

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE
***CASEARIA SYLVESTRIS* E ENCAPSULAMENTO EM**
BIOPOLÍMERO UTILIZANDO A TECNOLOGIA
SUPERCRÍTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra R. S. Ferreira

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rozangela C. Pedrosa

PATRÍCIA BENELLI

Engenheira de Alimentos (UNISINOS 2005/2)

Mestre em Engenharia de Alimentos (UFSC/2010)

Florianópolis – SC
2014

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

Benelli, Patrícia

Obtenção de extratos bioativos de folhas de *Casearia sylvestris* e encapsulamento em biopolímero utilizando a tecnologia supercrítica / Patrícia Benelli ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira ; coorientadora, Rozangela Curi Pedrosa. - Florianópolis, SC, 2014.

327 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração supercrítica. 3. Atividade biológica. 4. Equilíbrio de fases. 5. Encapsulamento. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Pedrosa, Rozangela Curi. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“OBTENÇÃO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE
FOLHAS DE *Casearia Sylvestris* E
ENCAPSULAMENTO EM BIOPOLÍMERO
UTILIZANDO A TECNOLOGIA
SUPERCRÍTICA”**

Por

Patrícia Benelli

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, Área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira
Orientadora



Profa. Dra. Rozângela Curi Pedrosa
Coorientadora

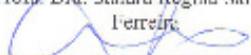


Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Sandra Regina Salvador
Ferreira



Prof. Dr. Jacir Dal Magro



Dra. Natália Mezzomo



Profa. Dra. Vera Maria Rodrigues



Prof. Dr. Hálko Hense

Florianópolis, 2 de outubro de 2014.

À minha família, por todo o amor,
dedicação e incentivo...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, guiar os meus passos e me dar forças ao longo do caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira, pela orientação, amizade, paciência, ideias e incentivo que muito contribuíram para a realização deste trabalho. À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Rozangela C. Pedrosa, pelas importantes contribuições, ajuda e disponibilidade.

Ao PGEAL/UFSC, pela oportunidade de cursar o mestrado e doutorado, e aos professores do PGEAL pelos importantes ensinamentos acadêmicos. Em especial, aos professores do LATESC pelas orientações técnicas e sugestões.

Aos professores Dr. Carlos A. S. Riehl (UFRJ) e Dr. José Vladimir de Oliveira (UFSC) pelas gentis colaborações neste trabalho.

À relatora desta tese, Prof^a. Dra. Vera M. Rodrigues (UPF), pela disponibilidade e aos membros da banca examinadora pelas importantes contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À BRAZNUTRI Alimentos Ltda. pelo fornecimento da matéria-prima.

Aos meus colegas do LATESC, pela troca de experiências, ajuda, companheirismo e momentos de descontração. Em especial às Latesquianas, pela companhia, convivência, paciência no dia-a-dia e por fazerem de nosso laboratório uma pequena família.

À Sibelinha, pela ajuda para desvendar os mistérios do equilíbrio de fases.

Às amigas que carregam no coração Dani, Nati, Marta, Ana e Kátia pela grande companhia dentro e fora do laboratório e por me oferecerem a sua amizade e aceitarem a minha verdadeiramente.

À minha aluna de iniciação científica Laura Tenfen e à *jovem talento para ciência* Evelin C. Azevedo, pela dedicação fundamental para a realização da parte prática deste trabalho.

Às queridas alunas do LABIOEX, Nádia C. F. Bucker, Mirelle S. Farias e Valdelúcia Grinevicius pela ajuda nos experimentos *in vivo*.

Ao PROFI, LCME, LAMEB e LABCAL pela atenção dos alunos e funcionários na realização das análises.

À minha família, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais dados durante toda a vida, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Rodrigo, pelo carinho e paciência nos momentos em que estive ausente.

Aos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho, mesmo sem saber direito sobre o que se tratava.

A todos a minha eterna e sincera gratidão.

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

- Albert Einstein -

RESUMO

Casearia sylvestris, também conhecida como guaçatonga, é uma planta medicinal nativa do Brasil, Peru, Argentina, Uruguai e Bolívia. Na medicina popular suas folhas são utilizadas como anestésico tópico, antisséptico, agente antitumoral, antiulcerativo e cicatrizante. Nos extratos de *Casearia* existem substâncias de grande interesse como cumarinas, flavonóides e diterpenos, especialmente diterpenos clerodânicos como as casearinas e casearvestrinas, as quais são compostos bioativos que apresentam excelente potencial citotóxico e antitumoral. A extração supercrítica (ESC) possui aplicações em uma grande variedade de processos, devido à possibilidade de serem obtidos extratos livres de solventes e ao uso de baixas temperaturas de extração, além de ser um processo seletivo na obtenção de compostos bioativos. Considerando a importância dos componentes bioativos, o conhecimento do equilíbrio de fases de extratos naturais em meio supercrítico é fundamental para a determinação das condições ótimas para processos de separação, precipitação e encapsulamento realizados em altas pressões. Assim, o objetivo do presente trabalho foi obter extratos de *C. sylvestris* empregando a extração supercrítica (ESC), com CO₂ puro e com cossolvente, e as técnicas à baixa pressão Soxhlet (SOX) e maceração (MAC) com diferentes solventes orgânicos, com a finalidade de comparar os rendimentos dos diferentes processos, a composição química e atividade biológica dos extratos. As extrações à baixa pressão foram realizadas com hexano (HX), diclorometano (DCM), acetato de etila (ETOAC), etanol (ETOH) e clorofórmio (CLF). Além disso, também foi estudado o comportamento do equilíbrio de fases de sistemas compostos por extratos de *C. sylvestris*, solvente orgânico, polímero e CO₂ supercrítico para a aplicação processos de precipitação/encapsulamento pela técnica antissolvente supercrítico (SAS). Os extratos de ESC de *C. sylvestris* foram obtidos em pressões de 100 a 300 bar, temperaturas de 40 °C a 60 °C com fluxo de CO₂ de 8 ± 2 g/min, durante 3,5 h. Os rendimentos de ESC alcançaram valores de até 5,8 ± 0,6 % (m/m) para extração com CO₂ puro e 8,2 ± 0,1 % (m/m) quando foi adicionado 8 % de etanol como cossolvente na condição de

extração a 200 bar/50 °C. As extrações a baixa pressão com melhor rendimento foram SOX com ETOH e ETOAC, alcançando rendimentos de 23 ± 1 % (m/m) e 8 ± 1 % (m/m), respectivamente. Além do rendimento de extração, as técnicas foram também comparadas pelo teor de fenólicos total (TFT), apresentando valores máximos de $169,4 \pm 0,6$ mg EAG/g (SOX-ETOH) e 135 ± 4 mg EAG/g (MAC-ETOH). Pelo método DPPH, o potencial antioxidante obtido apresentou valores de concentração efetiva a 50 % (CE_{50}) de 245 ± 4 µg/mL (ESC 300 bar/50 °C + 8 % ETOH) e $239,7 \pm 0,3$ µg/mL (MAC- ETOAC), enquanto que os melhores valores obtidos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico foram de 110 ± 1 % para o extrato de ESC a 200 bar/50 °C + 2 % ETOAC e 111 ± 3 %, para SOX-ETOAC após 120 minutos de reação. Para o método ABTS, os melhores resultados foram obtidos para SOX-ETOH (573 ± 7 µM ET/g) e MAC-ETOH (442 ± 4 µM ET/g). Nos ensaios *in vivo*, os extratos ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC e ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH apresentaram as melhores reduções de ganho de peso. A maior redução dos níveis de colesterol foi obtida para as condições SOX-ETOH e SOX-ETOAC e para a redução dos triglicerídios foi obtida para SOX-ETOAC e também para ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH. A redução dos níveis de glicose apresentou os melhores resultados para as condições de ESC 300 bar/50 °C e 300 bar/50 °C + 5 % ETOH. No perfil químico dos extratos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), foram identificados compostos terpênicos importantes como (-)-espatulenol, (+)-espatulenol, fitol, α -cariofileno/ α -humuleno, β -cariofileno; β -sitosterol, γ -elemeno e vitamina E. A determinação do equilíbrio de fases de sistemas contendo extratos de *C. sylvestris* foi de fundamental importância para a obtenção das condições de temperatura e pressão para o processo de precipitação SAS aplicadas nesse trabalho. Em todas as condições aplicadas, foram obtidas partículas encapsuladas (extrato de *C. sylvestris* + Pluronic F127) com estimativa de tamanho na faixa micrométrica, variando de 102 ± 8 µm a 697 ± 230 µm, exceto para a condição de precipitação a 80 bar e 45 °C, onde foi obtido apenas uma mistura de compostos segregados.

ABSTRACT

Casearia sylvestris, also known as *guaçatonga*, is a native medicinal plant in Brazil, Peru, Argentina, Uruguay and Bolivia. The leaves of the plant are popularly used in folk medicine as topical anaesthetic, antiseptic, antitumor and antiulcer agents, and to heal skin wound diseases. In the *Casearia* extracts there are substances of great interest, such as coumarins, flavonoids and diterpenes, especially clerodane diterpenes as casearins and casearvestrins, which are bioactive with excellent cytotoxic and antitumor potential. Supercritical fluid extraction (SFE) is an alternative process to conventional extractions in various applications due to the possibility to obtain solvent-free extracts and the use of low extraction temperatures, warranting the process selectivity towards the bioactive compounds. Considering the importance of these compounds the knowledge of the phase equilibrium of natural extracts in supercritical fluids, obtained by experimental measurements, is fundamental for determination of optimal conditions for separation and precipitation processes conducted at higher pressures. In this way, this study aimed to obtain *C. sylvestris* extract using the supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO₂ and with co-solvent, in order to compare with extracts obtained from low pressure techniques Soxhlet (SOX) and maceration (MAC), with different organic solvents, in terms of yield process, composition and biological activity of the extracts. Low pressure extractions were performed with hexane (HX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (ETOAC), ethanol (ETOH) and chloroform (CLF). Also, the investigation of the phase equilibrium behavior of systems composed by *C. sylvestris* extract, organic solvent, polymer and supercritical CO₂ was held by means of the static method to afford information for the separation and precipitation/encapsulation processes by the supercritical anti-solvent (SAS) technique. The SFE extracts from *C. sylvestris* were obtained at pressures from 100 to 300 bar, temperatures of 40 °C to 60 °C with CO₂ flow rate of 8 ± 2 g/min during 3.5 h. The SFE yields reached values up to 5.8 ± 0.6 % (w/w) for extraction with pure CO₂ and 8.2 ± 0.1 % (w/w) when 8 % of ethanol as co-solvent was added to the extraction at 200 bar/50 °C. SOX

extractions with ETOH and ETOAC obtained yields of 23 ± 1 % (w/w) and 8 ± 1 % (w/w), respectively. Also, the techniques efficiency was compared in terms of antioxidant capacity, evaluated by total phenolic content (TPC), presenting maximum values of 169.4 ± 0.6 mg GAE/g (SOX-ETOH) and 135 ± 4 mg GAE/g (MAC-ETOH). The antioxidant potential by DPPH assay resulted in effective concentration at 50 % (EC₅₀) values of 245 ± 4 µg/mL (SFE 300 bar/50 °C + 8 % ETOH) and $239,7 \pm 0,3$ µg/mL (MAC- ETOAC), while the best values obtained by β-carotene bleaching method were 110 ± 1 % obtained at 200 bar/50 °C + 2 % ETOAC extract and 111 ± 3 % obtained by SOX-ETOAC after 120 minutes-reaction. The antioxidant evaluation by ABTS method the best results were presented by SOX-ETOH (573 ± 7 µM TE/g) and MAC-ETOH (442 ± 4 µM TE/g). In the *in vivo* experiments, the SFE extracts obtained at 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC and ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH presented the higher weight gain reductions. The higher reduction in the cholesterol levels were achieved at SOX-ETOH and SOX-ETOAC and for triglycerides reduction were obtained at SOX-ETOAC and SFE 300 bar/50 °C + 5 % ETOH. The glucose reduction presented the best results for SFE 300 bar/50 °C e 300 bar/50 °C + 5 % ETOH conditions. The achievement of the extracts chemical profile by gas chromatography coupled to mass spectrometry analysis (GC-MS), were identified important terpenes as (-)-spathulenol, (+)-spathulenol, phytol, α-caryophyllene/α-humulene, β-caryophyllene; β-sitosterol, γ-elemene and vitamin E. The investigation of the phase equilibrium behavior of systems composed by *C. sylvestris* extract was fundamental for the obtention of process temperature and pressure conditions for the SAS precipitation technique applied in this research. At all conditions performed, co-precipitated particles (*C. sylvestris* extract + Pluronic F127) were achieved with particle estimated size in the micrometric range, varying from 102 ± 8 µm to 697 ± 230 µm, except for the condition of precipitation at 80 bar and 45 °C, in which was only obtained a mixture of segregated compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- % AA: Percentual de atividade antioxidante
- σ : Desvio padrão
- μM : Micromol
- $\cdot\text{OH}$: Radical hidroxil
- A2780: Células tumorais de ovário humano
- A-549: Células tumorais de pulmão humano
- Abs*: Absorbância
- ABTS: 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- ADP: Adenosina difosfato
- ANOVA: Análise de variância
- AOAC: *Association of Analytical Communities* ou *Association of Official Analytical Chemists* - Associação das Comunidades Analíticas ou Associação Oficial dos Químicos Analíticos
- ASE: *Accelerated solvent extraction* - Extração acelerada com solvente
- ASES: *Aerosol solvent extraction system* - Sistema de extração de solvente em aerossol
- ATP: Adenosina trifosfato
- AVC: Acidente vascular cerebral
- BHA: Butil-hidroxianisol
- BHT: Butil-hidroxitolueno
- Ca*: Concentração
- CAS: *Chemical Abstract Service* - Serviço de Indexação Química
- CD₅₀: Dose citotóxica
- Ce*: Concentração de extrato ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
- CE₅₀: Concentração efetiva
- CE₅₀: Concentração efetiva a 50 %
- CER: *Constant extraction rate* - Etapa de taxa constante de extração
- CET: Colesterol esterase
- CEUA: Comissão de ética no uso de animais
- CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CLF: Clorofórmio
- CMI: Concentração mínima inibitória
- CO₂: Dióxido de carbono
- COD: Colesterol oxidase
- CS: Cossolvente
- DCM: Diclorometano
- DCP: *Diffusion-controlled period* - Etapa difusional ou etapa de taxa nula de extração
- D_{ext}*: Diluição das amostras
- d_i*: Diâmetro da peneira *i*
- DMDP \cdot^+ : Radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucleico

- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazina
- d_s : Diâmetro médio superficial das partículas
- DSC: *Differential scanning calorimetry* - Calorimetria diferencial de varredura
- E: Equilíbrio
- EAG: Equivalentes de ácido gálico
- EC_{50} : *Effective concentration* - Concentração efetiva
- ELL: Equilíbrio líquido-líquido
- ELLV: Equilíbrio líquido-líquido-vapor
- ELV: Equilíbrio líquido-vapor
- EROS: Espécies reativas de oxigênio
- ESC: Extração supercrítica
- ESLL: Equilíbrio sólido-líquido-líquido
- ESLLV: Equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor
- ESLV: Equilíbrio sólido-líquido-vapor
- ET: Equivalente ao Trolox
- ET: Equivalentes de Trolox
- ETOAC: Acetato de etila
- ETOH: Etanol
- F: Fluido
- F : Valor F
- FDA: *Food and Drug Administration* - Agência de Alimentos e Medicamentos
- FER: *Falling extraction rate* - Etapa de taxa decrescente de extração
- G-3FO: Glicerol-3-fosfato oxidase
- GAE: *Gallic acid equivalent* - Equivalente de ácido gálico
- GAS: Gas antisolvent - Gás antissolvente
- GCQ: Glicerolquinase
- GL: Graus de liberdade
- GOD: Glicose oxidase
- GP: Galato de propila
- GRAS: *Generally recognized as safe* - *Geralmente reconhecida como segura*
- H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
- HCT-116, HCT-8, HT-29: Células tumorais de cólon humano
- HDL: *High density lipoprotein* - Colesterol de alta densidade
- HeLa: Células de tumor cervical humano
- HL-60, HL-60, K-562, CEM, MOLT-4: Células tumorais de leucemia
- HX: Hexano
- IC₅₀: Atividade citotóxica em células humanas normais
- IDF: Fibra dietética insolúvel
- IGDE: Isobutil galato-3,5-dimetil éter
- KB: Células de carcinoma epidermico oral humano
- L: Líquido
- L-929, V-79: Células de fibroblastos normais de camundongos
- LCEP: *Lower critical end point* - Ponto de menor pressão e

temperatura	PB: Ponto de bolha
LDL: <i>Low density lipoprotein</i> - Colesterol de baixa densidade	P _c : Pressão crítica
LIP: Lipoproteína lipase	PC-3: Célula tumoral de próstata
m/m: Massa/massa	PCA: <i>Precipitation with a compressed antisolvent</i> - Preci- pitação com antissolvente com- primido
M: Massa total de amostra	PCL: Policaprolactona
MAC: Maceração	PEG: Polietilenoglicol
MAE: <i>Microwave assisted extraction</i> - Extração assistida por micro-ondas	PEO-PPO-PEO: Poli(oxietileno)- poli(oxipropileno)-poli(oxietile- no)
m _c : Massa final de cinzas	PFE: <i>Pressurized fluid Extraction</i> - Extração por fluido pressurizado
MCER: Taxa de extração na etapa CER	PGSS: <i>Particles from gas saturated solutions</i> - Partículas a partir de soluções saturadas de gás
MDA/MB-435: Células de mela- noma	PHA: Poli-hidroxiclcanoato
MEV: Microscopia eletrônica de varredura	PHB: Poli-hidroxitirato
m _{EXT} : Massa de extrato	PHBV: Poli-(hidroxitirato-co- valerato)
M _{Extrato} : Massa de extrato	PLA: Ácido polilático
m _f : Massa final de amostra	PLA ₂ : Fosfolipases A ₂
m _i : Massa inicial de amostra ou massa de amostra retida na peneira <i>i</i>	PLE: <i>Pressure liquid extraction</i> - Extração com líquidos pressuri- zados
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil- tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio	PLGA: Poli(lactídico-co-glicolídico)
<i>n</i> : Número total de frações	PO: Ponto de orvalho
NIST: <i>National Institute of Standards and Technology</i> - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia	POD: Peroxidase
nm: Nanômetro	PVA: Álcool polivinílico
NO: Óxido nítrico	<i>P-w</i> : Pressão-composição
O ₂ : Oxigênio	<i>Q_{CO2}</i> : Vazão de solvente
O ₂ ^{·-} : Radical superóxido	RENAFITO: Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
<i>p</i> : Nível de significância	RENISUS: Relação Nacional de
P: Pressão	

Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

RESS: *Rapid expansion of supercritical solutions* - Rápida expansão de soluções supercríticas

ROO:: Radical alquilperóxil

S: Sólido

SAS: *Supercritical antisolvent* - Antissolvente supercrítico

SDF: Fibra dietética solúvel

SEDS: *Solution enhanced dispersion by supercritical fluids* - Dispersão da solução aumentada por fluidos supercríticos

SF-295: Células tumorais do sistema nervoso humano

SFE: *Supercritical fluid extraction* - Extração com fluido supercrítico

SFEE: *Supercritical fluid extraction of emulsions* - Extração supercrítica de emulsões

SOX: Soxhlet

SPE: *Solid phase extraction* - Extração em fase sólida

SPME: *Solid phase microextraction* - Microextração em fase sólida

SQ: Soma dos quadrados

SSI: *Supercritical solvent impregnation* - Impregnação por solvente supercrítico

SUS: Sistema Único de Saúde

T: Temperatura

t : Tempo de extração

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBHQ: Terc-butilhidroquinona

T_c : Temperatura crítica

t_{CER} : Tempo de duração da etapa CER

TDF: Fibra dietética total

TE: *Trolox equivalent* - Equivalente ao Trolox

TEAC: *Trolox equivalent antioxidant capacity* - Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

t_{FER} : Tempo de duração da etapa FER

TFT: Teor de compostos fenólicos total

UCEP: *Upper critical end point* - Ponto de maior pressão e temperatura

V: Vapor

w_{CO_2} : Fração mássica de dióxido de carbono

X_0 : Rendimento global da extração

Y_{CER} : Concentração de soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER

ΔT : Variação de temperatura

E: Porosidade do leito

ρ_a : Massa específica aparente

ρ_{CO_2} : Massa específica do solvente supercrítico

ρ_r : Massa específica real

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - (a) árvore da *C. sylvestris*; (b) inflorescência da *C. sylvestris*; (c) frutos da *C. sylvestris* e (d) folhas da *C. sylvestris*.48
- Figura 3.2** - Estrutura química geral das casearinas A-T, casearvestrininas A-C e caseargrewiina F e os diferentes radicais isolados da *Casearia sylvestris*, onde R¹-R⁵ são os substituintes de cada uma das estruturas. IC₅₀: citotoxicidade das casearinas A-R em células de *hamster* chineses (V-79).....50
- Figura 3.3** - Estruturas químicas dos diterpenos clerodânicos (a) 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona, (b) (-)-ácido hardwickiico e (c) *rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*, 9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno.....51
- Figura 3.4** - Cromatogramas obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), com $\lambda = 235$ nm, dos extratos etanólicos de *C. sylvestris* de diferentes partes da planta: (a) folhas, (b) flores, (c) casca do caule, (d) madeira do caule e (e) raízes. O símbolo (●) indica picos com espectro UV semelhante ao das casearinas (232-235 nm) e o símbolo (▼) indica picos com espectro UV semelhante à substância **1b** (*rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*, 9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno) (223-229 nm). Substâncias identificadas: **B**: casearina B; **F**: caseargrewiina F; **O**: casearina O; **X**: casearina X.....53
- Figura 3.5** - Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas.68
- Figura 3.6** - Representação esquemática do comportamento do CO₂ puro em um diagrama de fase P-T.....72
- Figura 3.7** - Curva genérica de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração, onde *I* é o período de taxa constante de extração (CER), *II* é o período de taxa decrescente de extração (FER) e *III* é o período de taxa de extração nula ou período difusivo (DCP).....79

Figura 3.8 - Equilíbrio de fases de misturas complexas representados em diagramas P-T com diferentes posições de ponto crítico.	84
Figura 3.9 - Diagrama esquemático P-T para um sistema binário referente ao Grupo I (sistemas com compostos quimicamente similares).....	86
Figura 3.10 - Diagrama esquemático P-T para um sistema binário referente ao Grupo II (sistemas binários formados por compostos altamente assimétricos).....	87
Figura 3.11 - Diagrama esquemático do processo SAS.	91
Figura 3.12 - Estrutura genérica das moléculas dos flavonoides.....	99
Figura 3.13 - Estruturas genéricas das principais classes dos flavonoides.....	99
Figura 4.1 - (a) Folhas inteiras de <i>C. sylvestris</i> recebidas; (b) amostra de <i>C. sylvestris</i> triturada em moinho de facas e utilizada nos experimentos	109
Figura 4.2 - (a) Equipamento de extração supercrítica e (b) diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.	120
Figura 4.3 - (a) Unidade experimental de equilíbrio de fases e (b) diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.....	127-128
Figura 5.1 - Curva de extração com fluido supercrítico de <i>C. sylvestris</i> a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO ₂	157
Figura 5.2 - Isotermas de rendimento com a pressão de extração para as ESC de <i>C. sylvestris</i> em experimentos realizados com vazão de CO ₂ de 8 ± 2 g/min.	163
Figura 5.3 - Efeito da concentração do cossolvente etanol e acetato de etila no rendimento da ESC de extrato de <i>C. sylvestris</i> a 200 bar, 50 °C e e vazão de CO ₂ de 8 ± 2 g/min.	169
Figura 5.4 - Comparativo do efeito da concentração do cossolvente etanol no rendimento da ESC de extrato de <i>C. sylvestris</i> a 200 bar e 50 °C, 300 bar e 40 °C e 300 bar e 50 °C, onde todas as condições foram realizadas com vazão de CO ₂ de 8 ± 2 g/min.....	171

- Figura 6.1** - Dados $P-w$ de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C..... 176
- Figura 6.2** - Dados $P-w$ de equilíbrio de fases para os sistemas multicomponentes formados por (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂; (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ e (C) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C e frações mássicas de CO₂ de 0,90 a 0,95.....180
- Figura 6.3** - Dados $P-w$ de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C e pontos experimentais de precipitação a 45 °C para o sistema extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂.....183
- Figura 6.4** - Dados $P-w$ de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C e pontos experimentais de precipitação a 35 °C e 45 °C para os sistemas extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂.....185
- Figura 6.5** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) e respectivas estimativas de tamanho (a) e (b): 80 bar e 45 °C (311 ± 71 μm); (c) e (d): 110 bar e 45 °C (168 ± 38 μm); (e) e (f): 140 bar e 45 °C (181 ± 44 μm)..... 187
- Figura 6.6** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras de Pluronic F127: (a) e (b) Pluronic F127 não processado (594 ± 159 μm); (c) e (d) Pluronic F127 precipitado pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) a 140 bar e 45 °C usando etanol como solvente orgânico (535 ± 147 μm); (e) e (f) Pluronic F127 precipitado pelo processo antissolvente supercrítico

(SAS) a 140 bar e 45 °C usando acetato de etila como solvente orgânico (298 ± 95 µm)..... 190

Figura 6.7 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras do sistema (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS): (a) 90 bar e 35 °C (191 ± 49 µm); (b) 130 bar e 35 °C (222 ± 63 µm); (c) 170 bar e 35 °C (168 ± 38 µm); (d) 110 bar e 45 °C (655 ± 198 µm); (e) 140 bar e 45 °C (230 ± 61 µm); (f) 170 bar e 45 °C (221 ± 69 µm). 191

Figura 6.8 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras do sistema (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS): (a) 90 bar e 35 °C (274 ± 114 µm); (b) 130 bar e 35 °C (102 ± 8 µm); (c) 170 bar e 35 °C (158 ± 36 µm); (d) 110 bar e 45 °C (600 ± 102 µm); (e) 140 bar e 45 °C (600 ± 171 µm); (f) 170 bar e 45 °C (346 ± 108 µm)..... 192

Figura 6.9 - (a) Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS); (b) Ampliação das variações de fluxo de calor do DSC para o extrato de *C. sylvestris*; (c) Ampliação comparativa das variações de fluxo de calor do DSC entre o extrato puro de *C. sylvestris* e a amostra precipitada pelo método SAS a 80 bar e 45 °C. 195-196

Figura 6.10 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras do sistema (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS) a 35 °C e 45 °C.....198

Figura 6.11 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras do sistema (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS) a 35 °C e 45 °C.....199

Figura 7.1 - Gráfico do ganho de peso dos camundongos Balb/c tratados durante 30 dias com os extratos de <i>C. sylvestris</i> e dieta hipercalórica e grupos de controle positivo e negativo.....	221
Figura 7.2 - Níveis de colesterol, triglicerídios e glicose em camundongos Balb/c tratados durante 30 dias com extratos de <i>C. sylvestris</i> e dieta hipercalórica e grupos de controle positivo e negativo	222
Figura 12.1 - Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos total (TFT), a 765 nm.	285
Figura 12.2 - Curva padrão de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS, a 754 nm.....	287
Figura A1 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 40 °C.	289
Figura A2 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 50 °C.	291
Figura A3 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 60 °C.	293
Figura A4 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.	294
Figura A5 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C.	295
Figura A6 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 60 °C.	296
Figura A7 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 40 °C.	297
Figura A8 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 50 °C.....	298
Figura A9 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 60 °C.	300
Figura A10 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOAC.....	301

Figura A11 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.....	302
Figura A12 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOAC.....	303
Figura A13 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOH.....	305
Figura A14 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOH.....	306
Figura A15 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOH.....	307
Figura A16 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.....	308
Figura A17 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOH.....	310
Figura A18 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por MAC-CLF.....	312
Figura A19 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por MAC-DCM ..	313
Figura A20 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por MAC-ETOAC.....	314
Figura A21 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por MAC-ETOH.....	316
Figura A22 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por MAC-HX	317
Figura A23 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por SOX-CLF.....	319
Figura A24 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por SOX-DCM	320
Figura A25 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por SOX-ETOAC.....	321
Figura A26 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por SOX-ETOH...	322
Figura A27 - CG-EM do extrato <i>C. sylvestris</i> obtido por SOX-HX	323

