e de não oferecer problemas de resquícios de solvente orgânico no produto obtido. Quanto à atividade biológica testada (potencial antioxidante), os extratos ESC demonstraram ser tão poderosos quanto os extratos hexânicos, ambos atingindo atividades superiores a 90%, frente à inatividade do óleo essencial obtido por HD. Quanto ao rendimento do processo, a ordem resultante foi Soxhlet > ESC > HD. A ESC traz como desvantagem em relação às técnicas convencionais o uso de altas pressões operacionais, o que eleva o custo energético e de compra de equipamentos.

Ao se ponderar todos esses aspectos, pode-se concluir que a ESC seria uma boa escolha para a produção de um extrato mais versátil em relação ao seu potencial de uso no mercado de cosméticos, farmácia ou mesmo na indústria alimentícia, visto que: (1) seu produto é livre de solventes orgânicos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente; (2) preserva as características originais dos componentes da planta; (3) provavelmente é capaz de desempenhar atividades biológicas equivalentes tanto ao óleo essencial obtido por HD quanto ao extrato hexânico, por possuir a mesma proporção de componentes majoritários do OE e quase o mesmo potencial antioxidante do extrato hexânico, combinando esses aspectos positivos. Dentre as atividades não testadas no presente trabalho que podem vir a se confirmar em futuros testes, destacam-se a atividade antitumoral (BE), citotóxica (BE, BG, GD, CF) e antimicrobiana (BG, GD e CF).

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a extração com CO₂ supercrítico das folhas de *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato) da Floresta com Araucárias do estado de Santa Catarina, empregando diferentes condições operacionais para conhecimento de seus efeitos na qualidade e quantidade do extrato obtido dessa espécie, bem como na dinâmica do processo. Comparou-se o desempenho dessa técnica de extração com dois métodos convencionais: Soxhlet com hexano e hidrodestilação. A comparação se deu em termos de rendimento mássico global, perfil químico determinado por GC/MS e atividade antioxidante determinada pelo método β -caroteno/ácido linoleico. Os testes possibilitaram as seguintes conclusões:

1) a condição considerada mais adequada para a ESC das folhas de cerejeira-do-mato em termos de rendimento global e composição química dos extratos é de 200 bar e 40 °C ($\rho_f = 839,81 \text{ kg/m}^3$). A temperatura não parece afetar significativamente o rendimento da ESC dentro da faixa estudada (33 a 47 °C), sendo a pressão, juntamente com a densidade, fatores preponderantes, de acordo com análise estatística do planejamento composto central em conjunto com estudos variando a densidade do CO₂-SC. O rendimento da extração das folhas de cerejeira-do-mato utilizando ESC parece crescer linearmente com a densidade do CO₂-SC;

2) as curvas de extração da ESC de cerejeira-do-mato apresentam um comportamento peculiar em relação às curvas encontradas na literatura, mostrando um atraso característico no início da dinâmica de extração a 3 mL/min, mesmo com a aplicação de período estático de 40 min. Resumidamente, isso sugere que: as resistências à transferência de massa tanto na fase sólida quanto na fluida são muito significativas para essa espécie; a difusão é o mecanismo dominante do transporte de matéria ao longo de toda a extração e condições de saturação não parecem ter sido atingidas em nenhum dos casos, mesmo nos testes com maiores vazões. O tempo de extração supercrítica de 3 h não é suficiente para atingir uma taxa de extração nula, característica do final das curvas de extração. No entanto, um tempo mais longo representa um gasto muito maior de CO₂-SC, que não se justifica por não resultar em rendimento significativamente superior, mesmo ao final de mais de 7 h de ESC;

3) os compostos majoritários dos extratos das folhas de cerejeira-do-mato da Floresta com Araucárias do estado de Santa Catarina, detectáveis por GC/MS, são o β -elemeno e o biciclogermacreno, ambos encontrados em maior quantidade para as três técnicas estudadas; em menor proporção, para todos os extratos, estão presentes também os compostos cariofileno e germacreno D. Todos esses componentes são

classificados como sesquiterpenos. O D-limoneno é encontrado em maior proporção para o extrato Soxhlet e em baixa porcentagem nos extratos supercríticos. O óleo essencial obtido por hidrodestilação, além dos compostos aqui mencionados, possui também α -selineno, β -selineno, humuleno e allo-aromadendreno. No extrato Soxhlet, também se detecta uma pequena quantidade de benzociclobuteno. Por último, a vitamina E está presente na maioria dos extratos obtidos sob diferentes condições de ESC;