LISTA DE QUADROS

- Quadro 3.1** - Características gerais dos métodos experimentais de determinação de equilíbrio de fases a altas pressões..... 81-82
- Quadro 4.1** - Composição e cronograma da dieta hipercalórica, proposta por Rothwell, Saville e Stock (1982).145
- Quadro 4.2** - Resumo dos ensaios realizados (✓) para o extrato de *C. sylvestris*..... 149-150
- Quadro 7.1** - Principais compostos identificados nos extratos de *C. sylvestris* avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)..... 232-238

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição química do óleo essencial de <i>C. sylvestris</i> obtido por hidrodestilação.....	54
Tabela 3.2 - Comparação das propriedades físicas de líquido, gás e fluidos supercríticos.....	73
Tabela 3.3 - Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica e valores de temperatura, pressão e densidade críticas	75
Tabela 4.1 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet.....	113
Tabela 4.2 - Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X_0).....	124
Tabela 5.1 - Caracterização da matéria-prima <i>in natura</i> e da matéria-prima utilizada nas extrações (em base seca).....	152
Tabela 5.2 - Caracterização da partícula e do leito de partículas formado para a extração com fluido supercrítico.....	154
Tabela 5.3 - Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico de <i>C. sylvestris</i> , realizada a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO ₂	157
Tabela 5.4 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de <i>C. sylvestris</i> com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade (em base seca).....	158
Tabela 5.5 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de <i>C. sylvestris</i> com vazão de CO ₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca).....	161
Tabela 5.6 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 40 °C a 60 °C, e pressão (P), de 100 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de <i>C. sylvestris</i>	164
Tabela 5.7 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T) nas pressões de 100 a 200 bar sobre o rendimento da ESC de <i>C. sylvestris</i>	165
Tabela 5.8 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para ESC de <i>C. sylvestris</i> em função de diferentes concentrações de etanol e acetato de etila	

como cossolventes na condição de 200 bar, 50°C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca)..... 167

Tabela 5.9 - Valores de rendimento global (X₀) obtidos para ESC de *C. sylvestris* em função de diferentes concentrações de etanol como cossolvente na condição de 300 bar, temperaturas de 40 °C e 50 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca)..... 170

Tabela 6.1 - Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂.....173-175

Tabela 6.2 - Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + solvente (etanol ou acetato de etila) + Pluronic F127 + CO₂..... 178-179

Tabela 7.1 - Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de *C. sylvestris* e BHT obtidos por diferentes metodologias de extração..... 202-203

Tabela 7.2 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* e BHT através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (CE₅₀).....206-207

Tabela 7.3 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* através do método ABTS, expressos através do percentual de inibição (% Inibição) e capacidade antioxidante (CA) expressa em equivalentes de Trolox (ET)..... 213-214

Tabela 7.4 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* e BHT através do método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, expressos em termos de percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação 217-218

Tabela 12.1 - Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos (X₀) de extração da *C. sylvestris* do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g CO₂/min..... 283

Tabela A1 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 40 °C	289-290
Tabela A2 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 50 °C.	291-292
Tabela A3 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 100 bar e 60 °C.	293
Tabela A4 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.	294
Tabela A5 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C.	295
Tabela A6 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 60 °C.	296
Tabela A7 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 40 °C.	297
Tabela A8 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 50 °C.	298-299
Tabela A9 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 300 bar e 60 °C.	300
Tabela A10 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de <i>C. sylvestris</i> obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOAC.....	301

Tabela A11 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOAC..... 302

Tabela A12 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOAC..... 303-304

Tabela A13 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOH..... 305

Tabela A14 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOH..... 306

Tabela A15 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOH..... 307

Tabela A16 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOAC..... 308-309

Tabela A17 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOH..... 310-311

Tabela A18 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-CLF 312

Tabela A19 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-DCM 313

Tabela A20 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOAC.....314-315

Tabela A21 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOH.....316

Tabela A22 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-HX..317-318

Tabela A23 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-CLF.....319

Tabela A24 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-DCM.....320

Tabela A25 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOAC...321

Tabela A26 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOH.....322

Tabela A27 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-HX.323

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	39
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	47
3.1. <i>Casearia sylvestris</i>	47
3.1.1. Composição química da <i>Casearia sylvestris</i>	48
3.1.2. Aplicações da <i>Casearia sylvestris</i>	54
3.2. Métodos de extração de produtos naturais com a utilização de solventes.....	59
3.2.1. Soxhlet.....	61
3.2.2. Maceração	62
3.2.3. Extração com fluido supercrítico.....	64
3.2.3.1. Princípios da extração com fluido supercrítico - Método dinâmico	67
3.2.3.2. Fluido supercrítico.....	71
3.2.3.3. Utilização de cossolventes ao fluido supercrítico	74
3.2.3.4. Curvas de extração supercrítica	76
3.3. Equilíbrio de fases a alta pressão	78
3.3.1. Determinação experimental de dados de equilíbrio de fases	79
3.3.2. Sistemas complexos e multicomponentes	80
3.3.3. Comportamento de fases de misturas complexas	83
3.3.4. Comportamento de fases do equilíbrio sólido-líquido-vapor	85

3.4. Métodos de formação de partículas utilizando fluidos supercríticos.....	88
3.4.1. Agentes encapsulantes.....	93
3.4.2. Relação entre o equilíbrio de fases e o processo de precipitação/encapsulamento.....	95
3.5. Antioxidantes.....	96
3.5.1. Compostos fenólicos.....	98
3.5.2. Radicais livres e métodos de determinação da atividade antioxidante.....	100
3.6. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante da <i>C. sylvestris</i>	103
CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS.....	107
4.1. Obtenção da matéria-prima.....	108
4.2. Pré-tratamento da matéria-prima.....	109
4.3. Caracterização da matéria-prima.....	110
4.3.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis.....	110
4.3.2. Determinação do resíduo mineral fixo (cinzas).....	110
4.3.3. Determinação do teor nitrogênio total.....	111
4.3.4. Determinação do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel.....	112
4.4. Extrações à baixa pressão.....	112
4.4.1. Soxhlet.....	113
4.4.2. Maceração.....	114
4.5. Caracterização física do leite de partículas da ESC.....	115
4.5.1. Determinação do diâmetro médio de partícula.....	115
4.5.2. Determinação da massa específica aparente (ρ_a).....	115
4.5.3. Determinação da massa específica real (ρ_r).....	116

4.5.4. Porosidade do leito (ϵ).....	117
4.6. Determinação da massa específica do solvente supercrítico (ρ).....	117
4.7. Extração supercrítica (ESC).....	118
4.7.1. Equipamento de extração supercrítica.....	119
4.7.2. Curvas de extração e determinação dos parâmetros cinéticos ..	121
4.7.3. Determinação do rendimento global de extrato (X_0).....	123
4.7.4. Emprego de cossolvente (CS).....	124
4.8. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente.....	126
4.9. Determinação experimental do equilíbrio de fases.....	126
4.9.1. Aparato experimental.....	127
4.9.2. Procedimento experimental.....	129
4.10. Precipitação e encapsulamento de extratos de <i>C. sylvestris</i>	133
4.11. Caracterização das partículas obtidas pelo processo SAS.....	134
4.11.1. Morfologia e estimativa de tamanho das partículas.....	134
4.11.2. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	135
4.12. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT).....	135
4.13. Avaliação da atividade antioxidante.....	137
4.13.1. Método DPPH.....	137
4.13.2. Método do radical ABTS.....	139
4.13.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	140
4.14. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante.....	142
4.15. Determinação do perfil químico dos extratos.....	147
4.16. Análise estatística.....	147
4.17. Resumo dos ensaios.....	148

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE I.....	151
5.1. Caracterização da matéria-prima e do leito de partículas da ESC..	151
5.2. Extração supercrítica (ESC)	154
5.2.1. Testes preliminares e determinação das etapas CER, FER e DCP	154
5.2.2. Determinação do rendimento global de extrato (X_0)	158
CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II	173
6.1. Determinação experimental do equilíbrio de fases de extratos de <i>C. sylvestris</i>	173
6.2. Precipitação e encapsulamento de extratos de <i>C. sylvestris</i>	182
6.3. Caracterização das partículas obtidas pelo processo SAS	186
6.3.1. Morfologia e estimativa de tamanho das partículas.....	186
6.3.2. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	194
CAPÍTULO 7: RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE III.....	201
7.1. Teor de compostos fenólicos total (TFT)	201
7.2. Avaliação da atividade antioxidante	205
7.2.1. Método DPPH.....	205
7.2.2. Método ABTS.....	212
7.2.3. Método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico	215
7.3. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante	220
7.4. Determinação do perfil químico dos extratos	226
CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES	239
CAPÍTULO 9: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	243
CAPÍTULO 10: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	245

CAPÍTULO 11: ANEXOS.....	275
ANEXO I: Certificado de ensaio - Determinação de nitrogênio total	277
ANEXO II: Certificado de ensaio - Determinação de fibra dietética total	279
CAPÍTULO 12: APÊNDICES	281
APÊNDICE I: Dados experimentais da curva de extração	283
APÊNDICE II: Curva padrão de ácido gálico.....	285
APÊNDICE III: Curva padrão de Trolox	287
APÊNDICE IV: Cromatogramas e compostos identificados dos extratos de <i>Casearia sylvestris</i>	289
APÊNDICE V: Artigo publicado no <i>Journal of Supercritical Fluids</i>	325

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado de 350.000 a 550.000 espécies. A diversidade biológica vegetal brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos (NODARI; GUERRA, 2003).

Dentre as espécies de vegetais presentes no Brasil, a *Casearia sylvestris*, também conhecida como guaçatonga e erva-de-bugre, é uma planta utilizada na medicina popular, comumente encontrada em diversos países da América do Sul. No Brasil está distribuída ao longo de praticamente toda extensão do território, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (HACK et al. 2005; FERREIRA et al., 2011).

A *C. sylvestris* é uma das espécies vegetais que está listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), o qual é constituído de um inventário de espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). A finalidade da RENISUS é subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva da planta, bem como orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), dando suporte ao desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos.

Na medicina popular, a *C. sylvestris* é utilizada como agente antisséptico, anestésico local, cicatrizante, antitérmico, antitumoral, antiulcerativo, antiofídico, antimicrobiano, anti-hiperlipidêmico e para o tratamento de herpes, sífilis e síndromes diarréicas (ITOKAWA, 1988; BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005). Alguns usos populares da *C. sylvestris* já foram corroborados por investigações clínicas e pesquisas científicas. Essas propriedades do gênero *Casearia*, são consequência de sua composição química, devido à presença de substâncias de interesse como cumarinas, flavonóides e diterpenos

clerodânicos, sendo que destes últimos já foram isolados 28 típicos de *Casearia* (TALAPATRA et al., 1983; KHAN et al., 1990; MORITA et al., 1991; HUNTER et al., 1997).

Devido à importância de pesquisas sobre obtenção de compostos com propriedades medicinais, surge a necessidade de aplicação de métodos de extração que preservem a qualidade dos produtos naturais e mantenham as propriedades fitoterápicas dos extratos. Conforme o método de extração, as características químicas de um óleo essencial ou extrato podem ser alteradas, fazendo com que os efeitos terapêuticos, possivelmente, também sejam. Métodos mais rápidos de extração podem reduzir o custo do produto obtido, mas também podem alterar suas qualidades terapêuticas. A temperatura usada na extração pode interferir na qualidade final do extrato, pois durante a extração, moléculas termossensíveis de um princípio ativo podem ser degradadas e/ou oxidadas em produtos de menor eficácia ou, às vezes, gerar subprodutos tóxicos (DONELIAN, 2004).

O valor terapêutico dos extratos naturais deve-se à sua complexidade química, por atuarem por diversos mecanismos, ao contrário dos produtos sintéticos, que não possuem a sinergia específica que os compostos naturais apresentam, decorrentes da estereoquímica e outras características dos elementos presentes nos extratos naturais fazendo com que estes atuem de maneira específica na cura. Esta é a explicação para a obtenção de propriedades diferentes e mais abrangentes dos extratos naturais. Os extratos podem ser compostos por hidrocarbonetos, alcoóis, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e vários compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados. Dentre os compostos importantes estão os terpenos (C_nH_{2n-4}), que podem ser incolores, amarelados (quando associados a carotenóides) ou esverdeados (quando associados à clorofila), sendo que as principais classes de constituintes dos extratos de uso terapêutico são os mono e sesquiterpenos, os ésteres, os aldeídos, as cetonas, os alcoóis, os fenóis, os óxidos e os ácidos (CORAZZA, 2002).

Métodos tradicionais de extração, incluindo a extração com solventes orgânicos, a destilação a vapor e a hidrodestilação, são

bastante utilizados para a obtenção de extratos e óleos essenciais de diversas matrizes vegetais. Porém, estas técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar alterações químicas e destruição de compostos termossensíveis, assim como a perda de qualidade do extrato (BE-JEN; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGUI, 2007). A extração com solventes orgânicos é a técnica comumente aplicada nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos. Porém, o uso de solventes orgânicos pode ser prejudicial à saúde (BE-JEN; YEN-HUI; ZER-RAN, 2004; BISCAIA, 2007).

A extração de compostos utilizando solventes em altas pressões, ou fluidos supercríticos, destaca-se especialmente quando a aplicação do extrato é direcionada às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Esta metodologia apresenta-se como uma alternativa aos processos convencionais de extração para a obtenção de compostos de alto valor agregado e com elevado grau de pureza, sem a necessidade de uma etapa adicional para a remoção de solventes (RIZVI et al., 1986; POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGUI, 2007).

As propriedades dos fluidos supercríticos aumentam as taxas de extração e os rendimentos em relação aos líquidos e gases, uma vez que as altas massas específicas dos fluidos conferem grande poder de solvatação, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida (AGHEL et al., 2004; TSAO; DENG, 2004). Devido à semelhança na viscosidade dos fluidos supercríticos e dos gases, e por seu coeficiente de difusão ser maior que dos líquidos, a extração das substâncias, mediante este processo, é facilitada. Como uma pequena alteração da pressão e da temperatura provoca uma grande mudança na solubilidade, o uso de um fluido supercrítico permite um isolamento altamente eficiente dos componentes a serem extraídos (BRUNNER, 1994).

O dióxido de carbono (CO₂) no estado supercrítico é o fluido mais comumente utilizado por apresentar características como não inflamabilidade, atoxicidade, facilidade de remoção do extrato na

despressurização, custo-benefício vantajoso, além de reduzir a decomposição térmica da amostra, devido a sua baixa temperatura crítica (31,1 °C). Contudo, o CO₂ puro não é o solvente mais apropriado para extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, fazendo-se necessário a utilização de modificadores (em pequenas quantidades) para aumentar o poder de solvatação do CO₂ (SCALIA; GIUFREDDA; PALLADO, 1999).

Aliado à técnica de extração, o potencial antioxidante de produtos naturais é de grande interesse, uma vez que estudos comprovam que a influência benéfica de alimentos e bebidas na saúde humana está associada à atividade antioxidante de polifenóis presentes nos alimentos. A maioria dos casos de atividade antioxidante de frutas e vegetais deve-se a compostos como ácidos fenólicos e flavonóides (TSAO; DENG, 2004; ROGINSKY; LISSI, 2005). Os antioxidantes são formados por diferentes grupos químicos, apresentando diferentes estruturas e propriedades. Para extrair e manipular essas substâncias complexas, o dióxido de carbono supercrítico apresenta-se como solvente adequado, devido às baixas temperaturas empregadas na extração, garantindo a conservação de suas propriedades biológicas (CORTESE et al., 1999; DÍAZ-REINOSO, et al., 2006).

Ainda, dentre os compostos de alto valor agregado destacam-se os que são capazes de controlar as dislipidemias e hiperglicemias. Essas doenças estão associadas aos maus hábitos alimentares, a fatores genéticos e à falta de atividade física. O colesterol e diabetes são fatores de risco e estão associados com doenças cardiovasculares, doenças renais e alguns tipos de câncer (FERREIRA et al., 2011). De acordo com a literatura e medicina popular, a *C. sylvestris* é uma importante fonte natural de compostos com atividade biológica, entre elas a atividade anti-hiperlipidêmica.

O recobrimento ou encapsulamento de extratos naturais em polímeros, em uma faixa micro e nanométrica, é de grande interesse para as indústrias de alimentos e farmacêutica devido à preservação das propriedades desses extratos (REVERCHON et al., 2000; JUNG; PERRUT, 2001). A formação de partículas e encapsulamento utilizando

técnicas tradicionais como *spray drying*, coacervação, *freeze drying*, polimerização interfacial, entre outras, pode apresentar algumas desvantagens como o não controle do tamanho e da morfologia das partículas formadas, degradação térmica de substâncias sensíveis e baixa eficiência de encapsulamento (FRANCESCHI et al., 2008b).

O processo de micronização e encapsulamento por meio do antissolvente supercrítico (SAS) é utilizado amplamente na obtenção de partículas sólidas. Nesse processo é possível o controle do tamanho, distribuição de tamanho, morfologia e estrutura cristalina das partículas formadas (REVERCHON et al., 2003). Essas características podem ser obtidas devido à rápida mistura do solvente, antissolvente e extrato. Como vantagens desse processo tem-se a eficiente separação do solvente e do antissolvente das partículas precipitadas, evitando resíduo de solvente no produto final; reuso do solvente e antissolvente; preservação da qualidade do material particulado devido às baixas temperaturas de processo (MIGUEL et al, 2008; COCERO et al., 2009; VARONA et al., 2010).

Para aplicação dos processos de precipitação e encapsulamento em meio supercrítico, é necessário o conhecimento do comportamento de fases. Dentre as relações termodinâmicas, o equilíbrio de fases é um dos fatores mais importantes nos projetos de extração, separação, precipitação e encapsulamento com fluidos supercríticos. Dados de equilíbrio de fases de sistemas complexos, formados especialmente por compostos naturais e solventes, desempenham um importante papel para elucidar os mecanismos de precipitação envolvidos na formação de partículas (micronização), como nucleação e transferência de massa. Esses dados são responsáveis por determinar as condições operacionais de temperatura e pressão mais adequadas para os processos de precipitação e encapsulamento, além de dados sobre a solubilidade e a seletividade dos solutos no solvente supercrítico, sendo fundamentais especialmente quando os solutos são substâncias de alto valor agregado, como compostos bioativos, para as indústrias alimentícia e farmacêutica (FRANCESCHI et al., 2008a; MICHIELIN et al., 2009).

Apesar de serem bastante conhecidos os benefícios da extração com CO₂ supercrítico para a obtenção de extratos e manutenção de suas propriedades, não há relatos na literatura do uso desta técnica aplicada à *C. sylvestris*, assim como o estudo do equilíbrio de fases e, tampouco, do encapsulamento de extratos dessa planta em meio supercrítico. Além disso, devido ao potencial biológico da *C. sylvestris*, é de grande importância a determinação do potencial antioxidante e o estudo do efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante de seus extratos, pontos estes pouco explorados até o presente momento.

Este trabalho está estruturado em capítulos: nesse capítulo, está apresentada uma breve introdução sobre o assunto abordado neste trabalho; no capítulo 2 são descritos os objetivos gerais e específicos deste trabalho; no capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica, dando embasamento teórico relacionado às análises dos resultados; o capítulo 4 trata da metodologia utilizada na condução dos experimentos; os resultados são apresentados nos capítulos 5, 6 e 7, onde são comparadas as técnicas de extração empregadas e os seus respectivos rendimentos; dados de equilíbrio de fases e obtenção de extratos encapsulados de sistemas contendo extrato de *C. sylvestris*; avaliação do teor de fenólicos total, potencial antioxidante, efeito antiobesidade, hipolipemiante e hipoglicemiante e perfil químico dos extratos obtidos. Por fim, no capítulo 8 são apresentadas as conclusões deste trabalho e, no capítulo 9, as sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter extratos de *Casearia sylvestris* empregando extrações à baixa pressão e a tecnologia supercrítica, avaliar o potencial biológico dos extratos obtidos, bem como determinar o equilíbrio de fases destes extratos em CO₂ supercrítico e solventes orgânicos com a finalidade de se obterem extratos encapsulados.

2.2. Objetivos específicos

- a) Preparar e caracterizar a matéria-prima *Casearia sylvestris* para aplicação em diferentes técnicas de extração;
- b) Aplicar técnicas de extração à baixa pressão e extração supercrítica (ESC) na obtenção de extratos de *C. sylvestris* utilizando;
- c) Comparar o rendimento das técnicas de extração à baixa pressão e extração supercrítica (ESC) empregadas na obtenção do extrato de *C. sylvestris*;
- d) Avaliar o rendimento de extração da ESC para a *C. sylvestris* em função das condições operacionais de temperatura e pressão;
- e) Selecionar um ou mais solventes para a ESC, a partir do emprego de solventes orgânicos nas extrações à baixa pressão, e avaliar o efeito da adição deste(s) no rendimento de extração;
- f) Determinar o perfil químico dos extratos de *C. sylvestris* obtidos pelas técnicas de extração à baixa pressão e extração supercrítica (ESC), associando os resultados aos métodos de extração e solventes utilizados;

- g)** Avaliar os extratos de *C. sylvestris* em termos de teor de fenólicos total e atividade antioxidante por diferentes técnicas *in vitro*, relacionando os resultados com as condições de extração aplicadas;
- h)** Determinar o efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante de extratos de *C. sylvestris*;
- i)** Selecionar um ou mais extratos de *C. sylvestris* para determinar experimentalmente o equilíbrio de fases, através do método estático, de sistemas multicomponente contendo extrato de *C. sylvestris* + solvente orgânico + polímero + CO₂, visando obter informações para operações de precipitação e encapsulamento dos extratos;
- j)** Obter extratos de *C. sylvestris* encapsulados pelo processo de antissolvente supercrítico (SAS);
- k)** Caracterizar as partículas obtidas quanto à morfologia, estimativa de tamanho e por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Casearia sylvestris*

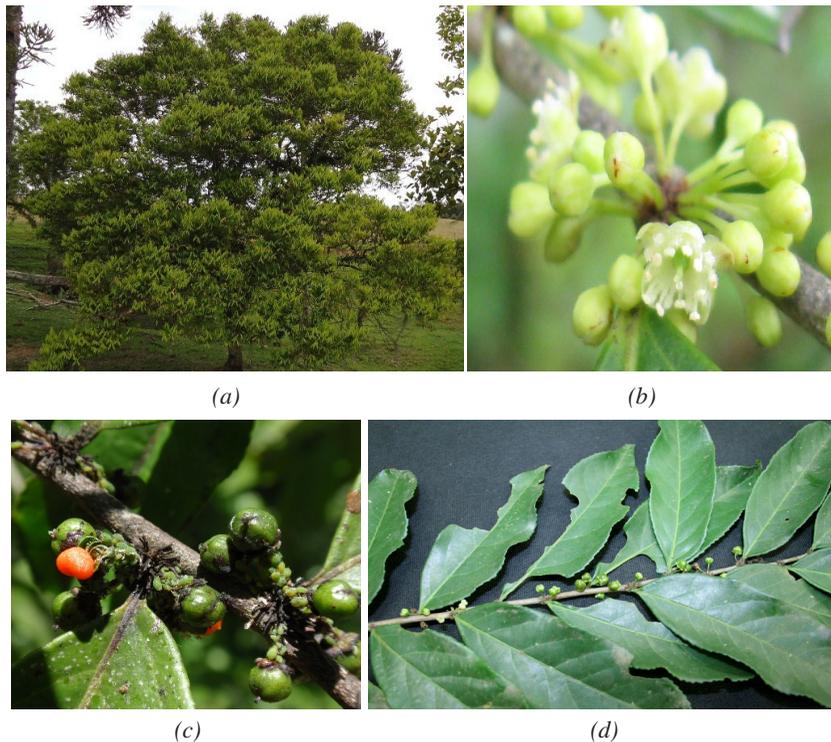
Casearia sylvestris é uma planta medicinal nativa do Brasil, Peru, Argentina, Uruguai e Bolívia, popularmente conhecida como *guaçatonga*, *erva-de-bugre*, *cafeiro-do-mato*, *cafezinho-do-mato* e *pau-de-lagarto*. Trata-se de uma espécie da medicina tradicional brasileira, e as folhas da planta são popularmente utilizadas como antisséptico, anestésico e cicatrizante tópico, além de agente antitumoral e antiulcerativo, sendo também empregada no tratamento de gastrites, picadas de cobras e insetos e como antitérmico (BASILE et al., 1990; BANDEIRA et al, 2006; ESTEVES et al., 2011).

A *C. sylvestris* é uma espécie vegetal arbórea pertencente originalmente à família Flacourtiaceae, a qual é constituída por 89 gêneros e 1.300 espécies encontradas em diversas zonas temperadas e tropicais do mundo. O gênero *Casearia*, posteriormente transferido para a família Salicaceae, possui mais de 1.000 espécies conhecidas e, destas, 70 espécies apresentam ocorrência em pelo menos 22 estados do território brasileiro (CHASE, 2002; CARVALHO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2009), sendo encontrada principalmente nos estados do Amazonas e de São Paulo (ABSY; SCAVONE, 1973; MOSADDIK et al., 2004).

A *C. sylvestris* pode alcançar 4-6 metros de altura, com tronco de 20-30 centímetros de diâmetro. Anatomicamente, suas estruturas vegetativas e reprodutivas são caracterizadas pela presença de inclusões cristalinas e células glandulares repletas de óleo essencial. Suas folhas são assimétricas, persistentes, glabras ou ásperas, pecioladas, lanceoladas, serreadas, alternas, brilhantes em cima e dotadas de glândulas visíveis por transparência em todo o limbo (que apresenta em torno de 6-12 cm de comprimento, por 3-5 cm de largura). Suas flores são pequenas e numerosas, de coloração esverdeada, actinomorfas, diclamídeas e hipóginas. Os frutos são cápsulas septicidas, com sementes envolvidas por arilo vermelho. Esta árvore floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro,

prolongando-se até meados de novembro (ABSY; SCAVONE, 1973; SCAVONE et al., 1979; LORENZI, 1992; FERREIRA, 2006; FELIPE, 2010). A Figura 3.1 apresenta a árvore de *C. sylvestris*, sua inflorescência, frutos e folhas.

Figura 3.1 - (a) árvore da *C. sylvestris*; (b) inflorescência da *C. sylvestris*; (c) frutos da *C. sylvestris* e (d) folhas da *C. sylvestris*.



Fonte: (a) VERDI, 2010; (b) SILVA, 2009; (c) CHAVES, 2012; (d) GIEHL, 2008.

3.1.1. Composição química da *Casearia sylvestris*

O gênero *Casearia* é caracterizado pela ocorrência de substâncias de interesse para a indústria farmacêutica como cumarinas (TALAPATRA et al., 1983), flavonóides e diversos diterpenos,

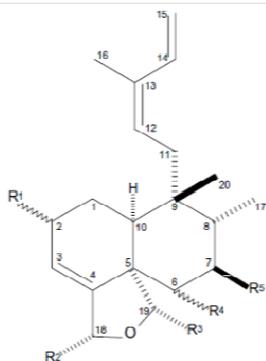
especialmente clerodânicos (KHAN et al., 1990; MORITA et al., 1991; HUNTER et al., 1997).

De acordo com Carvalho, Santos e Cavalheiro (2009) já foram isolados de *C. sylvestris* mais de 30 diterpenos clerodânicos, dos quais 28 são típicos de *Casearia*. Os diterpenos clerodânicos mais comumente encontrados nas folhas de *C. sylvestris* são as casearinas, sendo que já foram isolados e identificados mais de 20 tipos diferentes dessas moléculas (MORITA et al., 1991), recebendo a nomenclatura casearinas A-T (SANTOS et al., 2010). Além das casearinas, novos diterpenos clerodânicos, conhecidos como casearvestrinas A-C e caseargrewiina F, foram identificados nas folhas de *C. sylvestris* (ORBELIES et al., 2002; SANTOS et al., 2010).

Outros importantes compostos já identificados são as casearialignanas A-F (WANG et al., 2010), as *caseariasides* A-E, as *sylvestrisides* C-E entre outros clerodanos diterpenóides complexos (WANG et al, 2009a, WANG et al, 2009b). Diterpenos clerodânicos de estrutura menos complexa como 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona e (-)-ácido hardwickiico e diterpeno complexo *rel*-19S-acetóxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13 (16),14-trieno também foram isolados de folhas de *C. sylvestris* (SANTOS et al., 2007). Alguns destes diterpenos apresentam atividades citotóxica em linhagens de células tumorais, antiulcerogênica e tripanossomicida, dentre outras (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002). Também já foram isolados do extrato alcoólico obtido das folhas da planta, dois derivados do ácido gálico, o isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE) e o metil galato-3,5- dimetil éter (MGDE) os quais demonstraram efeito antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich e o carcinoma de pulmão de Lewis (SILVA; CHAAR; YANO, 2009).

A Figura 3.2 apresenta a estrutura química geral das casearinas A-T, da casearvestrinas A-C e da caseargrewiina F, além dos diferentes radicais isoladas de *C. sylvestris*. Complementarmente, a Figura 3.3 mostra as estruturas químicas de alguns diterpenos clerodânicos importantes encontrados na *C. sylvestris* (a) 15-hidróxi-3-cleroden-2-

Figura 3.2 - Estrutura química geral das casearinas A-T, casearvestrinas A-C e caseargrewiina F e os diferentes radicais isolados da *Casearia sylvestris*, onde R¹-R⁵ são os substituintes de cada uma das estruturas. IC₅₀: citotoxicidade das casearinas A-R em células de hamster chineses (V-79).



Diterpenes	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ (μM)
Casearin A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.0
Casearin B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	8.5
Casearin C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₆ H ₁₃ CO ₂	0.77
Casearin D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.8
Casearin E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₆ H ₁₃ CO ₂	4.7
Casearin F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	2.9
Casearin G	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.17
Casearin H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.37
Casearin I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.51
Casearin J	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	1.1
Casearin K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	0.52
Casearin L	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH	1.6
Casearin M	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH	1.8
Casearin N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	5.9
Casearin O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	6.0
Casearin P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	7.8
Casearin Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	4.3
Casearin R	= O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	5.4
Casearin S	OCH ₃ (α)	= O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	-
Casearin X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-
Casearvestrin A	(CH ₃) ₂ CHCO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-
Casearvestrin B	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-
Casearvestrin C	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-
Caseargrewiina F	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H	-

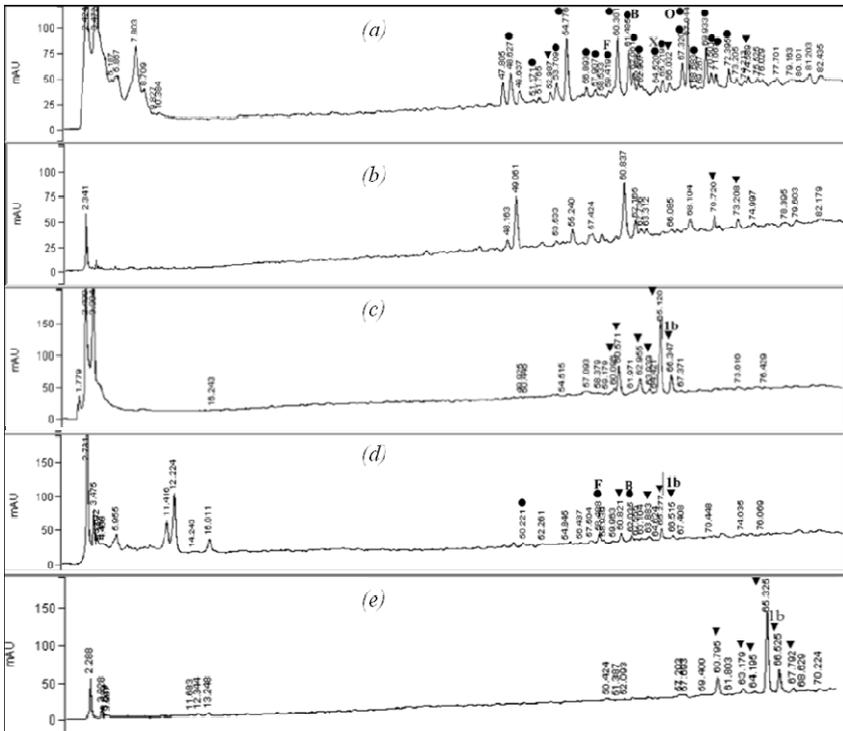
Fonte: CARVALHO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2009.

Estudos realizados com extratos de folhas de *C. sylvestris* demonstram que as casearinas e as casearvestrinas são os principais clerodanos bioativos dessa planta. Esses diterpenos tricíclicos oxigenados apresentam excelente potencial citotóxico sobre diversos micro-organismos e linhagens celulares, além de apresentarem atividade antitumoral (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al. 1999; SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

Na Figura 3.4 são apresentados os cromatogramas obtidos no estudo de Carvalho, Santos e Cavalheiro (2009) em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de arranjo de diodos de extratos etanólicos de *C. sylvestris* de diferentes partes da planta como folhas, flores, casca do caule, madeira do caule e raízes. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a presença de diterpenos clerodânicos em diferentes partes de *C. sylvestris*, utilizando técnicas analíticas cromatográficas e espectroscópicas, e os resultados indicaram a presença de diterpenos clerodânicos em toda planta, prevalecendo em maior número nas folhas. Além disso, os resultados também indicaram que em caules, flores e raízes há predomínio de diterpenos clerodânicos com padrão diênico diferente daqueles obtidos de folhas de *C. sylvestris*.

De acordo com o Esteves et al. (2011) a composição química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, obtido por destilação a vapor e determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), mostrou a presença de biciclogermacreno, um componente que apresenta baixa atividade antitumoral, como composto majoritário (40,9 %). Porém, um alto percentual do óleo essencial de *C. sylvestris* (17,5 %) é formado por dois sesquiterpenos importantes, o β -cariofileno (18,1 %) e o α -humuleno (4,7 %), os quais apresentam alta atividade citotóxica e antiinflamatória comprovadas (SILVA et al., 2008). Outros componentes identificados são β -acoradieno (20,8 %), espatulenol (15,9 %), thujopseno (5,2 %), germacreno B (5,2 %), α -muurolol (2,7 %), globulol (3,0 %), germacreno D (3,9 %) e calameneno (1,5 %) (SILVA et al., 2008a; ESTEVES et al., 2011).

Figura 3.4 - Cromatogramas obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), com $\lambda = 235$ nm, dos extratos etanólicos de *C. sylvestris* de diferentes partes da planta: (a) folhas, (b) flores, (c) casca do caule, (d) madeira do caule e (e) raízes. O símbolo (●) indica picos com espectro UV semelhante ao das casearinas (232-235 nm) e o símbolo (▼) indica picos com espectro UV semelhante à substância **1b** (*rel*-19S-acetóxi-18R-butanoiloxi-18,19-epóxi-6S-hidróxi-2R-(2-metilbutanoilóxi)-5S,8R,9R,10S-cleroda-3,13(16),14-trieno) (223-229 nm). Substâncias identificadas: **B**: casearina B; **F**: caseargrewiina F; **O**: casearina O; **X**: casearina X.



Fonte: Adaptado de Carvalho, Santos e Cavalheiro (2009).

A Tabela 3.1 apresenta a composição do óleo essencial de *C. sylvestris*, obtido por hidrodestilação, conforme resultados do trabalho de Silva et al. (2008a).

Tabela 3.1 - Composição química do óleo essencial de *C. sylvestris* obtido por hidrodestilação.

Composto	%
α -Pinoeno	4,0
Linalol	0,7
Pulegona	0,5
α -Elemeno	1,1
α -Copaeno	0,8
β -Bourboneno	0,5
β -Elemeno	1,6
β -Cariofileno	18,1
χ -Elemeno	0,4
β -Gurjuneno	0,4
α -Humuleno	4,7
Muuroleno	0,5
D-Germacreno	3,9
Biciclogermacreno	43,6
B-Germacreno	5,2
Calameneno	2,3
δ -Cadineno	0,8
Espatuleno	15,9
Globulol	3,0
α -Muurulol	2,7

Fonte: SILVA et al., 2008.

3.1.2. Aplicações da *Casearia sylvestris*

Na medicina popular a *C. sylvestris* é utilizada como agente antisséptico, anestésico local, cicatrizante, antitérmico, antitumoral, antiulcerativo e antiofídico. Outras aplicações populares da planta referem-se ao seu uso como anestésico tópico e para o tratamento de herpes, sífilis e síndromes diarreicas (ITOKAWA, 1988; BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005). O emprego popular da *C. sylvestris* para o tratamento de herpes foi corroborado por investigações clínicas que demonstraram a cicatrização progressiva de lesões intra e extraorais

causadas por herpes simples após a aplicação tópica da planta (FERREIRA, 2006; FELIPE, 2010).

A população indígena de diversas partes da América do Sul, como os brasileiros da tribo dos Carajás e os peruanos da tribo Shipibo-Conibo, fazem a maceração ou decocção da casca de *C. sylvestris* para tratar diarreia, resfriados e gripes. Ainda, as raízes e sementes trituradas da planta são utilizadas para tratar ferimentos e lepra tópica (TAYLOR, 2002).

A maioria dos acidentes envolvendo cobras nas Américas Central e do Sul é causado por serpentes do gênero *Bothrops*, representado pelas jararacas e, desde muito tempo, a população indígena da floresta Amazônica usa a *C. sylvestris* para o tratamento (MORS et al., 2000; SILVA et al., 2008b). O envenenamento é caracterizado por inflamação local, dor, edema e necrose. Estudos *in vitro* demonstraram que o extrato aquoso de *C. sylvestris* é capaz de inibir a atividade tóxica das enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂) isoladas dos venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e diversos gêneros de cobras, como jararaca (*Bothrops*), cascavel (*Crotalus*), coral (*Micrurus*) e lagarto (*Heloderma*), sendo também capaz de diminuir a atividade hemorrágica dessas enzimas. As PLA₂ são responsáveis pela hidrólise de fosfolipídios na digestão, mas também exercem atividades farmacológicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edemas, efeito anticoagulante e letalidade (BORGES et al., 2000). A ação do extrato de *C. sylvestris* ocorre por intermédio de componentes capazes de neutralizar as PLA₂, toxinas isoladas e metaloproteínas presentes no veneno (BORGES et al., 2000). O efeito neutralizador do extrato de *C. sylvestris* sobre os componentes tóxicos pode estar associado à presença de derivados do ácido elágico (SILVA et al., 2008b), que previnem e/ou reduzem a ocorrência de paralisia neuromuscular, permeabilidade vascular, dano muscular e alterações no sistema de coagulação sanguínea, além de reduzir a formação de edema e de hemorragia, características do processo de envenenamento, e letalidade (PEREIRA; GONÇALVES; PEREIRA; 1992). Estes últimos efeitos do extrato foram comprovados em camundongos no estudo de Esteves et al. (2011).

Muitos usos populares da *C. sylvestris* já foram comprovados por estudos científicos, como, por exemplo, a ação antimicrobiana contra fungos (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*) (CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002) e contra bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*) (CHIAPPETA; MELLO; MACIEL, 1983; MOSADDIK et al. 2004; SILVA et al. 2008b). Essa ação antimicrobiana explica o emprego popular da *C. sylvestris* para o tratamento de feridas, ulcerações na pele e diarreia (FERREIRA et al., 2011). Além dos micro-organismos acima citados, a *C. sylvestris* apresenta efeitos citotóxicos contra os protozoários *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (MESQUITA et al., 2005) e larvas do mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006; MATTOS et al., 2007).

Em outro estudo, Tavares et al. (2008) testaram a eficácia do extrato etanólico de *C. sylvestris* em bactérias e fungos associados a doenças orais, como cáries dentárias, periodontites e candidíase oral. Nesse estudo os autores encontraram valores menores que 1 µg/mL de extrato etanólico referentes à concentração mínima inibitória (CMI) para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus casei*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, inibindo 90 % do crescimento destes micro-organismos. Este resultado sugere o potencial uso do extrato de *C. sylvestris* como alternativa no tratamento de infecções orais.

A aplicação popular de *C. sylvestris* como analgésico local foi comprovada pelo estudo de Mattos et al. (2007), onde foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. sylvestris* apresentou propriedades antinociceptivas em camundongos, submetidos a tratamentos de nocicepção (dor associada a condições inflamatórias), possivelmente devido ao efeito inibitório na produção de mediadores inflamatórios e ativação de mecanismos opioidérgicos.

O uso da *C. sylvestris* na prevenção de úlceras gástricas, tratamento de lesões na pele e processos inflamatórios pela medicina popular foi estudado por Basile et al. (1990) e Esteves et al. (2005). Os autores observaram que o extrato etanólico de folhas da *C. sylvestris* possui propriedades antiulcerativas, além de proteger a mucosa do estômago (sem modificar o pH gástrico) e apresentar um efeito curativo em processos de ulceração crônica. Além do efeito antiulcerativo, Esteves et al. (2005) relataram que o óleo essencial da *C. sylvestris*, obtido por hidrodestilação, possui efeito anti-inflamatório. De acordo com os resultados, o óleo essencial de *C. sylvestris* inibiu 90 % de úlceras gástricas provocadas pelo estresse, enquanto a cimetidina inibiu 70 %. Os autores sugerem que a atividade anti-inflamatória e antiulcerativa podem estar diretamente relacionadas à presença de compostos terpênicos e taninos no óleo essencial das folhas da planta.

O aumento dos níveis séricos no sangue é um fator de risco para doenças cardiovasculares. Devido a isso, alguns estudos sobre o efeito hipolipidêmico, ou hipolipemiante, de extratos de *C. sylvestris* foram relatados pela literatura. No estudo de Schoenfelder et al. (2008), os autores relataram a inibição da elevação dos triglicerídios e lipases séricos pelo extrato, após administração de óleo de oliva em camundongos. Da mesma forma, no trabalho de Werle et al. (2009), foi avaliada a atividade hipotrigliceridemiante do extrato hidroalcoólico de *C. sylvestris* em camundongos. Como resultado, os autores mencionam uma redução significativa nos níveis séricos de triglicerídios pelo extrato hidroalcoólico, justificando o uso popular da *C. sylvestris* na redução de peso.

Uma grande parte dos estudos e possíveis aplicações da *C. sylvestris* envolvem o emprego desta planta e de seus extratos e de componentes relacionados à atividade citotóxica sobre diversas linhagens de células tumorais. Estudos demonstram que os diterpenos clerodânicos são citotóxicos para diferentes tipos de linhagens de células tumorais, como cólon (HCT-116), leucemia (HL-60), ovário (A2780), próstata (PC-3) e fibroblastos normais (L-929, V-79) (FERREIRA et al., 2010). Dentre estes compostos, podem ser citadas as casearvestrinas A-

C isoladas de folhas e galhos de *C. sylvestris*, que apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células de carcinoma epidérmico oral humano (KB) (WILLIAMS et al., 2007). Também, os diterpenos clerodânicos casearinas L, O e X o (-)-ácido hardwickiico, apresentados anteriormente no item 3.1.1, isolados de folhas de *C. sylvestris* apresentam forte efeito citotóxico em linhagens de células de leucemia (HL-60, HL-, K-562 e CEM). Através do ensaio de redução metabólica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) os compostos mencionados apresentam-se ativos contra pelo menos uma linhagem celular, enquanto a casearina X é a mais ativa contra as linhagens celulares HL-60 e CEM. Este efeito citotóxico está possivelmente relacionado com a alta oxigenação presente nas casearinas. Além disso, a casearina X exerce um efeito citotóxico através da indução de apoptose (fenômeno de morte celular não seguida de autólise, que ocorre individualmente e de forma ordenada, onde a morte de uma célula não leva à morte das células vizinhas), o que enfatiza o potencial uso das casearinas como compostos com propriedades antitumorais promissoras e moléculas de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (FERREIRA et al., 2010).

Mais recentemente, Ferreira et al. (2010) demonstraram a capacidade citotóxica da casearina X em células cancerígenas de leucemia (MOLT-4), melanoma (MDA/MB-435), sistema nervoso (SF-295) e cólon (HCT-8). Santos et al. (2010) isolaram e avaliaram a citotoxicidade de compostos presentes na *C. sylvestris* nas mesmas linhagens de células tumorais, além de glioblastomas (SF-295) e em fibroblastos normais (L-929). Dentre os compostos testados, a caseargrewiina F mostrou-se como o composto mais ativo, apresentando forte citotoxicidade sobre todas as linhagens de células tumorais ($IC_{50} < 0.2 \mu M$), sendo comparados ao controle positivo (doxorubicina). Além disso, a caseargrewiina F apresentou baixa atividade citotóxica em células humanas normais ($IC_{50} = 1,09 \mu M$), possivelmente indicando uma ação seletiva em células tumorais.

De acordo com o trabalho de Silva et al. (2008a) foi verificado que o óleo essencial de *C. Sylvestris*, obtido por hidrodestilação, apresentou boa citotoxicidade seletiva contra as linhagens de células tumorais humanas de carcinoma cervical (HeLa), de pulmão (A-549) e de adenocarcinoma (HT-29), com valores de dose citotóxica capaz de inibir o crescimento celular em 50 % (CD₅₀) de 63,3, 60,7 e 90,6 µg/mL, respectivamente, quando comparada às células não-tumorais Vero (CD₅₀ = 210,1 µg/mL) e macrófagos de camundongos (CD₅₀ = 234,0 µg/mL). Além disso, o óleo causou hemólise (rompimento da membrana plasmática das hemácias do sangue com liberação da hemoglobina no plasma) em sete diferentes tipos de eritrócitos, indicando que a *C. sylvestris* precisa ser utilizada com cautela, a fim de se evitarem danos aos eritrócitos devido à sensibilidade ao extrato. Também foram testados padrões de β-cariofileno e α-humuleno que mostraram citotoxicidade similar àquelas apresentadas pelo óleo, indicando que estes compostos podem ser os responsáveis pela citotoxicidade observada neste estudo.

O uso de *C. sylvestris* também foi apresentado no trabalho de Oliveira et al. (2009), onde os autores estudaram os benefícios do uso de extrato etanólico de *C. sylvestris* e caseargrewiina F como compostos protetores contra danos do DNA causados por ciclofosfamida, um agente mutagênico. Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de *C. sylvestris* e a caseargrewiina F são eficazes nessa proteção se empregados em baixas concentrações, desde que estas sejam menores que 50 mg/kg_{peso corporal} e 3,8 mg/kg_{peso corporal}, respectivamente.

3.2. Métodos de extração de produtos naturais com a utilização de solventes

As tecnologias clássicas de extração são baseadas no uso de um solvente apropriado para remover compostos lipofílicos do tecido celular. Os métodos de extração a serem empregados para a obtenção de extratos e compostos bioativos variam conforme a localização destes componentes na matriz vegetal e com a posterior aplicação. De forma geral, a extração desses compostos pode ser realizada através de técnicas

convencionais como a prensagem a frio, a maceração e a extração em Soxhlet, a destilação direta e a destilação por arraste a vapor de água (CAMPOS, 2008). Os principais solventes utilizados para a extração de óleos são o hexano, o benzeno, os alcoóis metílico, etílico e propílico, a acetona, o pentano e diversos solventes clorados. Após a extração, o solvente é removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, obtendo-se um extrato denso e resinoso (KITZBERGER, 2005; BISCAIA, 2007).

Os procedimentos de extração clássicos possuem desvantagens como tempos de operação longos, grande quantidade de operações laboratoriais, manuseio de grandes volumes de solventes, com subsequente etapa de concentração do extrato, o que pode resultar em degradação térmica dos compostos de interesse. Além disso, o solvente pode provocar alterações químicas nas moléculas e causar efeitos tóxicos nos consumidores (SCALIA; GIUFREDDA; PALLADO, 1999).

As técnicas modernas de extração, como a microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*), extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*), extração assistida por micro-ondas (MAE - *Microwave Assisted Extraction*), extração com fluido supercrítico (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*) e extração com líquidos pressurizados (PLE - *Pressure Liquid Extraction*), conhecida também como extração por fluido pressurizado (PFE - *Pressurized Fluid Extraction*) ou extração acelerada com solvente (ASE - *Accelerated Solvent Extraction*), apresentam algumas vantagens em relação às técnicas clássicas. São técnicas mais rápidas, utilizam menores quantidades de solvente, diminuem a degradação da amostra, podem eliminar a etapa de limpeza ou *clean up* da amostra, eliminam etapas de concentração antes das análises cromatográficas, melhoram a eficiência de extração e a seletividade, além de serem de fácil automação (JACQUES, 2005).

O uso de solventes alternativos como alcoóis etanol e dióxido de carbono (CO₂) supercrítico tem aumentado devido aos problemas de toxicidade e alterações químicas nas moléculas dos solventes orgânicos comumente empregados. De maneira geral, os solventes alternativos

podem ser menos eficientes que os solventes tradicionais devido à menor afinidade molecular entre solvente e soluto, mas são menos tóxicos (DONELIAN, 2004; LI; PORDESIMO; WEISS, 2004).

Cada um dos processos aqui citados pode produzir extratos de qualidade. Entretanto, a temperatura elevada e o uso de solventes orgânicos podem conferir aos extratos características de qualidade diferentes das características originais. Associado com as elevadas temperaturas empregadas no processo estão os danos causados aos componentes, altamente sensíveis, de aromas, fragrâncias e princípios ativos farmacêuticos e a perda de componentes de alta volatilidade e de baixo peso molecular, que não podem ser recuperados durante o processo e reincorporados ao extrato (KITZBERGER, 2005).

Considerando os aspectos relativos às técnicas para a obtenção de extratos, a seguir é apresentada uma breve descrição sobre as metodologias que posteriormente são aplicadas neste trabalho para a obtenção de extratos de *C. sylvestris*.

3.2.1. Soxhlet

Os óleos vegetais de sementes são obtidos tradicionalmente através de extração com Soxhlet. O processo em geral produz altos rendimentos, porém há necessidade de uma etapa posterior de eliminação do solvente após a extração, exigindo elevados gastos energéticos. Como principais desvantagens deste processo estão a baixa seletividade, a lentidão e alta temperatura de processo (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Além disso, existe a possibilidade de permanecer solvente residual no extrato, sendo indesejados para as indústrias de alimentos e farmacêuticas. Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto (VALE, 1997).

A extração com Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação (processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução em um líquido). Ainda que seja um método muito utilizado na extração de

compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (MIGUEL; ANDRADE, 1989). Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra e o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento e, em algumas ocasiões, isto pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos (MELECCHI, 2005).

Como vantagens da extração com Soxhlet, em relação ao processo por maceração, podemos citar a circulação de solvente, que permite a renovação do solvente durante o processo, aumentando o coeficiente de partição e a eficiência da extração; não há necessidade de filtração para separar a matriz vegetal do solvente contendo o soluto, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato após a extração e os riscos de perda e/ou contaminação do extrato, além de apresentar maior reprodutibilidade do que o processo por maceração (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003).

3.2.2. Maceração

O processo de maceração consiste em deixar a matéria-prima em contato com um solvente orgânico por um período pré-estabelecido do tempo, em recipiente fechado, à temperatura ambiente, sob agitação ocasional e sem renovação do solvente utilizado para extrair os compostos de interesse presentes na matéria-prima. Esta é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos. Mesmo com a utilização de agitação, esse processo pode resultar em longos períodos de extração e com baixa eficiência. (VINATORU, 2001; MICHIELIN, 2009).

Juntamente com a extração Soxhlet, a maceração é comumente aplicada nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos, com a diferença que no sistema Soxhlet a matéria-prima é extraída através do solvente aquecido em refluxo contínuo. A maceração é o método escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pela presença de oxigênio e

são solúveis à temperatura ambiente, em um solvente orgânico (MELECCHI, 2005).

A maceração é um processo estático, não seletivo e que não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre a concentração de soluto existente na matéria-prima e no solvente. Este processo é fortemente dependente do tipo de composto presente na matéria-prima, sendo influenciado por fatores que dependem da matéria-prima (natureza, tamanho de partícula, umidade e quantidade), do solvente (seletividade e quantidade) e da solubilidade dos compostos-alvo no solvente. A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho das partículas de matéria-prima e do grau de intumescimento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (JACQUES, 2005; MELECCHI, 2005).

Dentre as desvantagens do processo estão a lentidão, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da matéria-prima e a possibilidade de contaminações, quando se empregam solventes com grande quantidade de água e essa não é totalmente eliminada durante o processo posterior de evaporação. A operação de maceração pode repetir-se várias vezes, sendo o processo conhecido como maceração múltipla ou sequencial, utilizando diferentes solventes. Este processo é bastante utilizado para extração em pequena escala, tanto na indústria química quanto farmacêutica (MELECCHI, 2005).

Assim como para a extração Soxhlet, a maceração requer uma etapa posterior de eliminação do solvente, exigindo um grande dispêndio de energia. Este tipo de extração produz resíduos prejudiciais ao meio ambiente, além de extratos com a possibilidade de não estarem totalmente livres do solvente orgânico empregada no processo. Outro fator a ser considerado é o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos por um tempo prolongado, que pode causar problemas à saúde humana do operador, além resultar em poluição ambiental devido à volatilização durante a etapa de concentração (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; ÖZCAN; ÖZCAN, 2004; MA et al., 2008).

3.2.3. Extração com fluido supercrítico

O aumento da demanda por antioxidantes e outros compostos ativos naturais e a necessidade de novos compostos com atividade antimicrobiana tem estimulado pesquisas relacionadas às diferentes técnicas de extração para obtenção substâncias biologicamente ativas de diversos materiais. A técnica empregada na extração destes compostos de alto valor agregado é de fundamental importância para a definição da qualidade do produto. Devido a isso, a extração supercrítica pode ser considerada um dos novos métodos de extração potencialmente útil na obtenção de compostos com atividade biológica a partir de matrizes naturais (DÍAZ-REINOSO, 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Em 1879, Hannay e Hogarth observaram experimentalmente o aumento da solubilidade de substâncias químicas em fluidos supercríticos com o aumento simultâneo de pressão e da temperatura. Esse aumento de solubilidade foi verificado através de modificações nas propriedades desses fluidos, obtendo-se um importante avanço científico e tecnológico. Até o início da década de 1980 o uso de fluidos supercríticos em escala industrial era bastante limitado, devido às dificuldades em se operar, com segurança, em temperaturas e pressões elevadas. Mais recentemente, atividades de desenvolvimento comercial, de pesquisa e acadêmicas envolvendo a extração com fluidos supercríticos têm crescido continuamente, direcionando a sua utilização para extração de produtos com atividade biológica (MELECCHI, 2005).

O conhecimento das propriedades termodinâmicas, como solubilidade e seletividade e propriedades de transporte, como taxa de transferência de massa, é fundamental para o projeto e ampliação da escala de processos a alta pressão. A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações sobre qualidade e composição dos extratos (FERREIRA et al., 1999).

A seletividade na extração supercrítica pode ser determinada pela escolha do fluido supercrítico ou pelo ajuste de parâmetros como temperatura e pressão do processo dentro da região supercrítica, ou seja,

controlando a densidade do solvente. A definição das condições de extração (temperatura e pressão) indica o poder de solvatação do solvente. Assim, quanto maior o poder de solvatação, maior a solubilidade de um determinado composto e maior o número de compostos solubilizáveis de uma mistura. Desta forma, alta solubilidade significa baixa seletividade e vice-versa (BRUNNER, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000).

Os fluidos supercríticos apresentam muitas vantagens na extração de produtos naturais. A combinação de propriedades de líquido e gás dos fluidos supercríticos tornam esses solventes particularmente adequados para a extração por difusão em matrizes vegetais (SCALIA, GIUFREDDA; PALLADO, 1999). Por outro lado, a extração com CO₂ supercrítico exige um investimento maior devido aos custos de aquisição de equipamentos de alta pressão, mas é extremamente específica em sua atuação (DONELIAN, 2004).

Ainda dentre as vantagens, pode-se destacar a flexibilidade da extração supercrítica devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e, conseqüentemente da seletividade do solvente, pelo fato de não utilizar solventes orgânicos poluentes e, portanto, não necessitar da etapa de evaporação dos extratos para a eliminação do solvente. A degradação térmica e decomposição de compostos voláteis podem ser evitadas através do emprego de baixas temperaturas de processo e a ausência de luz e de oxigênio na operação previnem as reações de oxidação do extrato, também preservando sua qualidade (REVERCHON; DE MARCO, 2006; DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Dentre as vantagens da extração supercrítica, ainda podemos citar (MAUL, 1999; MUKHOPADHYAY, 2000; MELECCHI, 2005):

- a) Os solventes empregados são gasosos à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, permitindo que após a extração eles sejam facilmente eliminados dos extratos e recuperados;
- b) A maioria dos fluidos supercríticos utilizados é fisiologicamente seguro e inerte;

- c) As propriedades solventes dos gases comprimidos podem ser variadas, tanto pelo ajuste da temperatura e da pressão, quanto pela introdução de solventes orgânicos (modificadores) que mudem a polaridade dos fluidos, possibilitando extrações multifase e fracionamento do extrato nos compostos desejados, através do aumento da solubilidade do material a ser extraído;
- d) A pressão do processo é ajustada via compressão mecânica;
- e) Os solventes podem ser reutilizados, possibilitando baixo custo.