4) a técnica convencional de Soxhlet utilizando hexano resulta em rendimento mássico global superior à extração supercrítica com CO₂ puro como solvente, que por sua vez resulta em rendimento maior que aquele obtido pela técnica de hidrodestilação, o que se explica pelo poder de solubilização global de cada solvente adotado. Com relação aos compostos majoritários β -elemeno e bicilogermacreno, a técnica de ESC se mostrou mais seletiva que o Soxhlet. Seus extratos a 200 bar e 40 °C são constituídos de aproximadamente 70% desses dois compostos, sendo cerca de 42% de β -elemeno e 28% de bicilogermacreno. O óleo essencial de *E. involucrata* possui uma proporção próxima a esse valor (65%), dividida entre 42% de β -elemeno e 23% de bicilogermacreno, sendo sua seletividade próxima àquela da ESC, em relação ao óleo volátil. Em um determinado momento da dinâmica de ESC (50-80 min), detecta-se exclusivamente BE e BG na fração volátil do extrato, o que significa elevada seletividade para esses compostos nesse período de extração;

5) os extratos de ESC e Soxhlet apresentam alto potencial antioxidante (superior a 90% para ambos) pelo método β -caroteno/ácido linoleico, enquanto o óleo essencial resulta em inatividade. A atividade antioxidante dos extratos supercríticos pode ser atribuída, em parte, à presença de vitamina E; porém, seria interessante realizar outras análises para a identificação de compostos fenólicos presentes nesse extrato, pois normalmente essa família de compostos é responsável pela atividade antioxidante de óleos vegetais. Não foi possível associar a alta atividade antioxidante a nenhum dos compostos encontrados nos extratos Soxhlet, sendo também necessárias análises que sejam capazes de identificar outras classes de compostos;

6) os resultados, de maneira geral, sugerem que essa espécie, nativa da Floresta com Araucárias do estado de Santa Catarina, se mostra interessante para aplicações cosméticas, pelo seu potencial antioxidante elevado, ou mesmo para aplicações farmacêuticas, com possível atividade antitumoral, antimicrobiana e/ou antifúngica. Esse fato pode se traduzir como uma contribuição valorosa ao projeto Araucária+, motivador da pesquisa aqui apresentada.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como última consideração, algumas sugestões que podem ser interessantes para a continuidade desse trabalho são:

1) fazer a modelagem das curvas de extração para a determinação de parâmetros que sejam capazes de explicar a fenomenologia do processo ESC para as folhas da cerejeira-do-mato;

2) realizar uma investigação mais detalhada da influência da vazão de solvente na dinâmica de extração das folhas dessa espécie para confirmar o mecanismo de transferência de massa dominante e também determinar a solubilidade do extrato no CO₂-SC;

3) adotar o uso de cossolvente para observar a mudança na composição, rendimento mássico global e atividade biológica do extrato ESC;

4) realizar análises cromatográficas com outras metodologias que permitam a identificação de compostos não voláteis, e.g. HPLC;

5) avaliar outras atividades biológicas que estão potencialmente associadas à composição química encontrada: antitumoral/citotóxica, antimicrobiana, entre outras;

6) obter microfotografias da estrutura das partículas da matriz vegetal antes e depois das extrações ESC para entender a dificuldade na transferência de massa para as folhas dessa espécie.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ANDRADE, M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 384–397, 2013.
- ANGÉLICO, E. C. et al. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. **BioFar**, v. 7, p. 57–61, 2012.
- 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, 2013.
- BAO, F.; QIU, J.; ZHANG, H. Potential role of β -elemene on histone H1 in the H22 ascites hepatoma cell line. **Molecular medicine reports**, v. 6, n. 1, p. 185–190, 2012.
- BOGDANOVIC, A. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds: Process optimization using response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 44–50, 2016.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.
- 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.

CAPELLO, T. M. et al. Composição química e avaliação do potencial citotóxico do óleo volátil das folhas de *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae). **Anais da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Natal-RN: Sociedade Brasileira de Química, 2014.

CHEN, Y.; WU, X. Y. β -elemene, method to prepare the same and uses thereof. **U.S. Patent 6464839**. 2002.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CZAIKOSKI, K. et al. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium intermedium* flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145–153, 2015.

DA-RÉ, M. et al. **Estratégia de valorização da Floresta com Araucárias**. Fundação CERTI. Florianópolis, 2012.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453–1461, 2011.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.