Como desvantagens da extração supercrítica devem ser consideradas (MELECCHI, 2005):

- a) O custo inicial do processo é elevado devido ao valor dos equipamentos utilizados;
- b) Compostos muito polares dificilmente são extraídos pelo CO₂ sem adição de um solvente modificador adequado.

Um extrato obtido com CO₂ supercrítico pode ser considerado como natural e os produtos obtidos podem ser aplicados na indústria alimentícia ou farmacêutica por possuírem *status* de substância geralmente reconhecida como segura (*Generally recognized as safe* - GRAS). O elevado gradiente (entre a etapa de extração e a separação da mistura soluto/solvente) de pressão pode produzir extratos livres de micro-organismos e seus esporos, com uma maior vida útil comparado com extratos obtidos com solventes orgânicos (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

A extração supercrítica a partir de matrizes sólidas é uma aplicação bastante difundida pelo mundo, especialmente nas áreas de extração de princípios aromáticos de especiarias (óleos e oleoresinas), remoção de nicotina do tabaco, óleos essenciais de frutas e sementes, a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo na indústria cervejeira, a produção de bases para cosméticos a partir do resíduo da cervejaria; a descafeinização do café e do mate, obtenção de carotenos

da cenoura, a extração de óleos essenciais de plantas, a retificação e desodorização de óleos comestíveis em geral, a remoção de colesterol de ovos e tecidos animais, entre várias outras aplicações. Para fins farmacêuticos, a tecnologia supercrítica é voltada principalmente para a extração de compostos a partir de plantas medicinais. Na área química, as aplicações estão relacionadas à formulação, onde a dissolução em CO₂ supercrítico reduz a viscosidade de tintas, permitindo uma redução de 30 a 60 % na concentração de solvente orgânico. Outras aplicações em desenvolvimento, por exemplo, estão na área têxtil (tingimento de fibras têxteis), extração de lanolina de lã e na extração de contaminantes do solo (metais pesados e pesticidas) (MUKHOPADHYAY, 2000; PERRUT, 2001; MELECCHI, 2005).

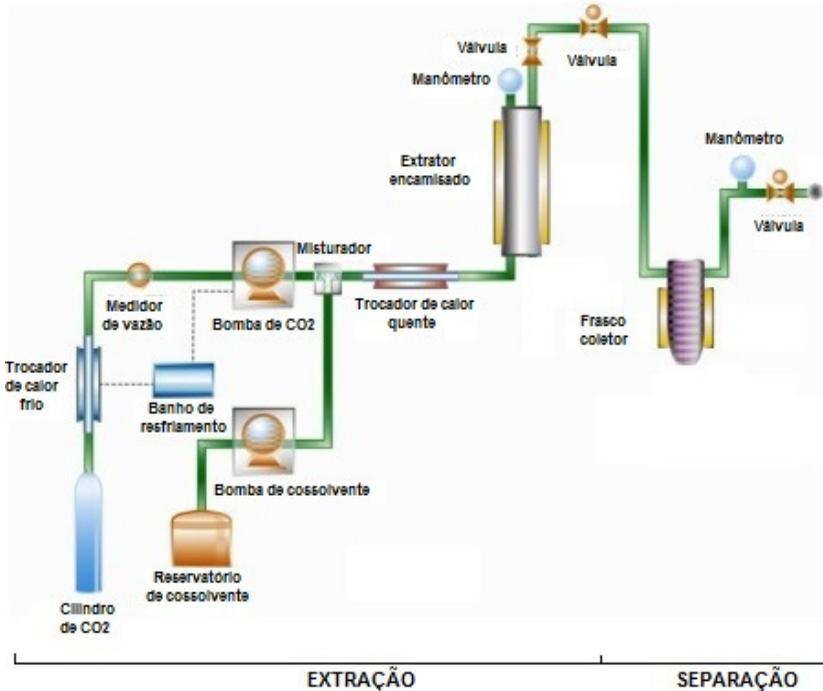
Depois de extraídos os compostos de interesse da matriz, esta pode ser usada em outras aplicações como alimentação animal, por exemplo, por não possuir solvente residual (MEZZOMO, 2008).

3.2.3.1. Princípios da extração com fluido supercrítico - Método dinâmico

A extração supercrítica de uma matriz sólida com o emprego de fluidos pressurizados consiste de duas etapas de processo: a solubilização do soluto no solvente supercrítico e a separação da mistura soluto/solvente. Durante o processo de extração, o solvente supercrítico flui através de um extrator com o leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os componentes passíveis de extração do sólido. O esgotamento do sólido ocorre na direção do escoamento, enquanto a massa de extrato na fase solvente aumenta na mesma direção. O solvente sai do extrator, carregando os compostos solubilizados, e passa através de uma válvula de expansão, onde o extrato é liberado do meio gasoso devido à menor pressão e coletado (PELLERIN, 1991; BRUNNER, 1994; REVERCHON; DE MARCO, 2006). Como vantagem da extração supercrítica tem-se a fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração, podendo o mesmo ser continuamente reciclado (MICHIELIN, 2002).

A Figura 3.5 representa esquematicamente um equipamento de extração supercrítica de matrizes sólidas, mostrando desde a etapa de extração até a separação da mistura soluto-solvente.

Figura 3.5 - Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas.



Fonte: Adaptado de Waters (2013).

O princípio de extração com fluido supercrítico utiliza as propriedades físicas destes fluidos no estado supercrítico e suas interações moleculares que podem ser fortes, permitindo diminuir suas distâncias intermoleculares e aumentar sua capacidade de dissolução para várias substâncias químicas (KNOWLES et al., 1988).

Os fatores determinantes do processo de extração são o poder de solubilização e a seletividade do solvente com relação aos componentes de interesse, a capacidade de difusão destes no fluido e a distribuição dos compostos a serem extraídos no substrato. Cada uma

destas distribuições tem alguma influência sobre a extração. Além disso, o material sólido pode ser constituído de partículas de variadas formas e tamanhos, formando uma matéria-prima heterogênea. O leito de partículas pode formar diferentes geometrias e tamanhos e, ainda, podem ocorrer alterações neste durante o processo (BRUNNER, 1994).

A resistência à transferência de massa no interior das partículas sólidas, na maior parte das vezes, é dominante no processo, uma vez que a maior parte do soluto está dispersa no interior das partículas e é liberado através do processo difusivo. Para reduzir esta resistência e aumentar o rendimento de extração pode-se reduzir o tamanho das partículas, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o soluto percorre no interior da partícula porosa. Partículas grandes fornecem maior resistência para que o solvente percorra as diferentes camadas de partículas. As partículas pequenas formam camadas densas, as quais diminuem a formação de canais para o escoamento de fluidos. A redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois partículas muito pequenas tendem a formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito, formar caminhos preferenciais, além de proporcionar perda de compostos voláteis durante o processo de moagem (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ, 2005).

Sovová, Kucera e Jez (1994) estudaram o efeito da moagem de sementes de uva sobre a taxa de extração do óleo. Demonstraram que a redução do tamanho de partícula aumenta a área superficial e libera o soluto do interior das sementes, implicando em um aumento da taxa de extração. Ao final da extração, partículas menores atingiram maiores rendimentos.

Mira et al. (1999) avaliaram os efeitos das condições de operação na composição do óleo essencial da casca de laranja. O tamanho das partículas variou de 0,1 a 10 mm, sendo verificado que, para partículas menores que 2 mm, a extração ocorre mais rapidamente. A taxa de extração diminuiu com o aumento da granulometria da amostra devido à resistência ao processo difusivo no interior da partícula.

Segundo Brunner (1994), a extração de compostos solúveis em um material vegetal consiste de cinco etapas:

- a) A matriz vegetal adsorve o solvente supercrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;
- b) Ocorre a dissolução dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente;
- c) Acontece a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície;
- d) Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;
- e) Os compostos solubilizados são transportados convectivamente da superfície das partículas para o solvente supercrítico e são removidos com o solvente.

Brunner (1994) cita que a razão de solvente, definida como a razão entre a vazão mássica de solvente (kg/s) e a massa de sólidos (kg), é um dos fatores mais relevantes para o processo de extração. O aumento da vazão mássica de solvente para uma quantidade fixa de sólidos pode resultar em uma redução da carga do solvente, devido a um menor tempo de residência. No entanto, devido à maior vazão, a velocidade de extração tende a aumentar até um valor máximo a partir do qual pode sofrer um declínio.

Quando um leito fixo de sólidos é colocado em contato com um fluxo de CO₂ os mecanismos de transporte de massa envolvem a difusão e adsorção do fluido supercrítico seguido pela desorção do soluto, difusão através dos poros e transporte convectivo, juntamente com o fluido supercrítico através do leito. O principal fator é a distribuição inicial das substâncias passíveis de extração no interior da matriz sólida, que podem estar adsorvidas na superfície da partícula, na superfície dos poros ou dissolvidas no citoplasma ou no interior das células das plantas. Cada uma destas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

A etapa de desorção e difusão do soluto no fluido supercrítico através dos poros é a mais longa, pois quando há um filme líquido de óleo presente na superfície externa das partículas sólidas a transferência de massa ocorre a uma taxa constante, dependendo da solubilidade do soluto no solvente, enquanto a taxa de transferência de massa é controlada pela resistência à transferência de massa no filme externo. No entanto, se não existir um filme líquido presente na superfície externa das partículas não ocorrerá um período de taxa constante de extração e a transferência de massa ocorrerá em taxa decrescente, sendo este período controlado pela resistência interna à difusão (MUKHOPADHYAY, 2000).

3.2.3.2. Fluido supercrítico

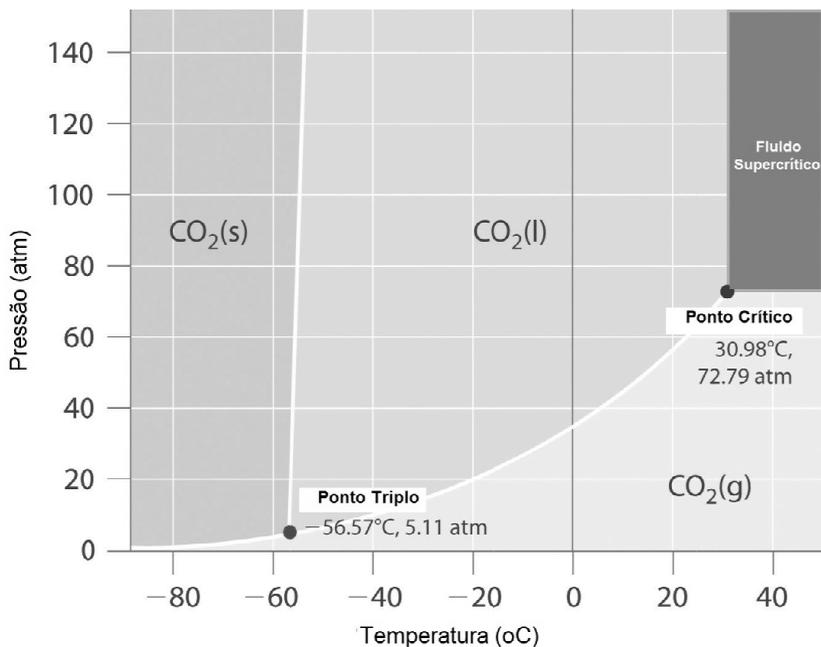
Os fluidos supercríticos são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão críticas, onde as propriedades de líquido e de gás se tornam idênticas. A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. Na zona próxima a do ponto crítico é onde se produzem, com pequenas alterações de pressão e temperatura, as maiores variações da densidade do fluido supercrítico e, por consequência, do seu poder solvente. Caso uma destas propriedades (pressão ou temperatura) se encontre abaixo do ponto crítico, diz-se que a substância está no estado subcrítico (BRUNNER, 1994; ARAÚJO, 1999; BERNARDO-GIL; RIBEIRO; ESQUÍVEL, 2002).

A Figura 3.6 mostra um diagrama de fases, onde as regiões de gás, líquido, sólido e fluido supercrítico são apresentadas para o CO_2 puro.

Os fluidos supercríticos apresentam viscosidade baixa semelhante à de um gás, alta densidade como os líquidos e difusão intermediária entre gases e líquidos, variando com a sua densidade. As características de gás ajudam na difusão do fluido na matriz e o acesso

aos compostos de interesse, enquanto que as características de líquido proporcionam um melhor poder de solvatação. Adaptam-se facilmente a separações difíceis, não somente por permitirem a separação de materiais instáveis termicamente, mas devido à alta compressibilidade e solubilidade, além de efetuarem separações com pequenas variações de pressão (SILVA; LIBERAL; PESSOA; 1997). Todas estas características fazem com que os fluidos supercríticos tenham maiores taxas de transferência de massa, no processo de extração de um soluto do que as operações que empregam solventes orgânicos (MAUL, 1999).

Figura 3.6 - Representação esquemática do comportamento do CO₂ puro em um diagrama de fase P-T.



Fonte: Adaptado de Averill e Eldredge (2010).

A Tabela 3.2 apresenta as propriedades de densidade, viscosidade e difusividade dos fluidos supercríticos comparadas às propriedades dos líquidos e dos gases.

Tabela 3.2 - Comparação das propriedades físicas de líquido, gás e fluidos supercríticos.

Estado físico	Densidade (g/cm³)	Viscosidade (g/cm.s)	Difusividade (cm²/s)
Líquido	0,6 - 1,6	0,2 - 0,3·10 ⁻²	0,2 - 2,0·10 ⁻⁵
Gás	0,6 - 2,0·10 ⁻³	1 - 3·10 ⁻⁴	0,1 - 0,4
Fluido supercrítico			
P_c, T_c	0,2 - 0,5	1 - 3·10 ⁻⁴	0,7·10 ⁻³
4P_c, T_c	0,4 - 0,9	3 - 9·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻³

Fonte: MUKHOPADHYAY, 2000.

O CO₂ é o fluido mais utilizado como solvente seja como fluido supercrítico ou líquido subcrítico, uma vez que suas características se assemelham a de um solvente ideal, sendo indicado para uma grande faixa de substratos naturais (FERREIRA, 1996). O CO₂ supercrítico é um solvente não polar e sua seletividade de extração pode ser ajustada para cada substrato, mudando-se a temperatura e a pressão dentro da região supercrítica (ARAÚJO, 1999; MELECCHI, 2005).

De forma geral, a extração com CO₂ supercrítico apresenta algumas particularidades (MICHIELIN, 2002; MELECCHI, 2005):

- a) Compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos, são facilmente extraídos;
- b) Substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos, não são solúveis;
- c) O CO₂ apresenta baixa temperatura crítica (31,04 °C), conduzindo a extração em temperaturas suficientemente baixas para não alterar as propriedades sensoriais e químicas dos extratos, e baixa pressão crítica (73,8 bar), sendo de fácil obtenção e trabalho em processos de produção industrial;

- d) É um gás inerte, não oferecendo riscos de reações secundárias como oxidação, redução, hidrólise e degradação química;
- e) É um gás seguro, pois o CO₂ é inofensivo, não explosivo, não poluente, não tóxico e de uso significativo na gaseificação de bebidas;
- f) A polaridade do CO₂ é próxima à do pentano e do hexano, solventes comumente usados em extrações tradicionais;
- g) É um gás versátil, pois os parâmetros de extração com CO₂ supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de modificadores ou pela seleção das condições de temperatura e pressão.

Existem outros fluidos (Tabela 3.3) que também apresentam, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades. Porém, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente (MAUL, 1999; MELECCHI, 2005).

O CO₂ supercrítico é utilizado principalmente como solvente na extração de compostos de alto valor agregado oriundos de produtos naturais, sendo bastante apropriado para a extração de antioxidantes como carotenoides e outros antioxidantes lipofílicos. Compostos polares, como flavonoides e ácidos fenólicos, são menos solúveis no CO₂ supercrítico, necessitando a utilização de um cossolvente para melhorar a extração destes compostos (DÍAZ-REINOSO et al., 2006), como descrito no item 3.2.3.3.

A Tabela 3.3 apresenta uma lista dos fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica, e os valores de temperatura e pressão críticas e densidade.

3.2.3.3. Utilização de cossolventes ao fluido supercrítico

O uso de cossolventes ou modificadores é proposto como forma de melhorar a solubilidade dos compostos desejados e/ou aumentar a

seletividade da extração (pela mudança de polaridade da mistura), aumentando o rendimento da extração (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Tabela 3.3 - Fluidos supercríticos mais utilizados na extração supercrítica e valores de temperatura, pressão e densidade críticas.

Tipo de fluido	Composto	T_c (°C)	P_c (atm)	ρ_c (g/cm³)
Inorgânicos	CO ₂	31	72,85	0,469
	NH ₃	133	111,54	0,236
	H ₂ O	374	217,17	0,323
	N ₂ O	36	71,50	0,452
Hidrocarbonetos	Metano	-82	45,41	0,169
	Etano	32	48,17	0,203
	Propano	97	41,85	0,217
	Pentano	197	33,26	0,237
	Etileno	9	49,65	0,218
	Benzeno	289	49,65	0,218
	Tolueno	319	40,57	0,292
Compostos oxigenados	Metanol	240	79,86	0,272
	Etanol	241	60,61	0,276
	Acetona	235	46,39	0,279
	Éter etílico	194	35,93	0,265
Compostos nitrogenados	Piridina	347	55,57	0,312

T_c: Temperatura crítica; P_c: pressão crítica; ρ_c:densidade crítica.

Fonte: HIERRO; SANTA-MARIA, 1991.

Os cossolventes são solventes orgânicos que apresentam volatilidade intermediária entre o solvente supercrítico e o soluto a ser extraído, sendo adicionados em pequenas quantidades para alterar as características da mistura cossolvente/solvente, tais como polaridade e interações específicas com o soluto (pontes de hidrogênio), podendo interagir com sítios ativos da matriz sólida e favorecer a difusão do CO₂ para extrair os compostos desejados, sem mudar de forma significativa a

densidade e compressibilidade do solvente supercrítico original (MUKHOPADHYAY, 2000; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como cossolventes na extração supercrítica. O etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos (MICHIELIN, 2009).

3.2.3.4. Curvas de extração supercrítica

O estudo da curva de extração supercrítica pode ajudar a definir o volume do extrator e a vazão necessária de solvente para a taxa de extração desejada (CARVALHO JÚNIOR, 2004). Isto é possível pelo conhecimento termodinâmico do sistema (solubilidade e seletividade) bem como a cinética do processo (taxa de transferência de massa) (FERREIRA; MEIRELES, 2002).

A solubilidade de um soluto em um fluido supercrítico é um dado de equilíbrio que representa a máxima concentração de soluto na fase solvente, sendo obtida experimentalmente pelo método dinâmico, a partir da inclinação da etapa de taxa constante de extração. Assim, para a obtenção da solubilidade em processos de extração em leito fixo a vazão de solvente deve ser baixa de tal forma que permita a saturação do solvente com o soluto de interesse, e/ou o extrator suficientemente longo para que, durante o tempo de contato entre o soluto e solvente, o equilíbrio entre as fases seja alcançado (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999).

De acordo com a literatura, as curvas de extração são geralmente divididas em três etapas e são determinadas pela massa total de óleo extraído em função do tempo de extração (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; FERREIRA; MEIRELES, 2002):

1) Etapa de taxa constante de extração (CER - *Constant extraction rate*), onde a superfície externa das partículas está

completamente coberta de óleo e há o predomínio da transferência de massa devido à convecção do soluto na fase fluida;

2) Etapa de taxa de extração decrescente (FER - *Falling extraction rate*), onde a velocidade do processo é determinada pelos efeitos convectivos na fase fluida e difusionais na fase sólida;

3) Etapa difusional ou etapa de taxa de extração nula (DCP - *Diffusion-controlled period*), onde a taxa de transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo no sólido (remoção do soluto da parte interna da partícula sólida).

A transição entre o período de taxa constante e decrescente de extração é influenciado pelo tamanho de partícula, pelo conteúdo inicial de óleo no sólido e pela estrutura celular do material. Partículas grandes causam um aumento no período difusional e o período de taxa decrescente de extração ocorre antes do que em partículas de menor tamanho. Quando o material possui alto conteúdo de óleo, a transferência de massa ocorre predominantemente em taxa constante, sendo a taxa de extração controlada pela solubilidade do substrato no solvente. A cinética de transferência de massa depende de quanto, onde e como o soluto é liberado da matriz celular, do mecanismo de separação do soluto, do tipo de transporte do soluto, dentre outros parâmetros como pressão, temperatura, fluxo de solvente e tamanho de partícula (MUKHOPADHYAY, 2000).

As curvas de extração são obtidas através da relação apresentada na Equação 3.1, onde a concentração de soluto na fase solvente varia com o tempo de extração (BRUNNER, 1994).

$$m_{EXT} = Q_{CO_2} \int_0^{t_{Total}} y(t) dt \quad (3.1)$$

onde m_{EXT} é a massa de extrato obtida (kg); Q é a vazão de solvente (kg/s); t é o tempo (s) e $y(t)$ é a concentração de soluto na fase solvente (kg/kg).

A maioria dos modelos matemáticos que descrevem o mecanismo de transferência de massa emprega parâmetros como a

vazão do solvente, o teor de óleo extraível e as características das partículas sólidas, como diâmetro e porosidade do leito (KITZBERGER, 2005).

A representação da curva de extração supercrítica pode ser utilizada na determinação de parâmetros como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica; determinação da solubilidade e modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004). A modelagem destas curvas permite a obtenção de informações relacionadas com a pressão, temperatura e vazão de solvente, o que possibilita a ampliação de escala dos processos de extração supercrítica (PERRUT, 2001).

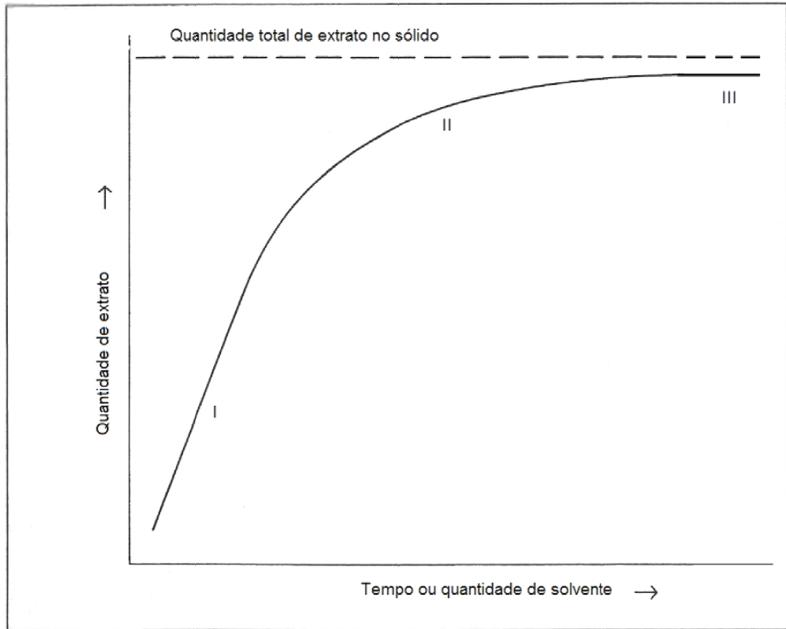
A curva de extração supercrítica é ilustrada na Figura 3.7, onde a etapa *I* é o período de taxa de extração constante (CER), a etapa *II* é o período de taxa decrescente de extração (FER) e a etapa *III* é o período de taxa de extração nula ou período difusivo (DCP) (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; MARTÍNEZ et al., 2003; MEZZOMO, 2008).

3.3. Equilíbrio de fases a alta pressão

Existem diferentes formas de serem obtidas informações sobre o comportamento do equilíbrio de fases de misturas, como sistemas multicomponentes formados por extratos de produtos naturais e solventes como o dióxido de carbono. A medição direta de dados de equilíbrio de fases é uma importante fonte de informações, mesmo que seja difícil e oneroso tornar essa medida precisa (DOHRN, BRUNNER, 1995).

Informações experimentais sobre o equilíbrio de fases à alta pressão são importantes para processos de extração, separação e precipitação de compostos envolvendo misturas, mesmo quando modelos termodinâmicos são utilizados para prever o comportamento de fases desses sistemas. Os modelos termodinâmicos reduzem o número necessário de experimentos, mas, mesmo assim, há necessidade de serem obtidos alguns dados experimentais para o ajuste dos parâmetros de interação desses modelos (DOHRN; BRUNNER, 1995).

Figura 3.7 - Curva genérica de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração, onde *I* é o período de taxa constante de extração (CER), *II* é o período de taxa decrescente de extração (FER) e *III* é o período de taxa de extração nula ou período difusivo (DCP).



Fonte: BRUNNER, 1994.

O equilíbrio de fases de sistemas contendo fluidos supercríticos pode ser afetado significativamente por uma pequena quantidade de cossolvente, especialmente em casos em que existam interações específicas entre o soluto e o cossolvente, sendo que essas interações são um fator importante para o aumento da solubilidade (ZHONG et al., 1997).

3.3.1. Determinação experimental de dados de equilíbrio de fases

Diversos trabalhos na literatura apresentam e discutem métodos experimentais para determinação do equilíbrio de fases a altas pressões, como por exemplo, Dohrn e Brunner (1995), McHugh e Krukonic

(1994), entre outros. O equilíbrio de fases a altas pressões pode ser determinado por diferentes metodologias experimentais. As técnicas usadas para esta investigação podem ser classificadas de acordo com o método empregado para analisar a composição das fases ou de acordo com a maneira pela qual uma fase se desloca em relação à outra (DOHRN; BRUNNER, 1995; DARIVA, 2000; ROSSO, 2009). A seleção da técnica mais adequada depende basicamente de três fatores: custo, propriedades físico-químicas dos componentes envolvidos e condições de operação dos experimentos (LANZA, 2004).

No Quadro 3.1 são apresentadas considerações sobre os principais métodos experimentais para determinação do equilíbrio de fases, como aplicações indicadas, vantagens e desvantagens do método.

A principal característica dos métodos estáticos está no fato da célula de equilíbrio, uma vez carregada, permanecer fechada até que o equilíbrio seja estabelecido. Neste método, a composição das fases em equilíbrio é determinada indiretamente, sem a necessidade de amostragem (uma das vantagens do método), sendo possível localizar a região de transição de fases e traçar as curvas de bolha e/ou orvalho para sistemas líquido-vapor, líquido-líquido e sólido-fluido. Desta forma, o valor da pressão no instante em que ocorre ponto de orvalho ou de bolha para certa temperatura corresponde à condição em que a composição global do sistema é igual à composição da fase vapor ou líquida, respectivamente. Como outras vantagens do método estático-sintético têm-se a preservação do sistema contra distúrbios na pressão (provocados pela retirada de amostra), procedimento experimental simplificado e utilização de pequenas quantidades de solvente e soluto em cada experimento, o que permite reduzir os custos experimentais (LANZA, 2004; ROSSO, 2009).

3.3.2. Sistemas complexos e multicomponentes

Misturas contendo muitos componentes são frequentemente encontradas em sistemas reais. Como exemplos, tem-se o extrato de plantas, frações de óleo mineral ou líquidos resultantes da pirólise de hidrocarbonetos. Em muitos casos, a concentração da maioria dos

Quadro 3.1 - Características gerais dos métodos experimentais de determinação de equilíbrio de fases a altas pressões.

Método	Aplicações	Vantagens	Desvantagens
Dinâmico Extrativo	<ul style="list-style-type: none"> - Determinação de solubilidade de sólidos e líquidos muito viscosos em solventes pressurizados. - Extração ou fracionamento de componentes de fases pesadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidade de construção e operação. - Detecção de baixos valores de solubilidade. - Baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação restrita a sistemas bifásicos. - Apenas a fase leve é analisada.
Dinâmico Contínuo	<ul style="list-style-type: none"> - Sistemas envolvendo compostos termolábeis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo tempo de residência na zona de temperatura elevada. - Análise de ambas as fases. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicável somente ao equilíbrio fluido-fluido. - Flutuação na pressão. - Não indicado para regiões próximas ao ponto crítico da mistura. - Alto custo de construção/consumo de compostos.
Estático Sintético	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dispensa amostragem. - Não há perturbação do sistema. - Custo de construção relativamente baixo e operação simples. - Identificação do tipo de equilíbrio e transição. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil aplicação a sistemas multifásicos.

<p>Estático Analítico</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Qualquer sistema envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido ou sólido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicado tanto a sistemas bifásicos quanto a sistemas multifásicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Prevê amostragem, o que pode ocasionar perturbações ao sistema. - Não recomendado para regiões próximas ao ponto crítico da mistura. - Alto custo de operação.
<p>Com Recirculação</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sistemas envolvendo equilíbrio de fases fluido-fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução no tempo de equilíbrio. - Amostragem facilitada e segura, reduzindo a possibilidade de perturbação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo total do equipamento. - Alta complexidade de operação.

Fonte: Lanza (2004) adaptado por Rosso (2009).

componentes pode ser pequena, quando comparada à concentração do composto principal e, nestes casos, o comportamento de fases deve ser representado com precisão unicamente para os componentes principais. Por outro lado, em alguns processos envolvendo misturas multicomponentes, os compostos com baixa concentração podem ser acumulados em frações minoritárias, necessitando que estes compostos sejam considerados no comportamento de fases, porque nessas frações o percentual do componente minoritário será elevado (BRUNNER, 1994).

Em alguns processos, os compostos minoritários são os componentes de interesse e a sua distribuição nas fases em equilíbrio é importante, como por exemplo, para a concentração desses compostos durante a extração. O uso de compostos individuais para representação

de equilíbrios de fases de sistemas complexos depende do propósito para o qual os dados obtidos serão utilizados (BRUNNER, 1994).

A diferença entre misturas multicomponentes e misturas complexas é arbitrária. Uma mistura multicomponente é uma mistura contendo mais de três componentes, onde todos os compostos são identificados, enquanto que uma mistura complexa é uma mistura contendo mais de três componentes, onde o número total de compostos é desconhecido e muitos dos compostos não são identificados (BRUNNER, 1994).

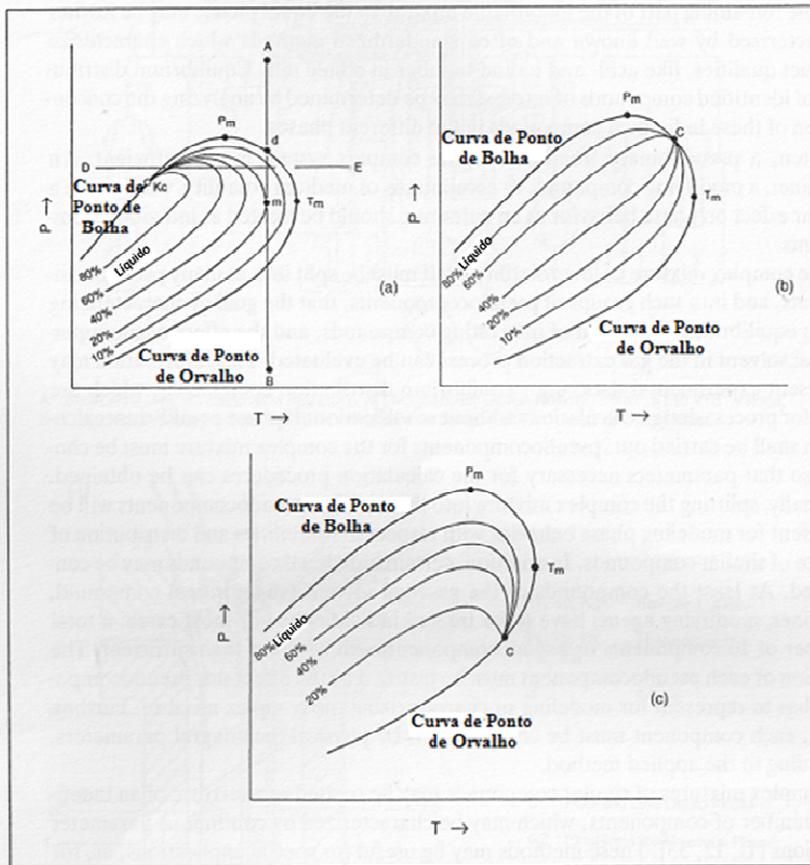
3.3.3. Comportamento de fases de misturas complexas

Considerando uma mistura complexa, completamente miscível na fase líquida, o comportamento de fases completo deste sistema em relação às curvas de ponto de orvalho e bolha e à quantidade de líquido ou gás pode ser representado em um diagrama P-T, de acordo com a Figura 3.8.

As curvas de ponto de orvalho e de ponto de bolha limitam a região de duas fases gás-líquido. No ponto crítico as fases líquida e gasosa tornam-se idênticas e a pressão e a temperatura neste ponto não representam, necessariamente, condições extremas para a região de duas fases. O ponto crítico é normalmente o limite superior ou inferior da curva, sendo situado somente por coincidência em um valor extremo de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

Se as condições de estado de uma mistura complexa (em geral, de qualquer mistura de dois ou mais componentes) são modificadas de forma isobárica, isto é, do ponto *A* para *B* na Figura 3.8 (*a*), a redução da pressão causa condensação de líquido em certa região (do ponto *d* para *m*), também chamada de *condensação retrógrada*. Já, se as condições de estado de uma mistura complexa são modificadas de forma isotérmica, uma condensação retrógrada similar pode ocorrer se a temperatura da mistura complexa é aumentada, à pressão constante, ao longo da linha *DE* (Figura 3.8 (*a*)). Considerando uma reversão na modificação das condições, pode ocorrer *evaporação retrógrada* pelo aumento da pressão ou diminuição da temperatura (BRUNNER, 1994).

Figura 3.8 - Equilíbrio de fases de misturas complexas representados em diagramas P-T com diferentes posições de ponto crítico.



Fonte: BRUNNER, 1994.

A extensão da área de duas fases no plano P-T depende da volatilidade dos componentes. De acordo com King (1969) para sistemas binários, a área de duas fases de uma mistura equimolar é dependente da semelhança entre as volatilidades dos componentes. Para compostos com volatilidade similar, a área de duas fases é muito pequena, enquanto que para compostos com volatilidade diferentes, a área é muito maior (BRUNNER, 1994).

Misturas multicomponentes e complexas apresentam comportamento de fases no diagrama P-T similar aos sistemas binários e o tamanho da área de duas fases também é determinado pelos componentes mais e menos voláteis presentes no sistema. Na extração com gases, o componente mais volátil é o solvente supercrítico e os compostos da mistura a ser separada são menos voláteis. Se uma mistura complexa de volatilidade baixa é considerada como um pseudocomponente, um sistema pseudobinário é formado com o gás supercrítico e os fenômenos de equilíbrio de fases binário, como imiscibilidade líquido-líquido e curvas críticas interrompidas, podem ocorrer (BRUNNER, 1994).

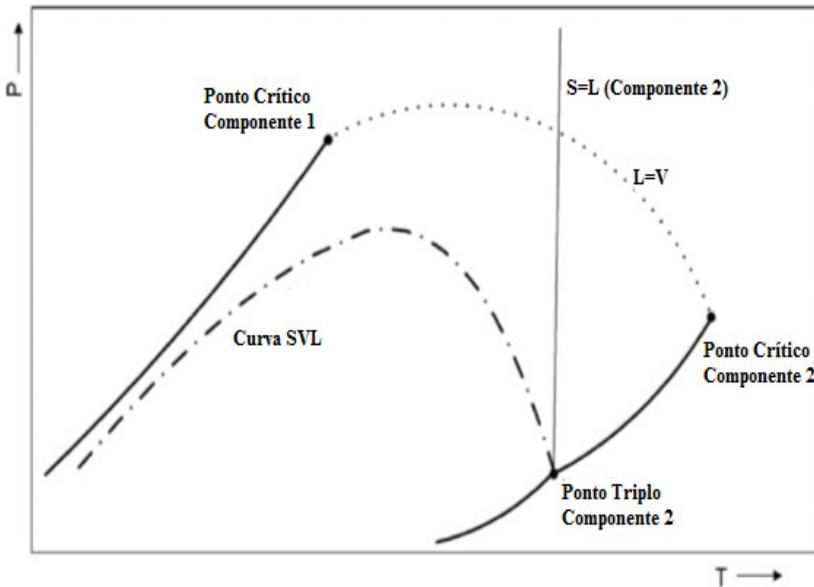
3.3.4. Comportamento de fases do equilíbrio sólido-líquido-vapor

O comportamento de fases de sistemas formados por sólidos e fluidos supercríticos ou gases pressurizados pode ser classificado basicamente em dois grupos distintos. No Grupo I estão os sistemas com compostos quimicamente similares ou sistemas em que a temperatura de fusão do sólido é menor do que a temperatura crítica do solvente gasoso. Esses sistemas exibem um comportamento de fases de acordo com o diagrama apresentado na Figura 3.9 (McHUGH; KRUKONIS, 1994).

Como principal característica do comportamento de sistemas do Grupo I tem-se que a curva de pontos críticos de equilíbrio L-V é contínua desde o ponto crítico do componente leve (Componente 1 ou gasoso) até o ponto crítico do componente pesado (Componente 2 ou sólido). A curva P-T de equilíbrio S-V-L inicia no ponto triplo do componente pesado (Componente 2) ocorrendo um aumento na pressão de transição em função da diminuição da temperatura até aproximadamente a pressão crítica do componente leve (Componente 1). Em seguida, ocorre diminuição da pressão de transição S-V-L, em função da diminuição da temperatura do sistema, de forma praticamente linear. Normalmente, aumentando-se a pressão hidrostática, ocorre um aumento na temperatura do ponto de fusão (*melting point*) do sólido puro. No entanto, quando o sólido está comprimido na presença de um fluido supercrítico, o ponto de fusão do sólido decresce com o aumento

da pressão. Segundo McHugh e Krukonis (1994), conforme a pressão aumenta, uma quantidade maior de gás dissolve-se no componente líquido pesado e, então, a temperatura necessária para solidificar o componente pesado decresce substancialmente. Esta depressão no ponto de fusão do sólido é manifestada como uma curva S-V-L (McHUGH; KRUKONIS, 1994; ROSSO, 2009).

Figura 3.9 - Diagrama esquemático P-T para um sistema binário referente ao Grupo I (sistemas com compostos quimicamente similares).

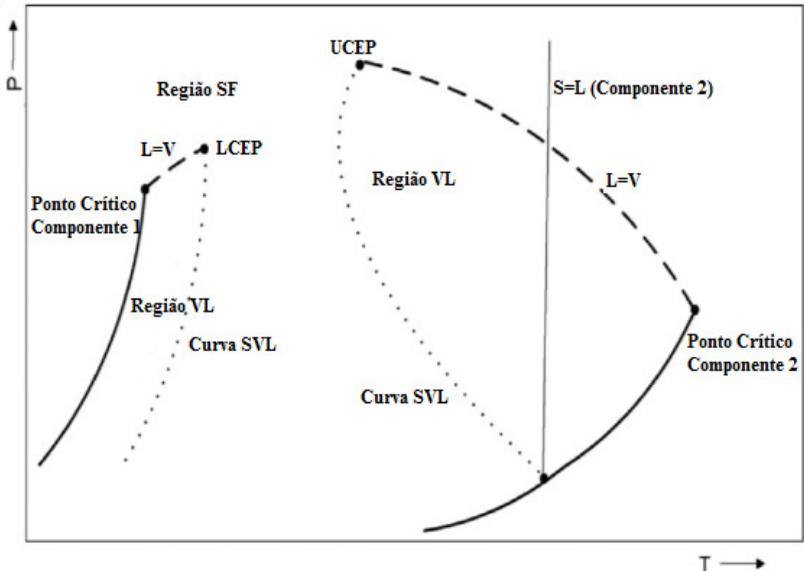


Fonte: McHUGH; KRUKONIS, 1994.

No Grupo II enquadram-se sistemas binários formados por compostos altamente assimétricos, ou seja, compostos que apresentam grande diferença no tamanho molecular, na estrutura e nas interações intermoleculares. O comportamento de fases desses sistemas pode ser descrito conforme apresentado na Figura 3.10 (McHUGH; KRUKONIS, 1994).

Duas das principais características termodinâmicas de sistemas que apresentam este tipo de comportamento pertencente ao Grupo II são: a temperatura do ponto triplo do componente pesado (Componente 2) ser maior do que o do componente leve (Componente 1) e a solubilidade deste ser bastante limitada no componente pesado (Componente 2). Estas características levam a um ponto de pressão de congelamento relativamente pequeno para o componente pesado (Componente 2). Conseqüentemente, o equilíbrio S-V-L aparece também a elevadas pressões. Neste caso, a curva S-V-L intercepta a curva dos pontos críticos líquido-vapor (L-V) no ponto de menor pressão e temperatura (LCEP: *lower critical end point*) e no ponto de maior pressão e temperatura (UCEP: *upper critical end point*). Nestes dois pontos, as fases líquida e vapor constituem uma única fase fluida na presença de sólido em excesso. Para temperaturas entre UCEP e LCEP somente equilíbrio S-V (ou S-F) é observado (McHUGH; KRUKONIS, 1994; ROSSO, 2009).

Figura 3.10 - Diagrama esquemático P-T para um sistema binário referente ao Grupo II (sistemas binários formados por compostos altamente assimétricos).



Fonte: McHUGH; KRUKONIS, 1994.

3.4. Métodos de formação de partículas utilizando fluidos supercríticos

A produção de partículas com tamanho e distribuição de tamanho controlados vem sendo estudado extensivamente nos últimos anos, tendo em vista as diversas aplicações nas indústrias química, farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrícola, entre outras (YEO; KIRAN, 2005).

A funcionalidade e a aplicação de um material micro ou nanoparticulado são dependentes de características como tamanho, distribuição de tamanho e morfologia da partícula. Nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos as formulações na faixa nano e micrométrica estão sendo amplamente utilizadas com a finalidade de aumentar a qualidade e a vida de prateleira dos produtos. Porém, estas partículas apresentam elevada área superficial, o que pode promover a degradação de compostos presentes. Uma forma de melhorar a estabilidade dos compostos ativos é através da utilização de técnicas de encapsulamento que garantam a preservação destas substâncias, ou seja, através da cobertura do princípio ativo empregando um biopolímero como agente encapsulante. Essas formulações encapsuladas mantêm os princípios ativos dos compostos de interesse protegidos contra reações de decomposição por maiores períodos de tempo, podendo também controlar a taxa de liberação no produto onde são adicionados (HERRERO et al., 2005; MEZZOMO, 2012).

Existem diversas técnicas clássicas para a produção de partículas na faixa micrométrica e/ou nanométrica, entre elas o *spray drying*, a recristalização por solvente orgânico, a micronização e a liofilização. Porém, estes métodos possuem limitações que restringem sua aplicação quando há a necessidade de alto grau de pureza e controle de tamanho e distribuição de tamanho de partículas, além de controle na morfologia (HENEZKA et al., 2005). As partículas produzidas por estas técnicas usualmente requerem etapas adicionais de secagem e micronização, tornando o processo, muitas vezes, inviável para a produção de partículas micro ou nanométricas (REVERCHON; DELLA PORTA; FALIVENE, 2002; FRANCESCHI, 2009).

As técnicas tradicionais possuem limitações como uso excessivo de solvente, podendo acarretar concentrações residuais destes no produto final, degradação química e térmica do soluto devido ao processo e dificuldade no controle do tamanho e distribuição de tamanho das partículas durante o processamento, assim como baixos rendimento e eficiência de encapsulamento (JARMER; LENGSELD; RANDOLPH., 2003; ELVASSORE et al., 2003; HE et al., 2006).

Atualmente, técnicas empregando fluidos pressurizados para obtenção de micro e nanopartículas são fonte de pesquisas em diversos setores industriais e acadêmicos como alternativa aos processos tradicionais. Esses fluidos, em estado sub ou supercríticos, produzem partículas com estreita distribuição de tamanho, além de altos percentuais de encapsulamento (KALOGIANNIS; MICHAILOF; PANAYIOTOU, 2006; MEZZOMO, 2012). Ainda como vantagens do processo com fluidos supercríticos estão a alta pureza dos produtos obtidos, a modificação das propriedades do material como tamanho de partícula, controle do polimorfismo dos cristais e morfologia, a possibilidade de processar moléculas termossensíveis, o processo em estágio único e ambientalmente aceitável (FAGES et al, 2004), além da facilidade de explorar as propriedades dos fluidos supercríticos através do ajuste da temperatura e/ou pressão do sistema (MIGUEL et al., 2008; COCERO et al., 2009).

Considerando essas vantagens, diversos processos de precipitação baseados em fluidos supercríticos foram desenvolvidos e continuam sob pesquisas. Os processos supercríticos podem ser classificados de acordo com a função do fluido supercrítico no processo: solvente, antissolvente, cossolvente ou soluto, ou ainda como gás propelente (COCERO et al., 2009).

As técnicas de recristalização que empregam fluidos pressurizados como solvente são os métodos RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions* - Rápida Expansão de Soluções Supercríticas) e SSI (*Supercritical Solvent Impregnation* - Impregnação por Solvente Supercrítico); como soluto é o método PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions* - Partículas a partir de Soluções Saturadas

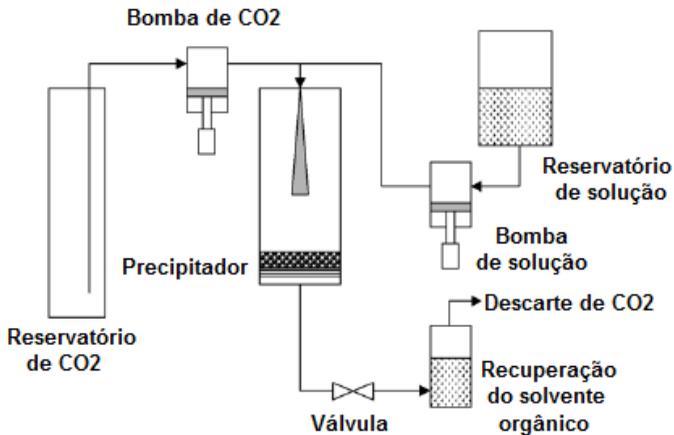
de Gás); e como antissolvente são os métodos SFEE (*Supercritical Fluid Extraction of Emulsions* - Extração Supercrítica de Emulsões, também chamado de SAS de Emulsão) e GAS (*Gas Antisolvent* - Gás Antissolvente), bem como suas variações como método SAS (*Supercritical Antisolvent* - Antissolvente Supercrítico), PCA (*Precipitation with a Compressed Antisolvent* - Precipitação com Antissolvente Comprimido), ASES (*Aerosol Solvent Extraction System* - Sistema de Extração de Solvente em Aerossol), SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids* - Dispersão da Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos), onde a diferença entre as técnicas está no modo como o antissolvente e a solução orgânica contendo o material a ser precipitado são colocados em contato (YEO; KIRAN, 2005; COCERO et al., 2009; FRANCESCHI et al., 2009).

Nos métodos de antissolvente supercrítico, o fluido supercrítico pode ser fácil e totalmente removido do produto final pela redução da pressão. Para os casos em que o CO₂ supercrítico é utilizado como antissolvente, o processo pode ser conduzido em faixas de temperatura e pressão próximas às condições ambientais, prevenindo a degradação térmica e oxidação do produto final, uma vez que o produto precipitado está sob a ação de uma atmosfera inerte (COCERO; FERRERO, 2002). Na literatura são encontrados diversos trabalhos com uma ampla revisão sobre dos fundamentos e aplicações dos processos de precipitação e encapsulamento utilizando fluidos supercríticos, entre eles os trabalhos de Jung e Perrut (2001), Yeo e Kiran (2005), Martín e Cocero (2008) e Cocero et al. (2009).

O princípio básico dos métodos antissolvente, em especial da metodologia SAS, fundamenta-se em colocar em contato uma solução contendo o(s) soluto(s) de interesse, completamente miscível(is) em um solvente líquido, com um fluido supercrítico, sendo o(s) soluto(s) imiscível(is) ou pouco miscível(is) no antissolvente (fluido supercrítico). Ainda, o solvente orgânico deve possuir uma afinidade maior pelo antissolvente do que pelo(s) soluto(s). Quando a solução é posta em contato com o antissolvente, a solubilidade do(s) soluto(s) no solvente orgânico é reduzida, devido à diminuição do poder de

solvatação do solvente orgânico causado pelo antissolvente supercrítico, saturando o solvente orgânico e levando à precipitação do(s) soluto(s) na forma particulada. O contato entre a solução e o fluido supercrítico é rápido, gerando uma elevada supersaturação da solução, o que resulta em uma rápida nucleação e, conseqüentemente, formação de pequenas partículas (YEO; KIRAN, 2005; COCERO et al., 2009; FRANCESCHI, 2009). A Figura 3.11 apresenta um diagrama esquemático do processo SAS.

Figura 3.11 - Diagrama esquemático do processo SAS.



Fonte: MARTÍN; COCERO, 2008.

Na técnica SAS é possível produzir compósitos tanto por coprecipitação simultânea do soluto (substância ativa ou núcleo) e carreador ou agente encapsulante quanto encapsular partículas da substância ativa, previamente formadas, pela suspensão em uma solução de agente encapsulante e, então, precipitar esse por SAS. Na precipitação de uma suspensão de partículas, essas se comportam como um núcleo para a precipitação do polímero e uma matriz polimérica de partículas encapsuladas é produzida por aglomeração. Quando o agente encapsulante e a substância ativa não são solúveis no mesmo solvente, é possível preparar diferentes soluções, uma para cada substância, e

submeter ambas à precipitação SAS (WANG; DAVE; PFEFFER, 2004; COCERO et al., 2009).

A etapa de formação de micro ou nanocápsulas de compostos bioativos ocorre basicamente de duas maneiras: o composto pode ser encapsulado, situação onde há a formação de uma fina camada de polímero recobrindo o composto, ou o composto pode ser coprecipitado, onde várias partículas do composto encontram-se no interior da partícula de polímero. O encapsulamento ocorre quando o material a ser encapsulado é posto em suspensão em uma solução polimérica e então o polímero dissolvido é precipitado recobrindo o material em suspensão. A coprecipitação ocorre quando o composto a ser encapsulado e o polímero são dissolvidos em um único solvente ou em uma mistura destes e simultaneamente precipitados (KALOGIANNIS; MICHAILOF; PANAYIOTOU, 2006).

Assim como em todos os processos de coprecipitação, a precipitação SAS busca uma alta eficiência de encapsulamento, sendo essa dependente de diversos parâmetros, em particular da concentração inicial da substância ativa e do material de cobertura (agente encapsulante) e da afinidade entre esses dois materiais. Se existir alta afinidade entre os materiais é possível incorporar o núcleo (substância ativa) no carreador em um estado amorfo. Se não existir afinidade, pode ocorrer a precipitação segregada dos materiais (YEO; KIRAN, 2005). Também, a concentração inicial da substância ativa e do agente encapsulante pode interferir ou determinar a morfologia das partículas obtidas (COCERO et al., 2009).

Na metodologia SAS, a câmara de precipitação é carregada com antissolvente, em estado sub ou supercrítico, até que a pressão de operação seja alcançada. Em seguida, quando pressão e temperatura da câmara e vazão de antissolvente estiverem constantes, a solução é aspergida na câmara, mantendo-se a adição constante do antissolvente. Após a injeção de todo o volume de solução, o antissolvente continua a fluir por mais alguns instantes visando a secagem das partículas geradas e remoção do solvente orgânico residual. A última etapa da técnica é a despressurização da câmara de precipitação e a retirada do material

precipitado, normalmente depositado sobre um filtro colocado no fundo da câmara para evitar que as partículas sólidas sejam arrastadas pela tubulação para fora da câmara precipitadora (FRANCESCHI, 2009).

3.4.1. Agentes encapsulantes

Muitas formulações químicas, farmacêuticas e alimentícias consistem de compósitos ou encapsulados que compreendem um núcleo (substância ativa) envolvido por um material encapsulante ou carreador (geralmente um biopolímero). Os compósitos são frequentemente produzidos pela precipitação simultânea do núcleo de forma dispersa dentro da matriz do material encapsulante, enquanto encapsulados são produzidos quando o carreador é precipitado como uma fina camada sobre uma partícula de núcleo previamente existente. Também é possível produzir compósitos pela formação prévia de partículas de material de cobertura e então impregnar essas com o composto ativo (COCERO et al., 2009).

Diversos agentes encapsulantes podem ser utilizados no processo de encapsulamento de substâncias ativas. Porém, esses precisam preencher alguns requisitos para serem utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa ou nula toxicidade e deve atuar como uma camada protetora contra agentes agressores quando uma substância é suscetível à degradação. Atualmente existe um grande número de biopolímeros naturais e sintéticos que atendem a essas exigências. Além disso, o agente encapsulante deve garantir condições adequadas para a preservação das propriedades da substância ativa e ser de fácil processamento pela técnica de precipitação selecionada (COCERO et al., 2009; FRANCESCHI, 2009).

Dentre as principais características dos biopolímeros, a biodegradabilidade se destaca por estar relacionada com a formação de resíduos de degradação, *in vivo* ou no ambiente, biocompatíveis ou não tóxicos (COCERO et al., 2009). Destacam-se entre os biopolímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis mais utilizados nos processos de

encapsulamento o ácido poliláctico (PLA), a policaprolactona (PCL), o poli(lactídio-co-glicolídio) (PLGA), o álcool polivinílico (PVA), o polietilenoglicol (PEG), o poli-hidroxitirato (PHB), o poli-(hidroxitirato-co-valerato) (PHBV) e o poli-hidroxicanoato (PHA). Ainda, além do papel de proteção, o tipo de polímero utilizado estabelece se o mesmo será liberado através de difusão (pelos poros ou cadeias do polímero) ou por degradação (dada quando o polímero é degradado como resultado de processos biológicos naturais) (WANG, et al., 2000; YEO E KIRAN, 2005; COCERO et al., 2009).

Um agente encapsulante bastante utilizado, tanto para fins alimentícios quanto farmacêuticos, é o copolímero de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (PEO-PPO-PEO), conhecido comercialmente pelo nome *Pluronic* ou pelo nome genérico *poloxamer*. Devido à sua estrutura anfifílica, ou seja, parte de sua estrutura ser hidrofílica (solúvel em água) e outra lipofílica (solúvel em lipídios), os *poloxamers* possuem propriedades surfactantes e tensoativas úteis em aplicações industriais. Eles podem ser usados para aumentar a solubilidade em água de substâncias hidrofóbicas, substâncias oleosas e aumentar a miscibilidade de duas substâncias com diferentes hidrofobicidades. Por esses motivos, esses polímeros são comumente utilizados nas indústrias farmacêutica e cosmética. Também, são utilizados em vários sistemas de liberação controlada de medicamentos e se mostraram eficientes para sensibilização de células cancerígenas aos quimioterápicos (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Certas classes de *poloxamers*, como o Pluronic F127, são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em humanos. O Pluronic F127 possui peso molecular de 12.600 g/mol, é solúvel em água, biocompatível, bioabsorvível, apresenta baixa toxicidade (menor que 10.000 mg/kg_{rato}.dia) e pode ser utilizado como biomaterial injetável (KHATTAK; BHATIA; ROBERTS, 2005; HUANG et al., 2006).

Os usos do Pluronic F127 na medicina incluem os sistemas de liberação controlada para os olhos, vias nasais e parenterais e administração subcutânea. Ainda, o Pluronic F127 apresenta

propriedades físicas, como permeabilidade à água e hidrofiliidade, que melhoram as características de liberação controlada do fármaco pelo agente encapsulante (STRAPPE et al., 2005; MEZZOMO et al., 2012).

3.4.2. Relação entre o equilíbrio de fases e o processo de precipitação/encapsulamento

Independente da técnica empregada para a recristalização de materiais sólidos ou encapsulamento de princípios ativos em biopolímeros, o conhecimento do comportamento de fases do sistema envolvido é fundamental para a compreensão do mecanismo de formação das partículas e para a determinação das condições de processo, como temperatura e pressão, mais adequadas para a precipitação (REVERCHON et al., 2008).