DE ZORDI, N. et al. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 491–498, 2014.

DEL VALLE, J. M. Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 180–199, 2015.

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 13–18, 2016.

DOMINGUES, R. M. A. et al. Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of *Eucalyptus globulus* bark: Influence of the operating conditions upon yields and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 176–185, 2012.

EDRIS, A. E. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. **Current clinical pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 43–6, 2009.

EMBRAPA. Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*). p. 23, 2007.

FALASCA, A. et al. GC-MS analysis of the essential oils of *Juniperus communis* L. berries growing wild in the Molise region: Seasonal variability and in vitro antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 69, p. 166–175, 2016.

FORNARI, T. et al. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 34–48, 2012.

FRANCESCATO, L. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichus* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 239–245, 2007.

GALHIANE, M. S. et al. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 286–292, 2006.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 2014.

GUO, H. Q. et al. β -elemene, a compound derived from *Rhizoma zedoariae*, reverses multidrug resistance mediated by the ABCB1 transporter. **Oncology Reports**, v. 31, n. 2, p. 858–866, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

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**, v. 71, p. 26–38, 2015.

HUANG, Z.; SHI, X.; JIANG, W. Theoretical models for supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2–26, 2012.

JELEŃ, H. H.; GRACKA, A. Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1418, p. 200–209, 2015.

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.

KANG, H. J. et al. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 9, 614-, 2006.

KEHILI, M. et al. Supercritical CO₂ extraction and antioxidant activity of lycopene and β -carotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) peels by-product of a Tunisian industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 340–349, 2017.

KNEZ, Ž. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 1–9, 2013.

LAGO, J. H. G. et al. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “campos de altitude” da mata atlântica paulista. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 727–730, 2008.

LI, G. et al. Downregulation of peroxiredoxin-1 by β -elemene enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma xenografts. **Oncology Reports**, v. 33, n. 3, p. 1427–1433, 2015.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009.

LI, L. et al. Cbl-regulated Akt and ERK signals are involved in β -elemene-induced cell apoptosis in lung cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1243–1246, 2011.

LI, Q. Q. et al. β -Elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis. **Oncology reports**, v. 22, p. 161–170, 2009.

LI, Q. Q. et al. β -Elemene enhances susceptibility to cisplatin in resistant ovarian carcinoma cells via downregulation of ERCC-1 and XIAP and inactivation of JNK. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 3, p. 721–728, 2013.

LIU, J. S. et al. Anticancer effects of β -elemene in gastric cancer cells and its potential underlying proteins: A proteomic study. **Oncology Reports**, v. 32, n. 6, p. 2635–2647, 2014.

LIU, S. et al. β -elemene enhances both radiosensitivity and chemosensitivity of glioblastoma cells through the inhibition of the ATM signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 34, n. 2, p. 943–951, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, 368 p., 2002.

LU, X. S. et al. β -elemene inhibits the proliferation of T24 bladder carcinoma cells through upregulation of the expression of Smad4. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 2, p. 513–518, 2013.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 1998.

MAIA, A. I. V et al. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia Brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584–586, 2010.

MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172–177, 2008.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998–1006, 2011.

MARTINS, P. F. et al. Supercritical fluid extraction of sterols from *Eichhornia crassipes* biomass using pure and modified carbon dioxide. Enhancement of stigmasterol yield and extract concentration. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 441–449, 2016.

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

MATSUBARA, A. et al. Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 969, p. 199–204, 2014.

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.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: Process design data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4–5, p. 321–330, 2003.

MUSHTAQ, M. et al. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 122–131, 2015.

NAZIRI, E. et al. Advantages of supercritical fluid extraction for recovery of squalene from wine lees. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 560–565, 2016.

NIST. LINSTROM P.J.; MALLARD W.G., Eds., **NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69**, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899.

OLIVEIRA, A. L. et al. Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 65–71, 2013.

OMS. Bulletin of the World Health Organization. **Regulatory situation of herbal medicines: A worldwide review**. Genebra, 1998.

ORGANIC MONITOR. Reportagem: "Cresce a busca por cosméticos naturais". **Mundo do Marketing**. Disponível em: <https://www.mundodomarketing.com.br/reportagens/mercado/33217/cresce-a-busca-por-cosmeticos-naturais.html>. Acesso em: 20/03/2017.

PAROUL, N. et al. Avaliação da composição química do óleo volátil de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC). **Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindoia-SP: 2007.

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.

PERIGO, C. V. et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 528–539, 2016.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237–243, 2001.