As publicações referentes à precipitação de sólidos usando técnicas antissolvente a alta pressão relatam os efeitos das condições operacionais de temperatura, pressão e taxa de adição de solução e antissolvente sobre o tamanho e distribuição de tamanho das partículas, bem como na sua morfologia. A escolha de variáveis operacionais selecionadas ao comportamento de fases do sistema envolvido no processo de precipitação/encapsulamento também é importante pois, além de permitir a operação em diferentes condições do diagrama, permite a otimização do processo relacionando o mecanismo de nucleação e crescimento das partículas com o comportamento de fases envolvido (BRISTOW et al., 2001).

Nesse sentido, o comportamento de fases do sistema soluto(s) + solvente orgânico + antissolvente é fundamental uma vez que dependendo da região do diagrama de fases, definida pelas condições de processo, pode ou não haver a formação de partículas. Abaixo do ponto crítico da mistura soluto(s) + solvente orgânico + antissolvente, há a coexistência de fases. Próximo ou acima do ponto crítico da mistura ocorre a completa miscibilidade entre os componentes (BRISTOW et al., 2001). Reverchon et al. (2003) observaram que abaixo do ponto crítico de um sistema binário solvente/antissolvente, forma-se uma fase líquida saturada e são gerados grandes cristais. Acima do ponto crítico

da mistura forma-se uma fase e, nesta condição, ocorre um alto nível de supersaturação formando, minúsculas partículas.

Em alguns casos, o comportamento de fases de sistemas binários solvente/antissolvente pode ser bastante modificado quando o soluto é envolvido no sistema, principalmente no caso de polímeros, podendo ocorrer mudanças na relação entre o comportamento de fases e a morfologia do material precipitado. Em outros casos, a presença do soluto não altera significativamente tal comportamento, sendo possível relacionar as características do material precipitado ao comportamento de fases do sistema binário solvente + antissolvente (FRANCESCHI, 2009).

Reverchon e De Marco (2004) generalizam que em um diagrama *P-w* partículas nanométricas seriam produzidas quando a precipitação ocorre na região de uma fase supercrítica à direita e acima do ponto crítico, de um sistema ternário. Quando o ponto de operação estiver localizado à direita, mas abaixo do ponto crítico da mistura ternária, em uma fase subcrítica gasosa fora da curva de equilíbrio, grandes partículas seriam produzidas. Quando o ponto de operação estiver localizado abaixo da curva de equilíbrio, em uma fase rica em líquido, seriam produzidas partículas cristalinas.

A abordagem baseada em diagramas pseudobinários negligencia o equilíbrio envolvendo o terceiro componente (soluto), assumindo que este precipita das fases fluidas em qualquer que seja sua composição. Em alguns casos, onde o antissolvente age como um cossolvente, parte do soluto pode manter-se dissolvida no solvente e pode ser perdida na saída do precipitador. Em particular, o chamado efeito de cossolvência pode ocorrer quando uma mistura de dois componentes, solvente + soluto, é mais solúvel em um solvente supercrítico do que cada um dos componentes puros apenas (REVERCHON; DE MARCO, 2004).

3.5. Antioxidantes

Os antioxidantes estão presentes de forma natural ou são adicionados intencionalmente nos alimentos para retardar o

aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais. Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, produzir cores, odores nem sabores anômalos. Eles devem ser solúveis no meio onde serão adicionados (alimento), resistentes ao processamento ao qual o alimento é submetido, ativos em baixas temperaturas e econômicos (ANDREO; JORGE, 2006).

A atividade antioxidante de compostos naturais como flavonoides e ácidos fenólicos é predominantemente determinada por suas estruturas e, em particular, pelo deslocamento de elétrons sobre um núcleo aromático. Quando estes compostos reagem com um radical livre, é o deslocamento do elétron ganho sobre o antioxidante fenólico e a estabilização pelo efeito da ressonância do núcleo aromático que previnem a continuação da reação em cadeia do radical livre. Assim, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar radicais livres antes do ataque às células e aos alvos biológicos, sendo definidos como substâncias capazes de quelar ou estabilizar radicais livres (KAUR; KAPOOR, 2001; ATOUI et al., 2005).

A origem das substâncias antioxidantes pode ser sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos como, o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (GP) são utilizados para diminuir a fase de propagação da reação de oxidação. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas. Os riscos à saúde associados ao consumo crônico dessas substâncias continuam a ser estudados (ANDREO; JORGE, 2006). Embora os antioxidantes sintéticos sejam efetivos, o seu uso é restrito em muitos países, devido aos possíveis efeitos indesejáveis à saúde humana, como por exemplo, reações alérgicas, efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Os antioxidantes sintéticos como o BHA e o BHT tendem a ter somente um modo de ação, via sequestro de radical livre, não sendo capazes de sequestrar íons metálicos através da rota catalisada por um metal (ZHENG; WANG, 2001).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de muitas espécies de plantas, normalmente daquelas utilizadas como condimentos, por serem excelentes fontes de compostos fenólicos. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser utilizadas como conservantes naturais em alimentos (ZHENG; WANG, 2001; ANDREO; JORGE, 2006).

3.5.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem propriedade antialergênica, antiarterogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora. Estes compostos estão diretamente associados com a saúde humana, uma vez que lhes são atribuídas propriedades antioxidante e antirradicais livres (MA et al., 2008).

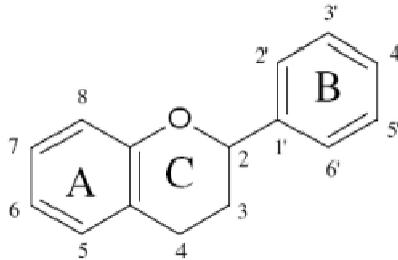
Os flavonoides pertencem ao grupo dos compostos polifenólicos, caracterizados por possuírem em comum a estrutura do benzo- γ -pirano, responsável por atuar como antioxidante em sistemas biológicos. Os flavonoides estão presentes em uma grande variedade de plantas comestíveis (SENEVIRATHNE et al., 2009).

A Figura 3.12 representa a estrutura genérica de um composto fenólico, constituído essencialmente de dois anéis aromáticos A e B ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico. O anel aromático A é derivado da via metabólica do acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via metabólica do *shikimato*. O *shikimato*, ou ácido xiquímico, é um importante composto intermediário em vias metabólicas de plantas e micro-organismos, em especial dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonoides, representados na Figura 3.13 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

A técnica de isolamento de flavonoides das plantas, incluindo o tipo de solvente, depende, geralmente, do tipo e da quantidade

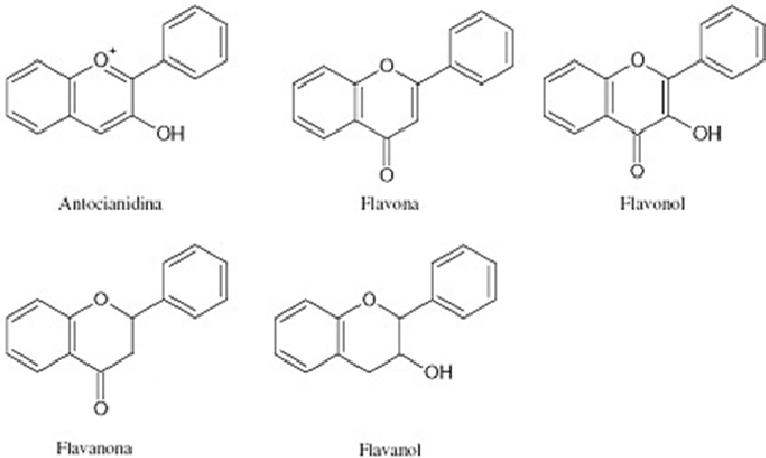
disponível dos compostos flavonoides presentes na matéria-prima (planta). Solventes de menores polaridades são usados para a extração de agliconas, enquanto solventes de maior polaridade são usados para extrair flavonoides glicosilados. Os isoflavonoides são extraídos com uma mistura de água e metanol, etanol ou acetonitrila (VELICKOVIC et al., 2007).

Figura 3.12 - Estrutura genérica das moléculas dos flavonoides.



Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

Figura 3.13 - Estruturas genéricas das principais classes dos flavonoides.



Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

A eficiência medicinal de um extrato vegetal não depende apenas de um único componente bioativo, mas do efeito sinérgico entre um composto principal e outros compostos secundários. Dessa forma, para se obter um extrato com excelente atividade biológica, é necessário considerar a qualidade do vegetal que será submetido à extração, o tipo de solvente utilizado e o procedimento de extração empregado (VINATORU et al., 1997).

3.5.2. Radicais livres e métodos de determinação da atividade antioxidante

Os radicais livres são responsabilizados como sendo mediadores de várias doenças como diabetes, doenças vasculares, hipertensão, câncer, declínio do sistema imunológico, doenças neurodegenerativas, entre outras. No corpo humano, os danos oxidativos causados pelos radicais livres no DNA, lipídios, proteínas e em outras moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de doenças degenerativas e câncer. Aproximadamente 90 % de todos os casos de câncer estão correlacionados com fatores ambientais e hábitos alimentares (ROGINSKY; LISSI, 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Em sistemas alimentícios, a oxidação leva à formação de radicais livres que reagem com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, proteínas, carboidratos e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, *off-flavors*, e perda de valor nutritivo e de vida de prateleira dos produtos (LOULI; RAGOUSSIS; MAGOULAS, 2004).

Os flavonoides apresentam atividade antioxidante de diversas formas: atividades antiradical (-OH), antilipoperoxidação (R-, ROO-, RO-) e quelante de metais. Os flavonoides são potenciais antioxidantes contra a ação de radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio. A natureza química dos flavonoides depende da sua classe estrutural, do seu grau de hidroxilação, substituição e conjugação e do grau de polimerização presente no composto (SENEVIRATHNE et al., 2009).

Existe uma grande variedade de técnicas disponíveis com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante de compostos e misturas complexas. Os métodos mais comuns para determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível envolvem um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio (EROS) e, com a presença de antioxidantes, ocorre o desaparecimento de cor destes radicais (ARNAO, 2000). O oxigênio está relacionado às condições de vida aeróbia e como molécula que mantém o metabolismo e viabilidade celular. É responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas existentes no sistema biológico. Do oxigênio disponível para a célula, 95 % se transforma em energia e 5 % em espécies de oxigênio reativas e tóxicas. Os radicais mais utilizados são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o hidroxil ($\cdot OH$), o óxido nítrico ($\cdot NO$), o alquilperóxil ($ROO\cdot$), o N,N-dimetil-p-fenilenodiamina ($DMDP^{\cdot+}$) e o 2,2-difenil-1-picrilidrazina ($DPPH\cdot$) (DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para determinação do teor total de compostos fenólicos. O ensaio de Folin-Ciocalteu é utilizado para medir o teor de compostos fenólicos total em produtos naturais, tendo como mecanismos a reação de oxirredução, sendo um dos melhores métodos para estimar a atividade antioxidante de amostras vegetais (ROGINSKY; LISSI, 2005).

De acordo com Halliwell e Wiseman (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos, como antioxidantes hidrofílicos, e carotenóides, como antioxidantes lipofílicos. Considerando isso, diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o método de seqüestro de radicais livres, tal como $DPPH\cdot$ (2,2-difenil-1-picrilidrazina) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. O radical livre formado a partir do ácido linoleico, pela retirada de um átomo de hidrogênio de um de seus grupos metileno, ataca as moléculas de β -caroteno, o qual perde uma ligação dupla, característica da coloração laranja. Este método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação (MATTHÄUS, 2002; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico, o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais de DPPH· estáveis, de cor violeta, quando são adicionadas substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Esse método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ou ABTS, que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Através dessa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, pode-se medir a diminuição da formação do ABTS por espectrofotometria (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), sendo o $ABTS^+$ convertido a uma forma não colorida. Também, é possível determinar a quantidade de $ABTS^+$ consumida devido à reação com amostras contendo compostos fenólicos, podendo ser expressa em Trolox equivalentes (unidades de concentração). Esse valor foi designado como TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), fornecendo uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante (CAMPOS; LISSI, 1997; BORGES et al., 2011).

O resultado da determinação do TEAC é dependente do tempo de incubação e da massa da amostra quantificada (EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS⁺ na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem na limitação desse método (CAMPOS; LISSI, 1997).

A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos ácidos graxos. Devido à abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações, os ácidos graxos poli-insaturados representam importantes alvos para os oxidantes. Sendo assim, a inibição da peroxidação lipídica constitui uma importante função dos antioxidantes (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; BORGES et al., 2011). Vários métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica, como a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA), desenvolvido no final da década de 40 e comumente usado para testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído, um aldeído com três átomos de carbono. Neste teste uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual apresenta absorção máxima a 532-535 nm e máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reação ocorre em meio ácido e a alta temperatura (100 °C), com o intuito de aumentar a velocidade e sensibilidade da reação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; SANTOS et al., 2007).

3.6. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante da *C. sylvestris*

A obesidade é um sério problema de saúde pública no mundo e tem aumentado drasticamente nos últimos anos, principalmente devido aos maus hábitos alimentares e pouca atividade física (FRIEDMAN, 2009). Esse problema é caracterizado pelo acúmulo de gordura corporal como resultado do balanço inadequado entre a *energia consumida* e a

energia gasta pelo organismo. Além disso, a obesidade é um importante fator de risco associado com o aumento do número de mortes por doenças cardiovasculares, diabetes, doenças crônicas dos rins e alguns tipos de câncer (FERREIRA et al., 2011).

Sobrepeso e obesidade estão associados a doenças como hipertensão, intolerância à glicose, apneia do sono e dislipidemia (ECKEL, 2008). Uma dieta rica em gorduras pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade e hiperlipidemia, aumento da gordura corporal e/ou gordura visceral e, também, alterações nos níveis de lipídios no plasma e tecidos (WOO et al., 2008). A hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, ou dislipidemias, são alterações lipídicas metabólicas causadas por uma desordem no metabolismo lipídico, que promovem modificações nas lipoproteínas séricas (GOTTO, 1993).

A dislipidemia pode ser detectada em laboratório pela hipercolesterolemia, hiperlipidemia mista ou pela diminuição isolada do colesterol de alta densidade (HDL - *high density lipoprotein*) ou em associação com o aumento do colesterol de baixa densidade (LDL - *low density lipoprotein*) e/ou triglicerídios (SINGH; MEHTA, 2002).

A hiperglicemia (ou excesso de glicose) é uma consequência frequente da deficiência relativa ou absoluta de insulina no sangue, estando associada ao diabetes. Essas doenças (hiperglicemia e diabetes) estão associadas com o aumento no risco de ataques cardíacos e doenças coronarianas, sendo que as doenças cardiovasculares são a maior causa de morte dos pacientes com diabetes. Estudos recentes demonstram que o controle glicêmico é um importante preventivo não apenas para doenças microvasculares, mas também para complicações macrovasculares, como doenças coronarianas, doenças arteriais periféricas e amputação das extremidades dos membros (GIUGLIANO et al., 1997; LUNA; FEINGLOS, 2001).

Um elevado número de pacientes que sofreram um estresse agudo, como um acidente vascular cerebral (AVC) ou infarto do miocárdio, podem desenvolver hiperglicemia mesmo na ausência de um diagnóstico pré-existente de diabetes, sendo que essa aumenta o risco de

morte após um AVC (CAPES et al., 2001). Além disso, pouco se conhece a respeito dos efeitos da hiperglicemia sobre as funções cerebrais, mas alguns estudos sugerem que elevados teores de glicose no sangue podem provocar alterações de humor, como aumento da irritabilidade e diminuição da sensação de bem-estar, agitação, ansiedade e diminuição da função cognitiva (SOMMERFIELD; DEARY; FRIER, 2004).

Pesquisas sobre o tratamento dessas dislipidemias revelaram medicamentos hipolipidêmicos novos e mais eficientes, utilizando agentes terapêuticos tanto sintéticos quanto naturais (FERREIRA et al., 2011). O reino vegetal é uma rica fonte de compostos naturais com atividade biológica, entre eles compostos com atividade hipotrigliceridemiante, hipocolesterolemiante e hipoglicemiante. Porém, a definição de um método de extração específico é importante para a seleção da substância ou um grupo de substâncias de interesse.

Conforme citado por Werle et al. (2009) no item 3.1.2, a *C. sylvestris* apresenta atividade hipolipemiante, ou seja, atua no controle de dislipidemias como excesso de triglicéridios e colesterol e excesso de glicose. Porém, poucos estudos são encontrados sobre a ação dessa planta na redução dos níveis de triglicéridios, glicose e colesterol total sanguíneos, sendo apenas relatado esse efeito da *C. sylvestris* pela medicina popular.

CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados e descritos o material e os métodos utilizados neste trabalho. Foram realizadas análises de caracterização da matéria-prima (*Casearia sylvestris*) como teor de umidade e de substâncias voláteis, resíduo mineral fixo (cinzas) e avaliação do diâmetro médio de partícula.

Com o objetivo de comparar as técnicas de extração, foram realizadas operações de extração com solventes orgânicos das folhas de *C. sylvestris* para verificar a influência do método no rendimento de extração, na composição química e na atividade antioxidante dos extratos, bem como para selecionar o solvente(s) adequado(s) à extração supercrítica. Também, está apresentada a metodologia utilizada para a determinação dos parâmetros de processo da operação de extração supercrítica de *C. sylvestris*, bem como as análises realizadas a fim de avaliar as condições de extração estudadas. Foram realizados testes cinéticos preliminares para estabelecer as condições de operação e determinação do rendimento global de extrato (X_0).

Além disso, foram realizados experimentos de determinação experimental do equilíbrio de fases de sistemas contendo extratos de *C. sylvestris*, visando a aplicação de condições de precipitação adequadas para o método do antissolvente supercrítico. Os extratos naturais formam sistemas multicomponentes complexos ricos em atividades biológicas importantes. O conhecimento do comportamento de fases desses extratos, como o de *C. sylvestris*, por exemplo, em fluidos supercríticos é fundamental para as indústrias alimentícia e farmacêutica, visando operações de extração, separação e precipitação/encapsulamento de compostos de interesse presentes nos extratos. Desta forma, neste trabalho será determinado o equilíbrio de fases termodinâmico para extratos de *C. sylvestris*, com a finalidade de serem obtidas informações sobre o seu comportamento em meio supercrítico, visando os ensaios de precipitação/encapsulamento de extratos de *C. sylvestris* também realizados neste trabalho, bem como a caracterização das partículas obtidas.

Considerando a atividade biológica presente nos extratos de *C. sylvestris*, apresentada no Capítulo 3, no item 3.1.3, neste trabalho também foram avaliados o efeito antiobesidade e as atividades hipolipemiante e hipoglicemiante *in vivo*, a fim de avaliar o efeito redutor de peso corporal e dos teores de colesterol total, triglicerídios e glicose sanguíneos dos extratos de *C. sylvestris*.

Para a caracterização dos extratos foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) nos diferentes extratos obtidos por diferentes técnicas, tanto extração supercrítica quanto extração com solventes orgânicos, com a finalidade de identificar e quantificar os compostos presentes nas diferentes frações do extrato de *C. sylvestris*.

Com exceção das análises de resíduo mineral fixo (cinzas), determinação de nitrogênio total, determinação do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria diferencial de varredura, efeito antiobesidade, atividades hipolipemiante e hipoglicemiante e perfil químico dos extratos, descritos na sequência, todos os experimentos anteriormente citados foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica - LATESC, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - EQA/UFSC.

4.1. Obtenção da matéria-prima

Folhas inteiras de *Casearia sylvestris*, com procedência da Região Sul da Mata Atlântica, foram fornecidas pela empresa *Brazervas Laboratório Fitoterápico Ltda.*, localizada no município Osório/RS.

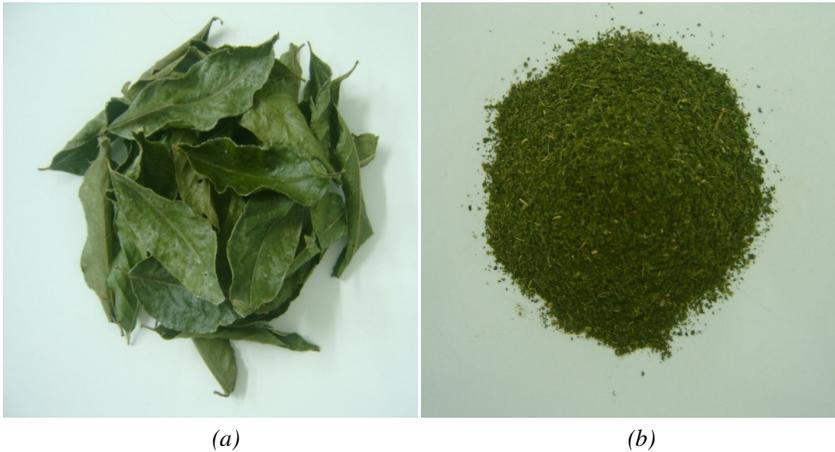
A matéria-prima, com umidade inicial de aproximadamente 50 % (m/m, em base úmida), foi coletada na empresa em 06/Maio/2011, disposta sobre esteiras e submetida ao processo de secagem em estufa com temperatura aproximada de 30 °C a 40 °C durante 72 h e, posteriormente, enviada ao LATESC em sacos de rafia.

4.2. Pré-tratamento da matéria-prima

Quando recebida no LATESC, a matéria-prima foi triturada em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) e submetida à separação e classificação granulométrica em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras/SP, Brasil), com a finalidade de determinar o diâmetro médio das partículas, conforme descrito no item 4.5.1.

Para a realização dos experimentos posteriores de caracterização da matéria-prima e do leito de partículas de ESC e extrações supercrítica e à baixa pressão, utilizaram-se todas as frações da matéria-prima. A Figura 4.1 apresenta as folhas inteiras de *C. sylvestris* e as folhas trituradas em moinho de facas utilizadas nos experimentos.

Figura 4.1 - (a) Folhas inteiras de *C. sylvestris* recebidas; (b) amostra de *C. sylvestris* triturada em moinho de facas e utilizada nos experimentos.



Após a moagem a matéria-prima foi acondicionada em embalagens de polietileno, contendo aproximadamente 1,0 kg, identificada e mantida congelada em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) à -18°C até o momento da realização dos ensaios.

4.3. Caracterização da matéria-prima

4.3.1. Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

A determinação do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima (*Casearia sylvestris*) foi realizada pelo método 925.09 da AOAC (2005), cujo procedimento fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105°C. Brevemente, cápsulas de alumínio foram previamente aquecidas em estufa (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) a 105°C por 1 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Após, cerca de 5 g de amostra seca e triturada foram medidas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, nas cápsulas de alumínio (previamente pesadas), aquecidas em estufa a 105°C por 3 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e medidas as massas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi utilizada a Equação 4.1.

$$\text{Teor de umidade e voláteis(\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \cdot 100 \quad (4.1)$$

onde m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g).

A determinação de umidade e substâncias voláteis das folhas de *C. sylvestris* foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.3.2. Determinação do resíduo mineral fixo (cinzas)

A determinação do resíduo mineral fixo foi realizada no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos - PROFI, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, em mufla (Q318M, Quimis Diadema/SP, Brasil) a 550 °C

durante 6h ou até que fossem obtidas cinzas brancas ou branco cinzentas, de acordo com o método 923.03 da AOAC (2005). Cápsulas de porcelana foram previamente aquecidas em estufa a 550 °C por 1 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. Na sequência, cerca 5 g de amostra seca e triturada foram medidas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, dispostas nas cápsulas de porcelana, previamente taradas, depois carbonizadas completamente em bico de *Bunsen* e incineradas em mufla a 550 °C por 6 h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e medidas as massas. Estas operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até que se obtivesse peso constante. Para o cálculo de cinzas, foi empregada a Equação 4.2.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_c}{m_i} \cdot 100 \quad (4.2)$$

onde m_c é a massa final de cinzas (g) e m_i é massa inicial de amostra (g).

A determinação de cinzas da matéria-prima foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.3.3. Determinação do teor nitrogênio total

A avaliação do teor de nitrogênio total das amostras foi realizada no Laboratório de Análises – LABCAL, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, através da determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, descrito pela metodologia 991.20 da AOAC (2005).

De forma geral, o método é constituído de três etapas, onde na primeira delas a amostra passa por um processo de digestão com ácido sulfúrico concentrado para a conversão dos compostos orgânicos. Posteriormente, a amônia é separada por destilação e recolhida em uma solução de ácido bórico e, em seguida, é realizada a titulação da solução com ácido clorídrico para a determinação quantitativa da amônia,

utilizando-se fator de conversão 6,25. O resultado foi expresso como g/100g de nitrogênio total.

4.3.4. Determinação do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel

A determinação do teor fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel foi realizado no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Cereais – CERES, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, pelo método 991.43 da AOAC (2005).

Esta metodologia é baseada na combinação de métodos enzimáticos e gravimétricos, onde a amostra é submetida à digestão sequencial com as enzimas termoestáveis α -amilase, protease e amiloglicosidase. A fibra dietética insolúvel (IDF) é filtrada e o resíduo é lavado com água destilada morna. O filtrado e a água utilizada na lavagem são adicionados de etanol para a precipitação da fibra dietética solúvel (SDF). O precipitado é então filtrado e seco. Ambos os resíduos (IDF e SDF) são corrigidos descontando-se o valor de proteínas, cinzas e branco para o cálculo final de IDF e SDF. Para a determinação da fibra dietética total (TDF) é realizado um experimento adicional, onde ocorre precipitação da fibra com etanol e a filtração do resíduo, sendo este seco e pesado, e o valor corrigido com os valores de teor de cinzas e proteínas. O resultado foi expresso em g/100g de fibras dietética total, solúvel e insolúvel.

4.4. Extrações a baixa pressão

Os processos de extração a baixa pressão com solventes orgânicos, como maceração e Soxhlet, foram efetuados com o objetivo de comparar com a extração supercrítica os resultados obtidos em termos de rendimento, perfil químico, atividade antioxidantes, teor de fenólicos e efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante dos extratos de *C. sylvestris*. Estas extrações foram

realizadas, também, para a seleção do cossolvente a ser empregado na extração supercrítica.

4.4.1. Soxhlet

A extração em Soxhlet foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), utilizando-se hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e clorofórmio, todos em grau analítico e da marca Synth (Diadema/SP, Brasil). A Tabela 4.1 apresenta os valores de índice de polaridade dos solventes empregados.

Tabela 4.1 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração em Soxhlet.

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

Fonte: PHENOMENEX, 2013.

Para cada extração, 5 g de amostra foram medidas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e acondicionadas em um cartucho de papel-filtro, o qual foi inserido no extrator Soxhlet. O sistema Soxhlet consiste de um extrator de 150 mL que é acoplado na sua extremidade inferior a um balão de 250 mL e em sua extremidade superior a um condensador, arrefecido por um banho (MQBMP-01, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil).

Para cada uma das extrações, inicialmente são adicionados 150 mL de solvente no balão, sendo este aquecido por uma manta de aquecimento (Mod. 52 - Classe 300, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) ajustada próxima à temperatura de ebulição do solvente utilizado. Em todas as extrações com Soxhlet manteve-se a proporção

amostra:solvente igual a 1:30 (m/v). Com a evaporação, o solvente entra no condensador e volta à forma líquida, entrando em contato com a amostra e ocorrendo a extração dos compostos solúveis. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido continuamente durante 6 horas, sob extração contínua com velocidade de 4-5 gotas por segundo.

Os extratos obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (conforme o procedimento descrito no item 4.8) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C . As extrações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.4.2. Maceração

A extração utilizando o processo de maceração foi realizada baseada na metodologia descrita por Bandeira et al. (2006) e Werle et al. (2009), onde 10 g de amostra, medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, foi adicionada de 100 mL de solvente em erlenmeyer de 250 mL, mantendo-se a proporção amostra-solvente igual à 1:10 (m/v). Os solventes utilizados foram os mesmos empregados na extração com Soxhlet (item 4.4.1). Os frascos foram fechados, mantidos ao abrigo da luz e submetidos ao processo de extração pelo período de 7 dias. Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac, Buenos Aires, Argentina) em funil de Büchner com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em *Kitasato*.

Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (conforme item 4.8) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a -18°C . As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.5. Caracterização física do leito de partículas da ESC

4.5.1. Determinação do diâmetro médio de partícula

A determinação do diâmetro médio de partícula foi efetuada através do cálculo proposto por Gomide (1983). Mediram-se 100 g de amostra seca e triturada em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão de duas casas decimais de grama, para cada batelada e, utilizando as peneiras da série *Tyler* de *mesh* -20/+80 e fundo, o conjunto foi agitado por 60 minutos. Após, as massas retidas sobre cada peneira foram pesadas para o cálculo do diâmetro médio de partícula, conforme as Equações 4.3 e 4.4.

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{d}_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta \ell_i}{\bar{d}_i^3}}} \quad (4.3)$$

$$\Delta \ell_i = \frac{m_i}{M} \quad (4.4)$$

onde \bar{d}_s é o diâmetro médio superficial das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), M é a massa total de amostra (g), \bar{d}_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número total de frações.

A determinação do diâmetro médio de partícula foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.5.2. Determinação da massa específica aparente (ρ_a)

A massa específica aparente (ρ_a) das partículas de *C. sylvestris* foi obtida através da relação entre a massa de amostra utilizada nas extrações pelo volume do leito, incluindo assim apenas os poros do leito e não os poros do interior das partículas.

A massa de amostra seca e triturada foi medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com

precisão ao décimo de miligrama, e o volume determinado através das medidas de altura e diâmetro do extrator com o uso de um paquímetro, com precisão de 0,02 mm.

A determinação da massa específica aparente foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.5.3. Determinação da massa específica real (ρ_r)

A massa específica real (ρ_r) das partículas de *C. sylvestris* foi determinada pela técnica de picnometria em gás hélio, utilizando-se o picnômetro (Accu Pyc II 1340, Micromeritics, Georgia/EUA). Esta técnica segue o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos, onde o gás hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar as características das partículas, determinando o volume verdadeiro de um sólido (desconsiderando seus espaços vazios), por variação da pressão de gás em uma câmara de volume conhecido. Normalmente é utilizado o gás hélio como fluido picnométrico por ser inerte, além de penetrar facilmente nos poros da amostra devido ao pequeno tamanho dos seus átomos (MOURA; FIGUEIREDO, 2002).

O picnômetro de hélio (Accu Pyc II 1340, Micromeritics, Georgia/EUA) é constituído por duas câmaras de volumes conhecidos: a câmara onde se coloca a amostra e a câmara de expansão. Ambas as câmaras são ligadas por uma válvula de expansão. Antes do início da análise a amostra colocada na respectiva câmara, é sujeita a um processo de desgaseificação que consiste em repetidas purgas com hélio, para remoção de impurezas e umidade que eventualmente possa conter. Depois que todo o sistema é levado à pressão atmosférica, a câmara de expansão é isolada automaticamente pelo fechamento da válvula de expansão e a câmara que contém a amostra é pressurizada até uma pressão P_1 . Em seguida, a válvula de expansão é aberta automaticamente e, conseqüentemente, ocorre uma redução de pressão para P_2 . Admitindo comportamento ideal do gás hélio, o volume do sólido pode ser calculado a partir da Equação 4.5 (SMITH, 1996):

$$P_1(V_a - V_s) = P_2(V_a - V_s + V_e) \quad (4.5)$$

onde V_a é o volume da câmara da amostra; V_e é volume da câmara de expansão e V_s é volume do sólido.

A principal vantagem deste método está na sua capacidade para medir apenas o volume da amostra descontando o volume de todos os espaços vazios. A partir da determinação do volume do sólido pode-se determinar a sua densidade real, sendo esse resultado apresentado pelo equipamento. Neste trabalho, a análise foi realizada em triplicata e o resultado obtido para densidade real foi expresso como média \pm desvio padrão.

4.5.4. Porosidade do leito (ε)

A porosidade do leito (ε) de extração foi determinada através da massa específica real e aparente da amostra de *C. sylvestris*, incluindo os poros do leito e do interior das partículas. Para formar o leito fixo de partículas foram utilizadas 15 g de amostra seca e triturada, medidas em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e a porosidade foi calculada através da Equação 4.6.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (4.6)$$

onde ρ_r é a massa específica real das partículas e ρ_a é a massa específica aparente do leito em (kg/m^3).

A determinação da porosidade do leito foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.6. Determinação da massa específica do solvente supercrítico (ρ)

A massa específica do CO_2 supercrítico (ρ) nas condições de operação foi determinada através da equação de Angus, Armstrong e De Reuck (1976). Estes valores são utilizados na avaliação da influência da pressão e da temperatura na variação da massa específica do solvente e,

consequentemente, na solubilização do extrato de *C. sylvestris* no solvente supercrítico, assim como para a aplicação do modelo de transferência de massa, descrito por Sovová (1994), nas curvas de extração supercrítica.

4.7. Extração supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica (ESC) foram realizados no LATESC, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, onde se encontra disponível uma unidade de experimentação que opera até uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,67 g/min a 36,67 g/min. Os experimentos de extração supercrítica realizados visaram determinar as condições de temperatura, pressão e concentração de cossolvente que resultam em maiores valores de rendimento global e também produzem os melhores parâmetros de qualidade dos extratos (composição e atividade biológica). As condições operacionais utilizadas na ESC da *C. sylvestris* foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de condições de massa específica de solvente, buscando evitar a degradação de compostos termossensíveis, como ocorre na extração em Soxhlet, e levando em consideração os limites de operação do equipamento utilizado.

A unidade de extração supercrítica foi empregada para a obtenção da curva de extração necessária para o estudo das condições ótimas de operação e para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com CO₂ puro e com adição de cossolvente, visando a obtenção de extratos de *C. sylvestris* ricos em compostos de interesse que apresentem atividade antioxidante e antiobesidade.

Os experimentos de cinética (curva de extração), detalhado no item 4.7.2, e de determinação de X_0 , descritos no item 4.7.3, foram realizados através do método dinâmico de extração. O método dinâmico de ESC caracteriza-se pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999). A partir deste método pode-se determinar X_0 , definido como a quantidade percentual de soluto

extraível do material sólido para determinadas condições de processo (temperatura, pressão, vazão do solvente, tempo e quantidade de matéria-prima utilizada na extração, etc.). Ainda, podem ser obtidas as curvas de extração que são utilizadas para definir parâmetros de extração como as condições operacionais, a quantidade de matéria-prima para a formação do leito de partículas e o tempo total de extração. Neste caso, o extrato é coletado em diferentes frascos por períodos pré-determinados do processo de ESC.

Os experimentos de rendimento global foram efetuados, no mínimo, em duplicata e os extratos obtidos nestas operações foram empregados para as análises de atividade biológica, bem como na determinação do perfil químico dos referidos extratos.

4.7.1. Equipamento de extração supercrítica

A unidade de extração supercrítica (ZETZL; LOZANO; BRUNNER, 2007) utilizada no presente estudo, apresentada na Figura 4.2(a), foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha. A Figura 4.2(b) apresenta o esquema de funcionamento do equipamento de extração supercrítica.

Conforme o esquema, a unidade supercrítica consiste de um cilindro de CO₂ com tubo pescador e 99,9 % de pureza (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil), que alimenta diretamente a linha de extração. A linha de solvente é imersa em um banho termostático (BT1) (C10 - K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente (CO₂) esteja no estado líquido antes de sua entrada na bomba (B1) (M111, Maximator, Niedersachsen, Alemanha). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido, filtrado e mantido na pressão mínima de 1 bar. A pressão de operação desejada da unidade supercrítica é controlada através da pressão do ar comprimido, uma vez que a bomba opera em uma razão 1:130 ($P_{ar}:P_{sistema}$).

233.50.10, WIKA do Brasil); PI3: Manômetro de controle do extrator (PI: Cat 233.50.10, WIKA do Brasil); TI: Controladores de temperatura; BC: Bomba de cossolvente; VR: Válvula de retenção da bomba de cossolvente.

Fonte: Zetzl, Meireles, Brunner (2003) adaptado por Kitzberger (2005).

Durante o funcionamento do equipamento a bomba encaminha o CO₂ pressurizado (a uma pressão pré-estabelecida) para a linha de extração, passando pelo extrator (E), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 32,9 cm de comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume interno de 107,74 mL, com extremidades rosqueadas. A tubulação que liga a bomba ao extrator, bem como a tubulação após o extrator, é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica durante a depressurização da mistura soluto/solvente (V4) (Sitec Microvalve 710.3012, Zurique, Alemanha) e diminuir a possibilidade de recristalização/precipitação de extrato na tubulação, causando entupimento. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha). No início do processo de extração a válvula (V2) (Cat n° 3710.0104, Maximator) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) (Shutoff valve 710.3010, Sitec, Zurique, Suíça), também conectada na saída do extrator, auxilia a V4 na depressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o soluto é conectado em frascos âmbar (F1) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (R1) (10A61ABB, Automation Products).

4.7.2. Curvas de extração e determinação dos parâmetros cinéticos

Os experimentos cinéticos para a obtenção da curva de extração de *C. sylvestris* consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função de intervalos de tempo de extração pré-determinados. Estes experimentos foram realizados no equipamento

descrito em 4.7.1, utilizando para a determinação da curva de extração 15 g de folhas trituradas de *C. sylvestris*, medido em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama. Esta massa de matéria-prima foi empregada para formar um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com esta relação altura/diâmetro, a dispersão axial pode ser desprezada na aplicação de determinados modelos matemáticos. Os frascos de coleta foram previamente mensurados em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados, sendo o extrato medido de forma a determinar a massa de extrato obtida em função do tempo de experimento.

As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido, ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra (MICHIELIN et al., 2005; KITZBERGER et al., 2009; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009). Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro na condição de pressão de 200 bar; temperatura de 40 °C, vazão de solvente de 8 ± 2 g/min, baseado em testes prévios e por ser essa uma pressão intermediária entre as que foram testadas nos ensaios de rendimento global (item 4.7.3) . Os valores experimentais de massa de extrato *versus* tempo de extração obtidos na curva da ESC de *C. sylvestris* são apresentados no Apêndice I e a curva obtida é apresentada no item 5.2.1.

Os parâmetros cinéticos foram considerados para avaliar a cinética das extrações e calculados conforme Mezzomo, Martínez e Ferreira (2009). Os tempos de cada um dos períodos de extração (CER, FER e DCP), apresentados no Capítulo 3 (item 3.2.3.4) foram obtidos a partir da curva de extração, apresentada em 5.2.1. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período

CER, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} .

4.7.3. Determinação do rendimento global de extrato (X_0)

O valor de X_0 é definido como a quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida (*C. sylvestris*) referente a uma dada temperatura e pressão de extração. A verificação da influência da pressão e da temperatura no rendimento global da ESC foi avaliada utilizando-se como condições de operação as pressões de 100, 200 e 300 bar, temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C e vazão fixa de solvente (8 ± 2 g/min).

O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 200 bar, 40 °C e vazão de solvente de 8 ± 2 g/min, conforme explicado no item 5.2.1, sendo fixado em 3,5 horas o tempo total de extração, totalizando um consumo de 1,75 kg de CO₂. Como pode ser observado na Figura 5.1 (ver item 5.2.1), após 3,5 horas de operação a curva de extração se encontra na etapa de taxa decrescente de extração (FER), onde aproximadamente 88,7 % do soluto foi extraído da matriz vegetal.

Os experimentos foram organizados conforme descrito na Tabela 4.2, considerando que as temperaturas foram escolhidas de forma a evitar a degradação térmica dos extratos de *C. sylvestris* e as pressões foram selecionadas para abranger o maior número possível de condições experimentais. A formação do leito de partícula empregou 15 g de matéria-prima, medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, o que permitiu manter a altura do leito de sólidos constante. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro, garantindo total preenchimento do leito de extração com material inerte.

Tabela 4.2 - Plano de ensaios de extração supercrítica para a determinação do rendimento global (X_0).

Variáveis	Níveis		
T (°C)	40	50	60
	100	100	100
P (bar)	200	200	200
	300	300	300

A massa de extrato obtida nos frascos foi mensurada em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e armazenada em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios de avaliação da qualidade dos extratos.

O valor de X_0 foi calculado através da razão entre a massa de extrato (M_{Extrato}) obtida e a massa de *C. sylvestris* (M) utilizada para formar o leito, conforme a Equação 4.7.

$$X_0 = \frac{M_{\text{Extrato}}}{M} \cdot 100 \quad (4.7)$$

A determinação de rendimento global foi realizada, no mínimo, em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.7.4. Emprego de cossolvente (CS)

A partir da melhor condição de rendimento obtida, de acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 5.4 e 5.5 (item 5.2.2), testou-se a aplicação de cossolvente adicionado ao solvente (CO_2), em quantidade definida em relação à massa total de CO_2 empregada na extração supercrítica. Para a adição de cossolvente junto à extração supercrítica, uma bomba de cossolvente (BC) (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) foi acoplada ao equipamento de extração supercrítica (Figura 4.2). Após a bomba de cossolvente foi colocada uma válvula de retenção (VR) para evitar que o solvente orgânico retornasse para BC se houvesse um aumento na pressão da

bomba de CO₂ durante o experimento. A bomba de cossolvente trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min.

Utilizou-se como cossolvente o álcool etílico P.A. (Synth, Diadema/SP, Brasil) e o acetato de etila P.A. (Synth, Diadema/SP, Brasil) em concentrações de 2, 5 e 8 % (m/m), baseado em outros estudos já realizados para adição de modificadores à extração supercrítica (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009). Para o etanol, ainda realizou-se adição de 11 % em relação à massa de CO₂ com a finalidade de verificar-se o comportamento da adição deste em maior concentração na extração. Esses solventes foram selecionados com base (1) nos resultados de rendimento das extrações em Soxhlet e maceração, apresentados no item 5.2.2, para os quais foram obtidos os maiores rendimentos; (2) em dados da literatura que relatam o uso de solventes orgânicos como cossolventes (CASAS et al., 2007; SALGIN, 2007); (3) em dados de atividade biológica para os extratos de *C. sylvestris* obtidos, apresentados no Capítulo 6, e (4) em estudos sobre atividade antitumoral utilizando extratos supercríticos de *C. sylvestris* e esses modificadores adicionados à extração, disponíveis na literatura (BÜCKER, 2012). Assim, com base nas Tabelas 5.4 e 5.5 que apresenta os resultados de rendimento, os experimentos com cossolvente foram realizados na condição de 200 bar, 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3,5 horas de extração. Esses ensaios foram realizados para avaliar a influência da concentração de cossolvente no rendimento da ESC, bem como a atividade biológica dos extratos obtidos. Além dessas condições utilizando etanol e acetato de etila, foram realizadas extrações utilizando etanol como cossolvente, nas concentrações de 2, 5 e 8 % (m/m), na condição de 300 bar e 40 °C e 300 bar e 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3,5 horas de extração, visando comparar o rendimento e/ou a atividade biológica dos extratos em outra condição de temperatura e pressão.

Os extratos obtidos ao final dos ensaios ESC com cossolvente foram submetidos à etapa de eliminação do solvente orgânico empregando-se o mesmo método utilizado nas extrações a baixa pressão (conforme item 4.8). As extrações com emprego de cossolvente foram

realizadas, no mínimo, em duplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.8. Tratamento dos extratos e eliminação do solvente

Os extratos obtidos através das extrações a baixa pressão (Soxhlet e maceração) e supercrítica adicionada de cossolvente passaram pela fase de eliminação do solvente em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica, Piracicaba/SP, Brasil) a fim de separar o solvente da mistura extrato/solvente. As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes a serem eliminados (± 40 °C), para evitar degradação térmica dos extratos, e o vácuo ajustado em 650 mmHg.

4.9. Determinação experimental do equilíbrio de fases

Os extratos de *C. sylvestris* obtidos por extração com CO₂ supercrítico nas condições de 300 bar e 50 °C adicionada de 5 % (m/m) de etanol e 300 bar e 50 °C adicionada de 5 % (m/m) de acetato de etila (ambas realizadas com vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3,5 horas de extração) foram submetidos a medidas experimentais de equilíbrio de fases.

O extrato obtido a 300 bar e 50 °C adicionado de 5 % (m/m) de etanol foi dissolvido 1:100 (m/m) em etanol P.A. para formar o sistema multicomponente, ou pseudoternário, extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para determinação experimental do equilíbrio de fases. Além desse sistema, os sistemas formados por extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ também foram submetidos à determinação experimental do equilíbrio de fases, ambos solubilizando o extrato de *C. sylvestris*, na razão 1:100 (m/m), e o Pluronic F127, na razão 3:100

(m/m), no respectivo solvente (etanol ou acetato de etila) do sistema. A escolha do Pluronic F127 deve-se ao fato desse ser um biopolímero comumente empregado no encapsulamento de produtos naturais, conforme apresentado no item 3.4.1.

4.9.1. Aparato experimental

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões deste trabalho foram conduzidas em uma célula de volume variável com visualização, baseada no método estático, descrito detalhadamente por Fornari, Alessi e Kikic (1990) e Dohrn e Brunner (1995). A Figura 4.3 apresenta (a) o equipamento utilizado e (b) um diagrama esquemático do aparato experimental.

Figura 4.3 - (a) Unidade experimental de equilíbrio de fases e (b) diagrama esquemático do aparato experimental para determinação de equilíbrio de fases.



(a)

conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com o termopar (ST) (J 1,5x150mm FVxFV 1000mm ST, Salvi Casagrande, SP/Brasil) e outra com a válvula de alimentação (V7); uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (JS) e entradas frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V5).

- **JS e Janela Frontal:** A célula possui duas janelas de safira (Swiss Jewel Company, USA), sendo uma **Janela Frontal** ($d = 25,4$ mm e espessura = 9,52 mm) para visualização do interior da célula e outra lateral (**JS**) ($d = 15,87$ mm e espessura = 4,76 mm) para a entrada de luz.
- **V3, V4, V5:** Válvulas de esferas (SSH83PF2, SWAGELOK, SP/Brasil).
- **V6:** Válvula de alívio (SS-4R3A, SWAGELOK, SP/Brasil).
- **V7:** Válvula de alimentação (15-11AF1, HIP, USA).
- **V8:** Válvula de descarga (15-11AF1, HIP, USA).
- **BR2:** Banho termostático de recirculação 2, ajustado para cada temperatura dos experimentos de equilíbrio de fases (MBTC99-20, Microquímica, SC/Brasil).
- **IT:** Indicador de temperatura (N1500, NOVUS, RS/Brasil).
- **TP:** Transdutor de pressão (LD 301-511, SMAR, Huba Control, Würenlos/Denmark).
- **MP:** Monitorador de pressão (N1500, NOVUS, RS/Brasil).
- **AM:** Agitador magnético (753A, FISATOM, SP/Brasil), para acelerar o alcance do equilíbrio.
- **FL:** Fonte de luz. Foi utilizado um feixe de luz branca na janela lateral da célula de equilíbrio para iluminar o interior da célula e auxiliar a visualização das transições de fases.

4.9.2. Procedimento experimental

O procedimento experimental para a realização de medidas de equilíbrio de fases a altas pressões utilizando o aparato experimental descrito no item 4.9.1, baseado na metodologia recentemente descrita

por Rosso (2009) e Michielin (2009), iniciou com o carregamento do cilindro da bomba, na pressão de 60 bar, com dióxido de carbono proveniente do reservatório (cilindro de CO₂). A temperatura do banho de recirculação (BR1) foi ajustada a 5 °C e a pressão no cilindro da bomba foi ajustada para 100 bar, aguardando a estabilização do sistema. Essas condições se fazem necessárias para manter o solvente (CO₂) como líquido comprimido e fornecer uma medida precisa do volume deslocado (CO₂ que deve ser adicionado à célula de equilíbrio).

Enquanto a pressão estabilizava procedeu-se a montagem da célula de equilíbrio. Primeiramente, a montagem do pistão foi efetuada, assegurando que o fechamento das extremidades do pistão fosse realizado de forma que o mesmo pudesse deslizar pelo interior da célula e não permitisse a passagem de volume do fundo para frente e vice-versa. Posteriormente, a célula foi fechada e conectada à unidade de determinação de equilíbrio de fases.

Na metodologia sintética estática deve-se conhecer a composição global do sistema em estudo. Neste trabalho, o procedimento experimental foi aplicado para os seguintes sistemas:

- (A) Extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂, com razão extrato:etanol igual à 1:100 (m/m) e Pluronic F127:etanol igual à 3:100 (m/m);
- (B) Extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂, com razão extrato:acetato de etila igual à 1:100 (m/m) e Pluronic F127:acetato de etila igual à 3:100 (m/m);
- (C) Extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, com razão extrato:etanol igual à 1:100 (m/m).

A escolha dos sistemas para realizar os experimentos de equilíbrio de fases destes foi baseada na possibilidade de serem realizados experimentos de precipitação e encapsulamento posteriores, em meio supercrítico, dos mesmos extratos que foram testados para a determinação do efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante. A relação entre extrato de *C. sylvestris* e Pluronic F127 (1:3, m/m) está baseada no estudo de Mezzomo et al. (2012), onde foi relatado que a proporção 1:3 (m/m) é a melhor razão para a

coprecipitação do extrato de resíduo de camarão em Pluronic. Também, o estudo de Franceschi et al. (2008b) relata que a proporção 1:3 (m/m) é a melhor razão para a coprecipitação do β -caroteno em PHBV.

Assim, para cada composição, uma quantidade de solução com extrato de *C. sylvestris* ou extrato de *C. sylvestris* + Pluronic F127 dissolvidos em etanol ou acetato de etila, referente aos sistemas A, B ou C, descritos anteriormente, foi medida em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e, em seguida, colocada dentro da célula de equilíbrio através da conexão de alimentação, utilizando-se uma seringa com agulha. Em seguida, a célula de equilíbrio foi conectada à unidade experimental através das tubulações que contêm as válvulas V5, V7 e o termopar, sendo mantidas fechadas.

As válvulas V3 e V4 foram então abertas e a pressão elevada através da bomba, pressurizando todo o sistema. Assim que o sistema estabilizou (fluxo da bomba estável em $\pm 0,001$ mL/min), a válvula V7 foi aberta lentamente, permitindo a entrada de solvente na célula, na quantidade pré-estabelecida para fornecer a composição mássica desejada dentro da célula de equilíbrio. A massa de solvente (CO₂) a ser adicionada foi computada com base no decréscimo do volume interno da bomba, sendo necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba. Após a alimentação, a pressão do sistema foi reduzida até 60 bar e a válvula de esfera V5 foi aberta para permitir que o solvente entre em contato com o fundo do pistão. O sistema formado (A, B ou C) foi continuamente agitado e, nesse instante, iniciou-se a agitação por meio de um agitador magnético localizado abaixo da célula de equilíbrio. O sistema de aquecimento foi acionado para que a temperatura do sistema alcançasse a temperatura do experimento. Neste trabalho, foram testadas temperaturas de 35, 45, 55, 65 e 75 °C e foram realizadas determinações experimentais do equilíbrio de fases para as frações mássicas de CO₂ de 0 a 1,0, de forma que fossem abrangidas o maior número possível de condições experimentais.

Quando a temperatura necessária para a realização da medida experimental de cada uma das composições foi alcançada, a pressão foi aumentada com o auxílio da bomba de seringa, utilizando o CO₂ como fluido pneumático, até a visualização de uma única fase no interior da célula de equilíbrio. Neste momento o sistema foi deixado em repouso, por aproximadamente 10 minutos até que fosse atingido o equilíbrio.

Mantendo-se a temperatura constante e a solução sob agitação, iniciou-se a depressurização lenta do sistema através da diminuição gradativa da pressão pela bomba (3,5 bar/min), sendo mantida até a transição de fases, ou seja, o surgimento incipiente de uma segunda fase (turbamento ou formação de bolhas na solução). Neste instante, a diminuição da pressão foi interrompida e aguardou-se alguns instantes para a estabilização do sistema e identificação do tipo de transição e da interface entre as fases segregadas. Neste ponto, anotou-se o valor da pressão e, em seguida, pressurizou-se novamente o sistema para repetir o procedimento. Este procedimento de aumento de pressão até que se formasse uma fase e redução da pressão, ocorrendo a transição de fases, foi realizado em duplicata para cada condição experimental de temperatura e composição, visando-se avaliar a repetibilidade da determinação experimental e obter um valor médio da pressão de transição à temperatura e composição global constantes.

Uma transição é denominada ponto de bolha (PB) quando pequenas bolhas aparecem no topo da célula. O ponto de orvalho (PO) é caracterizado quando uma fina névoa e/ou gotículas de líquido surgem dentro da célula. Para ambos os casos, a composição da fase predominante, líquida se for PB ou vapor se for PO, é considerada igual à composição global da mistura.

Após a realização das medidas experimentais a pressão foi reduzida até 60 bar (pressão de vapor do solvente) para a descarga do sistema. Fechou-se a válvula V4 para evitar que qualquer soluto residual entre na câmara do transdutor de pressão e a válvula V3 por medida de segurança. Abriu-se lentamente a válvula V8 para descarregar o solvente remanescente. Neste ponto, dentro da célula havia uma fase vapor contendo praticamente solvente puro. Mantendo a válvula V8 aberta e as

válvulas V3 e V4 fechadas, a válvula V7 foi aberta lentamente para o descarregamento do solvente como fase vapor. Após este procedimento, seguiu-se com a desmontagem e limpeza da célula de equilíbrio.

4.10. Precipitação e encapsulamento de extratos de *C. sylvestris*

O processo de encapsulamento de extratos de *C. sylvestris* em Pluronic F127 foi realizado em uma unidade de extração supercrítica adaptada por Mezzomo e Ferreira (2013) ao processo SAS. As soluções orgânicas utilizadas nos experimentos eram compostas por:

- (A) Extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂, com razão extrato:etanol igual à 1:100 (m/m) e Pluronic F127:etanol igual à 3:100 (m/m);
- (B) Extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂, com razão extrato:acetato de etila igual à 1:100 (m/m) e Pluronic F127:acetato de etila igual à 3:100 (m/m).

Em ambas as soluções orgânicas o extrato de *C. sylvestris* e o Pluronic F127 foram dissolvidos em etanol e acetato de etila 99,5 % nas proporções de 1:100 (m/m) e 3:100 (m/m), respectivamente, resultando em concentrações de extrato igual a 7,9 mg/mL e solvente igual a 24 mg/mL. Os extratos de *C. sylvestris* utilizados nos experimentos foram obtidos por extração supercrítica a 300 bar, 50 °C, adicionada de 5 % de etanol e a 300 bar, 50 °C, adicionada de 5 % de acetato de etila, ambos com vazão de CO₂ igual a 8,3 ± 2 g/min e 3,5 h de extração.

Os experimentos foram realizados em duas etapas: (1) para o sistema (A) foram testadas condições de precipitação em pressões de 80, 110 e 140 bar, temperatura de 45 °C, vazão de solução orgânica de 1,0 mL/min e de CO₂ de 8,43 L/min; (2) para os sistemas (A) e (B) foram testadas condições de precipitação em pressões de 90, 130 e 170 bar e temperatura de 35 °C e pressões de 110, 140 e 170 bar e temperatura de 45 °C, ambas com vazão de solução orgânica de 1,0 mL/min e de CO₂ de 8,43 L/min.

As condições de precipitação aplicadas foram selecionadas baseadas em testes de precipitação preliminares e no comportamento de

fases dos sistemas multicomponente estudados (A, B e C, descritos no item 4.9.2). Para a etapa (1), a 45 °C, os valores de pressão testadas (80, 110 e 140 bar) indicam condições experimentais localizadas abaixo, próximo e acima do ponto crítico da mistura, respectivamente, enquanto que para a etapa (2), a 35 °C e 45 °C, os valores de pressão testados indicam condições experimentais localizadas próximo e acima dos pontos críticos das misturas. O fluxo de CO₂ utilizado nos experimentos foi selecionado com a finalidade de promover intensa mistura entre a solução orgânica (extrato + solvente) e o antissolvente (CO₂) dentro da célula de precipitação, resultando em uma fração mássica de CO₂ igual a 95 % (m/m).

Os experimentos de precipitação iniciaram com o preenchimento do vaso de precipitação com CO₂ puro e, quando as condições de operação foram alcançadas (temperatura, pressão e fluxo de CO₂) e mantidas estáveis, 10 mL de solvente puro (etanol ou acetato de etila) foram injetados na câmara de precipitação para que o sistema atingisse o equilíbrio. Após, 30 mL de solução orgânica (extrato + polímero + solvente orgânico) foram injetados no precipitador por uma bomba de HPLC, seguido da injeção de CO₂ durante 15 minutos para promover a remoção do solvente orgânico e secagem total das partículas formadas. Após, a câmara de precipitação foi despressurizada até que esta atingisse a pressão atmosférica e as partículas precipitadas retidas no filtro foram coletadas. Todas as amostras foram armazenadas a -18 °C e protegidas da luz para evitar a decomposição do produto.