PILAVTEPE, M.; YESIL-CELIK TAS, O. Mathematical modeling and mass transfer considerations in supercritical fluid extraction of *Posidonia oceanica* residues. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 82, n. May 2010, p. 244–250, 2013.

QIN, S.-K. Synergistic effects of Endostar combined with β -elemene on malignant ascites in a mouse model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, n. 34, p. 277–284, 2012.

RAMOS, M. F. S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae. **Revista Fitos**, v. 2, n. 2, p. 58–66, 2006.

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

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 2006.

REVERCHON, E.; SESTI OSSEO, L.; GORGOGNONE, D. Supercritical CO₂ extraction of basil oil: Characterization of products and process modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 7, n. 3, p. 185–190, 1994.

RICHTER, E. A.; DEL VALLE, J. M.; NÚÑEZ, G. A. Thermodynamic properties of CO₂ during controlled decompression of supercritical extraction vessels. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 102–110, 2015.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 1–6, 2004.

SANTOS, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2012.

SANTOS, Ê. R. M. et al. Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 1–9, 2017.

SAUSEN, T. L. et al. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotanica**, v. 27, p. 145–158, 2009.

SIDOL. Sistema de Identificação Dendrológica Online. **Floresta Ombrófila Mista: *Eugenia involucrata***. Disponível em: <http://www.florestaombrofilamista.com.br/sidol/?menu=species>. Acesso em: 03/02/2017.

SILVEIRA, M. J.; HARTHMAN, V. C. Anatomia Foliar de *Eugenia involucrata* DC. e *E. bracteata* Vell. (Myrtaceae). **INSULA Revista de Botânica**, v. 39, n. 0, p. 47–58, 2010.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 1, p. 35–52, 2005.

SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 73–79, 2012.

SOVOVÁ, H.; SAJFRTOVA, M.; TOPIAR, M. Supercritical CO₂ extraction of volatile thymoquinone from *Monarda didyma* and *M. fistulosa* herbs. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 105, p. 2–7, 2015.

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**. New York, NY: Wiley-Interscience, 1996.

Thomas, P. *Araucaria angustifolia*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**: e.T32975A2829141. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T32975A2829141.en> Acesso em: 23/07/2016.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VIBRANS, A. C. et al. **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, vol. III: Floresta Ombrófila Mista**. Blumenau: Edifurb, 2013.

YANG, L. β -elemene acts as an antitumor factor and downregulates the expression of survivin, Bcl-xL and Mta-1. **Molecular Medicine Reports**, n. 9, p. 989–995, 2012.

YAO, C. C. et al. β -elemene reverses the drug resistance of lung cancer A549/DDP cells via the mitochondrial apoptosis pathway. **Oncology Reports**, v. 31, n. 5, p. 2131–2138, 2014.

ZHANG, F. et al. Synergistic antitumor effect of β -elemene and etoposide is mediated via induction of cell apoptosis and cell cycle arrest in non-small cell lung carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1189–1193, 2011.

ZHANG, H. et al. β -elemene induces glioma cell apoptosis by downregulating survivin and its interaction with hepatitis B X-interacting protein. **Oncology Reports**, v. 28, n. 6, p. 2083–2090, 2012.

ZHAO, J. et al. *In vitro* combination characterization of the new anticancer plant drug β -elemene with taxanes against human lung carcinoma. **International journal of oncology**, v. 31, n. 2, p. 241–52, 2007.

ZHAO, S.; ZHANG, D. Supercritical CO₂ extraction of *Eucalyptus* leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods. **Separation and Purification Technology**, v. 133, p. 443–451, 2014.

ZHU, T. et al. β -Elemene Inhibits Proliferation of Human Glioblastoma Cells Through the Activation of Glia Maturation Factor β and Induces Sensitization To Cisplatin. **Oncology Reports**, v. 26, n. 2, p. 405–413, 2011.

ZHU, T. Z. et al. β -Elemene Inhibits Proliferation Through Crosstalk Between Glia Maturation Factor β and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Impairs Drug Resistance To Temozolomide in Glioblastoma Cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 2, p. 1122–1128, 2014a.

ZHU, T. Z. et al. β -Elemene Inhibits Stemness, Promotes Differentiation and Impairs Chemoresistance To Temozolomide in Glioblastoma Stem-Like Cells. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 2, p. 699–709, 2014b.

ZIBETTI, A. W. **Desenvolvimento de um processo de separação de compostos bioativos de *Rosmarinus officinalis***. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.