4.11. Caracterização das partículas obtidas pelo processo SAS

4.11.1. Morfologia e estimativa de tamanho das partículas

As amostras de partículas coletadas do precipitador foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM 6390LV-JEOL, USA), realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletônica - LCME da UFSC. As amostras foram aderidas à superfície do suporte e recobertas por uma fina camada de ouro para permitir a reflexão da luz e conseqüente avaliação das partículas. A estimativa do

tamanho das partículas foi realizada pelo programa ZEISS Image Analysis Software. O procedimento foi realizado de acordo com o recentemente descrito Mezzomo et al (2012).

4.11.2. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As partículas precipitadas e do extrato de *C. sylvestris* foram submetidos à análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) (Jade DSC - Perkin Elmer, USA), realizada no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos - PROFI, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Adaptado do método recentemente descrito por Mezzomo et al. (2012), as amostras precipitadas foram analisadas sob atmosfera de nitrogênio em temperaturas de -20 °C a 200 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As análises de DSC foram realizadas com o intuito de serem obtidas informações sobre a interação entre o carreador (Pluronic F127) e o material encapsulado (extrato) bem como estimar modificações de composição, grau de cristalinidade e temperatura de fusão causadas pelo processo SAS.

4.12. Determinação do teor de compostos fenólicos total (TFT)

A determinação do teor de compostos fenólicos total presente nos extratos de *C. sylvestris* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965; PESCHEL et al., 2006). A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorvância na faixa visível do espectro a 765 nm.

Para análise dos resultados é necessário preparar uma curva padrão de ácido gálico, com o objetivo de representar a absorvância da

amostra frente à concentração da curva padrão. Desta forma, dissolve-se cerca de 5,0 g de ácido gálico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda., Brasil), medidos em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, em H₂O destilada de modo a obter uma solução de concentração 5g/L (50 ppm) de ácido gálico. A partir desta solução estoque são diluídas alíquotas em balões volumétricos de 100 mL para a obtenção de soluções de concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferido para estes 10 µL de cada uma das diluições, aos quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA). Após 30 segundos e antes de 8 minutos após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Nuclear, CAQ Ind. e Com. Ltda., Brasil) a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 2 horas para que a reação ocorresse. A absorbância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (800 XI UV-VIS - FEMTO, Brasil) e o branco realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por água destilada.

A curva padrão de ácido gálico é apresentada através do gráfico de absorbância (ABS) versus concentração de ácido gálico (mg/L), no Apêndice II.

Cada um dos extratos testados foi diluído em etanol P.A. (Synth, Diadema/SP, Brasil) na concentração final de 1.667 mg/L, seguindo-se o mesmo procedimento de reação de oxidação descrito para a curva padrão. O branco foi realizado com todos os reagentes, substituindo-se a amostra por água destilada. Os valores de absorbância obtidos para cada um dos extratos foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico e o teor de compostos fenólicos total (TFT) foi determinado através da Equação 4.8.

A análise foi realizada em triplicata e o resultado expresso em mg EAG/g de extrato, como média ± desvio padrão.

$$TFT (mg EA G/g_{EXT}) = \left\{ \frac{[EAG \cdot 1000]}{D_{EXT}} \right\} \quad (4.8)$$

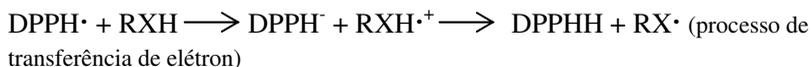
onde *EAG*: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg EAG/L), *D*: diluição das amostras (mg_{EXT}/L).

4.13. Avaliação da atividade antioxidante

O comportamento da atividade antioxidante dos extratos, determinado pelas metodologias a seguir descritas, foi utilizado para avaliar a qualidade dos extratos obtidos pelas extrações a baixa pressão e extração supercrítica, bem como comparar os resultados obtidos com o butil-hidroxitolueno (BHT), um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante. Cabe ressaltar que para um composto/extrato seja considerado com atividade antioxidante, é necessário que esse composto/extrato apresente atividade antioxidante mediante duas ou mais técnicas, uma vez que nenhum ensaio realizado isoladamente irá refletir a *capacidade antioxidante total* de uma amostra (PRIOR; CAO, 1999; SUCUPIRA et al., 2012). Neste trabalho, foram realizados os métodos dos radicais DPPH e ABTS e o método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoleico, descritos a seguir.

4.13.1. Método do radical DPPH

Na metodologia do DPPH, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina) é considerado estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio, sua absorção diminui (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Este processo pode ocorrer de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron:



No processo direto o antioxidante (RXH) doa um radical hidrogênio para o radical DPPH• tornando-o estável. O radical RX• é relativamente estável e não reage com os lipídios. No processo de transferência de elétron, primeiramente um elétron é cedido para o radical DPPH• pela molécula do antioxidante e, em seguida, é cedido o hidrogênio estabilizando o radical DPPH• e formando o radical estável RX•.

Neste trabalho, a metodologia do radical DPPH utilizada foi descrita por Mensor et al. (2001), que constitui na reação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 0,3 mmol/L e com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL) do extratos de *C. sylvestris* obtidos neste trabalho, em etanol P.A. (Synth, Diadema/SP, Brasil), com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (800 XI UV-VIS - FEMTO, Brasil). Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH pode ser calculado convertendo-se a absorbância em percentual de atividade antioxidante (AA %), conforme apresenta a Equação 4.9.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{AMOSTRA} - Abs_{BRANCO}) \cdot 100}{Abs_{CONTROLE}} \right] \quad (4.9)$$

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (CE₅₀) é calculada por análise de regressão exponencial e linear (MENSOR et al., 2001). Os valores de atividade antioxidante calculados (% AA) são referentes à maior concentração de extrato testado (500 mg/mL).

Os resultados encontrados de concentração efetiva (CE₅₀) e atividade antioxidante (AA %) para os extratos analisados em triplicata foram expressos como média ± desvio padrão.

4.13.2. Método do radical ABTS

A geração do radical catiônico ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] é base de um dos métodos espectrofotométricos para a medida de atividade antioxidante total de soluções. A atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* pelo método do radical ABTS neste trabalho foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Re et al., (1999). O radical monocátion pré-formado $ABTS^+$, gerado pela oxidação química do ABTS, é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio (flavonóides, carotenóides, etc.). A influência de ambas as concentrações de antioxidantes e a duração da reação na inibição da absorção do radical catiônico são levadas em consideração quando se determina o valor da atividade antioxidante.

O ABTS (Sigma-Aldrich, USA) é dissolvido em água até a concentração de 7,0 mM e submetido à reação com de persulfato de potássio (2,45 mM), pela mistura de quantidades equivalentes de cada solução, para a formação do radical. A mistura ficou ao abrigo da luz e sob refrigeração por 16 horas antes do uso. No momento da análise, a solução do radical $ABTS^+$ foi diluída em etanol até que se obtivesse absorvância de $0,70 \pm 0,02$ no comprimento de onda de 754 nm. Adicionou-se, então, 980 μL de solução de radical $ABTS^+$ e 20 μL de solução de extrato de *C. sylvestris* nas concentrações de 100, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (800 XI UV-VIS - FEMTO, Brasil) 6 minutos após a adição da amostra na solução de $ABTS^+$. Utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich, EUA) como antioxidante de referência, sendo preparado em etanol e estocado como solução padrão. O percentual de inibição do radical foi calculado através da Equação 4.10, em triplicata, e expresso como média \pm desvio padrão.

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \left[\left(\frac{Abs_f}{Abs_i} \right) \cdot 100 \right] \quad (4.10)$$

onde Abs_f é a absorvância após a adição da amostra ao radical ABTS para o tempo de 6 minutos e Abs_i é a absorvância do radical.

Uma curva padrão foi plotada em função do percentual de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ($\mu\text{M}/\text{mL}$), apresentada no Apêndice III. Após a obtenção do percentual de inibição de cada extrato, a atividade antioxidante (AA) foi calculada através da Equação 4.11, com base na curva padrão de Trolox. Desta forma, a análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de extrato ($\mu\text{M ET}/\text{g}$).

$$CA (\mu\text{M ET}/\text{g}) = \frac{Ca}{Ce} \quad (4.11)$$

onde Ca é a concentração ($\mu\text{M}/\text{mL}$) referente ao percentual de inibição obtido através das leituras espectrofotométricas do extrato e Ce é a concentração do extrato utilizada na técnica.

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

O método de determinação da atividade antioxidante pela descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico é fundamentado em medidas espectrofotométricas da perda de coloração (oxidação) do β -caroteno induzida por produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. A metodologia utilizada neste trabalho foi descrita por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006), na qual o sistema formado por β -caroteno e ácido linoleico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico 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 é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 minutos.

A metodologia consiste, inicialmente, na preparação de duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para a

emulsão de β -caroteno, foi transferido para um balão de 250 mL, 40 mg de ácido linoleico (Vetec Química Fina Ltda., RJ, Brasil), 400 mg de Tween-20 (Vetec Química Fina Ltda., RJ, Brasil) e 3,4 mg de β -caroteno (Sigma-Aldrich, USA), medidos em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama. A este balão adicionou-se 1 mL de clorofórmio (Merck S.A., Brasil) e agitou-se até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a 40 °C e à mistura foram adicionados 100 mL de água destilada, sendo manualmente agitada para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween-20, medidos em balança analítica (AY220, Shimadzu do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), com precisão ao décimo de miligrama, e 100 mL de água destilada, sendo também agitada manualmente. As duas emulsões foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até a realização das análises.

Uma alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. (Synth, Diadema/SP, Brasil) na concentração final de 1.667 mg/L. Imediatamente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (800 XI UV-VIS - FEMTO, Brasil) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL emulsão de branco e 200 μ L do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostaticado (ALB 250 C, Albras, Ribeirão Preto/SP, Brasil) a 50 °C durante 2 horas de reação, realizando-se leituras nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, onde a amostra foi substituída por etanol. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados de atividade antioxidante (AA %) foram calculados pela Equação 4.12 e expressos como média \pm desvio padrão.

$$AA\% = 1 - \left\{ \left[\frac{(Abs_{t:120} - Abs_{t:0})}{(Abs_{Controler:120} - Abs_{Controler:0})} \right] \cdot 100 \right\} \quad (4.12)$$

4.14. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante

A fim de avaliar o efeito redutor de peso corporal e redutor dos teores de glicose, de colesterol total e de triglicerídios sanguíneos advindos dos extratos *C. sylvestris*, uma análise *in vivo* foi realizada no Laboratório de Bioquímica Experimental - LABIOEX, do Departamento de Bioquímica da UFSC, de acordo com a metodologia recentemente descrita por Mezzomo (2012). Os extratos de *C. sylvestris* utilizados para avaliação da atividade antiobesidade e da atividade hipolipemiante foram os obtidos nas seguintes condições:

- SOX-ETOH: extração Soxhlet com etanol;
- SOX-ETOAC: extração Soxhlet com acetato de etila;
- ESC 300/50: extração supercrítica a 300 bar e 50 °C,
- ESC 300/50 + 5 % ETOH: extração supercrítica a 300 bar e 50 °C, adicionada de 5 % de etanol (m/m);
- ESC 300/50 + 5 % ETOAC: extração supercrítica a 300 bar e 50 °C, adicionada da 5 % de acetato de etila (m/m).

A seleção dessas condições para a realização do ensaio de atividade antiobesidade e hipolipemiante foi baseada nos seus elevados rendimentos de extração (conforme resultados apresentados no item 5.2.2), nos resultados de teor de fenólicos total (item 7.1) e atividade antioxidante (item 7.2) e nos resultados referentes ao efeito antitumoral, citotóxico e antiangiogênico de extratos supercríticos de *C. sylvestris*, relatados no estudo de Bucker (2012). O ensaio foi realizado utilizando-se 42 camundongos (*Mus musculus*) do tipo Balb/c machos, pesando aproximadamente 20 g e com cerca de 60 dias de vida, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no Biotério Setorial do LABIOEX.

Os animais foram aclimatados por 7 dias antes do tratamento, recebendo ração comercial autoclavada e água filtrada *ad libitum* para

adaptação e foram mantidos e manipulados de acordo com as exigências e recomendações legais cabíveis à espécie, de acordo com o *Guiding principles for the care and use of laboratory animals* (NHI, publicação #85.23, revisada em 1985), e com permissão da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o número de protocolo de pesquisa PP00744.

Para esse ensaio, os animais foram pesados e divididos em grupos de 6 camundongos de acordo com similaridade de peso corporal, totalizando 7 grupos, e alojados em gaiolas plásticas sob condições controladas de luz (12/12 horas de ciclo claro/escuro), temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar de 60 %. Os grupos de camundongos foram assim divididos:

- *Grupo 1*: controle negativo (grupo sem tratamento), o qual recebeu somente ração regular *ad libitum* e água (sem qualquer administração de extrato de *C. sylvestris* nem dieta hipercalórica);
- *Grupo 2*: controle positivo (grupo hipercalórico), que foi alimentado com dieta hipercalórica e água (sem administração de extrato de *C. sylvestris*);
- *Grupo 3*: grupo SOX-ETOH, o qual foi tratado com dieta hipercalórica, água e extrato de *C. sylvestris* obtido por extração Soxhlet com etanol, na concentração de 100 mg/kg_{camundongo}·dia;
- *Grupo 4*: grupo SOX-ETOAC, para o qual foi administrada a dieta hipercalórica, água e extrato de *C. sylvestris* obtido pelo sistema Soxhlet com acetato de etila na concentração de 100 mg/kg_{camundongo}·dia;
- *Grupo 5*: grupo ESC 300/50, para o qual foi fornecida dieta hipercalórica, água e extrato de *C. sylvestris* obtido por extração supercrítica na condição de 300 bar e 50 °C na concentração de 100 mg/kg_{camundongo}·dia;
- *Grupo 6*: grupo ESC 300/50 + 5% ETOH, o qual foi tratado com dieta hipercalórica, água e extrato de *C. sylvestris* obtido por extração supercrítica na condição de 300 bar e 50

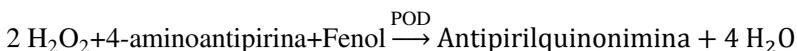
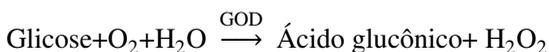
°C + 5 % de ETOH na concentração de 100 mg/kg_{camundongo}·dia;

- *Grupo 7*: grupo ESC 300/50 + 5% ETOAC, o qual foi tratado com dieta hipercalórica, água e extrato de *C. sylvestris* obtido por extração supercrítica na condição de 300 bar e 50 °C + 5 % de ETOAC na concentração de 100 mg/kg_{camundongo}·dia.

A dieta hipercalórica foi definida por Rothwell, Saville e Stock (1982) como *dieta de cafeteria*, sendo composta por alimentos diversos, conforme o Quadro 4.1.

As soluções de extrato foram preparadas na concentração de 100 mg_{extrato}/kg_{camundongo}·dia em solução salina adicionada de 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 04 gotas de Tween 80, ambos adicionados para que fosse possível a solubilização do extrato em solução salina, e administradas por gavagem (ingestão forçada) aos camundongos. O peso dos animais foi monitorado três vezes por semana durante todo o período de tratamento (30 dias) e, ao final do tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas para análise dos teores de glicose, colesterol total e triglicerídios, que foram mensurados utilizando métodos enzimáticos para determinação por reação de ponto final (ABELL et al. 1952; BUCOLO; DAVID, 1973) através de *kits* comerciais da Labtest Diagnóstica S. A. (Minas Gerais, Brasil).

O princípio do método enzimático de determinação de glicose está em que a enzima glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase (POD) através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra, tendo sua absorção máxima em 505 nm. As reações envolvidas são:

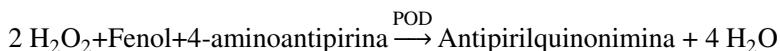


Quadro 4.1 - Composição e cronograma da dieta hipercalórica, proposta por Rothwell, Saville e Stock (1982).

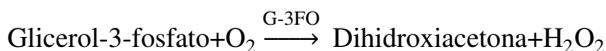
Dieta	Composição	Quantidade (g)	Período
1	Biscoito de chocolate Suspiros <i>Snack</i> de milho sabor queijo	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	1°-3° dia
2	Pé-de-moleque Chocolate Biscoito de chocolate	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	4°-6° dia
3	Amendoim <i>Snack</i> de trigo sabor <i>bacon</i> Suspiros	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	7°-9° dia
4	<i>Snack</i> de milho sabor queijo Rosquinha de leite Amendoim	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	10°-12° dia
5	Amendoim Biscoito de chocolate <i>Snack</i> de trigo sabor <i>bacon</i>	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	13°-15° dia
6	Rosquinha de leite <i>Snack</i> de trigo sabor <i>bacon</i> Amendoim	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	16°-18° dia
7	Bolacha sortida Batata frita Amendoim	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	19°-21° dia
8	Chocolate Queijo Pé-de-moleque	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	22°-24° dia
9	Bolacha sortida Pé-de-moleque Queijo	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	25°-27° dia
10	Queijo Rosquinha de leite Bolacha sortida	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	28°-30° dia

*A ração hipercalórica foi acrescida 15 g adicionais de ração comercial padronizada para complementação da dieta.

No método enzimático de determinação de colesterol total o princípio está baseado no fato de que os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase (CET) produzindo colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase (COD) a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra e as reações envolvidas são:



De forma semelhante, o método enzimático de determinação de triglicerídios segue o princípio de que a enzima lipoproteína lipase (LIP) promove a hidrólise dos triglicerídios existentes na amostra liberando glicerol livre, sendo posteriormente fosforilado pelo adenosina trifosfato (ATP) pela ação da glicerolquinase (GCQ), formando glicerol-3-fosfato. Este composto é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerol-3-fosfato oxidase (G-3FO). Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, que tem máximo de absorbância em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídios na amostra. As reações envolvidas são:



4.15. Determinação do perfil químico dos extratos

A análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos será realizada no Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Para a referida análise foi empregado um cromatógrafo CG-EM (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L, Varian, Inc., CA, USA), coluna VF5-MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m, Varian, Inc., CA, USA). Os ensaios foram realizados empregando-se o modo de injeção automática por *split* a uma taxa de 1:20. A temperatura do injetor foi de 300 °C. O gás de arraste foi o hélio usado a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, mantendo por 1 minuto, aquecendo a uma taxa de 9 °C/min até 300 °C, mantendo por 20 minutos. Os compostos majoritários presentes em cada amostra foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology/NIST - Mass-Spectral Library with Windows Search Program - Version 2*), onde os espectros de massa foram comparados com os padrões quantificados por normalização das áreas. Os critérios adotados para a escolha dos compostos a serem identificados foram o percentual de área e a confiabilidade na comparação dos espectrogramas com os padrões.

4.16. Análise estatística

Os resultados de rendimento de extração (item 5.2.2), de teor de compostos fenólicos total (item 7.1), de atividades antioxidantes (item 7.2) e de efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante (item 7.3) dos diferentes extratos de *C. sylvestris* foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA), para observar a significância dos parâmetros de processo sobre os resultados observados.

O plano de experimentos de ESC com CO₂ puro foi organizado com duas variáveis, temperatura (T) e pressão (P), nos níveis 40, 50 e 60

°C e 100, 200 e 300 bar, com uma replicação. A ANOVA dos rendimentos obtidos através de ESC com diferentes concentrações de cossolvente foi realizada considerando estes como experimentos de fator único (concentração de cossolvente) com uma replicação. Para os rendimentos obtidos através das extrações a baixa pressão a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. Se, segundo a ANOVA existir diferença significativa ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos (tipo ou condição de extração) pode-se dar continuidade à análise aplicando o teste de *Tukey* o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos. A mesma abordagem foi realizada para avaliar as diferenças entre os pares de tratamentos para as atividades antioxidantes, teor de compostos fenólicos total e efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante dos diferentes extratos de *C. sylvestris*. Sendo assim, o teste de *Tukey* foi aplicado para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos resultados obtidos (MONTGOMERY, 2005).

4.17. Resumo dos ensaios

O Quadro 4.2 apresenta o resumo dos ensaios realizados para os extratos de *C. sylvestris* obtidos, incluindo as diversas técnicas de extração empregadas, rendimento, análises de atividade biológica e de perfil químico, bem como a determinação de equilíbrio de fases e ensaios de precipitação e encapsulamento.

Quadro 4.2 - Resumo dos ensaios realizados (✓) para o extrato de *C. sylvestris*.

Condições de Extração	Análises						Tratamentos			
	PQ	DPPH	TFT	β-caroteno	ABTS	EO/HH	X ₀	EF	PPT	AE
Extração Soxhlet										
SOX-ETOH	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
SOX-ETOAC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓
SOX-DCM	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
SOX-HX	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
SOX-CLF	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
Maceração										
MAC-ETOH	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
MAC-ETOAC	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
MAC-DCM	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
MAC-HX	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
MAC-CLF	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
Extração Supercrítica – Cinética [P(bar)/T(°C)/Q_{CO2}(g/min)]										
200/40/ 8 ±2g/min							✓			
Extração Supercrítica – Determinação do Rendimento [P(bar)/T(°C)/Solvente]										
100/40/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/40/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
300/40/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
100/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
300/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
100/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓

300/50/ CO ₂	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +2%ETOH	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +5%ETOH	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +8%ETOH	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +11%ETOH		✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +2%ETOAC	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +5%ETOAC	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
200/50/CO ₂ +8%ETOAC	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓
300/40/CO ₂ +2%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
300/40/CO ₂ +5%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
300/40/CO ₂ +8%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
300/50/CO ₂ +2%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
300/50/CO ₂ +5%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
300/50/CO ₂ +8%ETOH		✓	✓	✓	✓					✓
Determinação do Equilíbrio de Fases [P(bar)/T(°C)/Solvente]										
300/50/CO ₂ +5%ETOH		✓	✓	✓	✓	✓		✓		
300/50/CO ₂ +5%ETOH +PLURONIC F127		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
300/50/CO ₂ +5%ETOAC +PLURONIC F127								✓	✓	

PQ: perfil químico; DPPH: método DPPH; TFT: teor de compostos fenólicos total; β -Caroteno: método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico; ABTS: método do radical ABTS; TBARS: proteção contra peroxidação lipídica *in vitro*; EO/HH: efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante; X₀: rendimento global de extração; EF: equilíbrio de fases; PPT: precipitação/encapsulamento; AE: análise estatística; SOX: Soxhlet; MAC: maceração; ETOH: etanol; ETOAC: acetato de etila; DCM: diclorometano; HX: hexano; CLF: clorofórmio.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: Caracterização da matéria-prima *Casearia sylvestris* e determinação do rendimento global de extração comparando a tecnologia supercrítica com processos à baixa pressão

5.1. Caracterização da matéria-prima e do leite de partículas da ESC

Ensaio iniciais foram realizados com a finalidade de caracterizar as folhas de *Casearia sylvestris* a serem utilizadas como matéria-prima neste estudo, e também para definir os parâmetros de processo para a extração, como quantidade de matéria-prima a ser utilizada para a formação do leite fixo de partículas, tempo de extração e vazão de solvente supercrítico.

A Tabela 5.1 apresenta os valores do teor de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima *in natura* (aproximado), informado pela empresa *Brazervas Laboratório Fitoterápico Ltda.*, e os valores do teor de umidade e substâncias voláteis, do teor de lipídios, do resíduo mineral fixo (cinzas), do teor de nitrogênio total e do teor de fibras dietéticas total, solúvel e insolúvel e carboidratos da matéria-prima fornecida, previamente submetida ao processo de secagem na própria empresa. A matéria-prima desidratada foi utilizada nas extrações realizadas neste trabalho para obtenção dos extratos. Os dados apresentados na Tabela 5.1 foram obtidos a partir de ensaios em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão, com exceção do resultado para umidade e substâncias voláteis da matéria-prima *in natura* e dos resultados do teor de nitrogênio total e fibra dietética total, solúvel e insolúvel, conforme descrito nos itens 4.3.3 e 4.3.4, e para carboidratos, sendo esse determinado por diferença.

De acordo com a Tabela 5.1, as folhas de *C. sylvestris in natura* apresentam aproximadamente 50 % (m/m) de umidade e substâncias voláteis. Esta informação foi fornecida pela empresa *Brazervas*

Laboratório Fitoterápico Ltda., uma vez que as folhas recebidas no LATESC chegaram desidratadas, da mesma forma como são comercializadas pela empresa.

Tabela 5.1 - Caracterização da matéria-prima *in natura* e da matéria-prima utilizada nas extrações (em base seca).

Análise	Resultado (g/100 g)
Matéria-prima <i>in natura</i>	
Umidade e substâncias voláteis	± 50
Matéria-prima	
Umidade e substâncias voláteis	$13,72 \pm 0,05$
Cinzas	$9,02 \pm 0,05$
Lipídios⁽¹⁾	$5,1 \pm 0,2$
Nitrogênio total	16,03
Fibra dietética total	49,4
Solúvel	2,2
Insolúvel	47,2
Carboidratos⁽²⁾	6,73

⁽¹⁾ Lipídios determinados por extração Soxhlet utilizando hexano como solvente, conforme o item 4.4.1.

⁽²⁾ Carboidratos determinado por diferença.

As folhas da *C. sylvestris* são comumente empregadas na medicina popular de diversas formas, conforme apresentado no item 3.1.2. Além do uso medicinal, no Pantanal Mato-Grossense essa espécie é uma importante planta forrageira para bovinos, tanto no período de cheia dos rios quanto no período de seca. Contudo, não é muito consumida quando há abundância de pastagem. Também, as folhas dessa espécie fazem parte da dieta alimentar do macaco-bugio ou guariba (*Alouatta guariba*) (CARVALHO, 2007). Além disso, a planta apresenta características adequadas para a produção de papel por apresentar fibras com comprimento médio de 1,54 mm e alto teor de lignina (25,61 %). Porém, produz madeira de baixo valor comercial para produção de energia, sendo bastante utilizada para a produção de cabos de madeira para ferramentas e utensílios domésticos (CARVALHO, 2007).

O objetivo principal deste estudo foi a obtenção do extrato *C. sylvestris* mediante o emprego de diferentes técnicas. Após o processo de extração para a obtenção desses extratos, a matriz vegetal pode permanecer ainda rica em constituintes, como fibras, proteínas e carboidratos, conforme apresentado na Tabela 5.1, podendo ser utilizada para alimentação animal. Estes constituintes, que representaram 72 % (m/m) da matéria-prima (folhas secas), incluem os valores de proteínas (16,03 %), de fibra dietética total (49,4 %), que compreendem as fibras solúveis e insolúveis, e de carboidratos (6,73 %), obtido por diferença, que não são extraídos durante o processo extrativo. De acordo com Carvalho (2007), o teor de proteína bruta das folhas de *C. sylvestris* é de aproximadamente 13 % (m/m), valor este semelhante ao obtido neste trabalho, o que confirma que a *C. sylvestris* é uma boa fonte proteica para alimentação de bovinos, por exemplo. Sobre as demais substâncias (Tabela 5.1), fibra dietética total e carboidratos, cujo valor percentual foi obtido por diferença no presente estudo, não foram encontrados estudos na literatura sobre os percentuais referentes à composição físico-química das folhas de *C. sylvestris*, exceto para valores de umidade e substâncias voláteis, de proteínas e de resíduo mineral fixo (cinzas).

O conteúdo de cinzas ($9,02 \pm 0,05$ %, m/m) e de umidade e substâncias voláteis da matéria-prima seca e triturada ($13,72 \pm 0,05$ %, m/m) encontrados neste trabalho são semelhantes aos relatados no trabalho de Luz et al. (1998), em um estudo que visava identificar parâmetros de qualidade de folhas de *C. sylvestris* em diferentes localidades do Brasil. Os autores encontraram valores que variaram entre 4,8 e 8,0 % (m/m) para cinzas, e entre 5,5 e 11,0 % (m/m) para umidade. Com relação a este último parâmetro, os autores utilizaram o método azeotrópico com tolueno-água em aparelho de Clevenger em substituição ao aparelho proposto por Dean e Stark para destilação azeotrópica. Considerando essa informação, isso pode explicar a diferença no valor encontrado neste trabalho (13,72 %, m/m), uma vez que junto com a umidade foram determinadas substâncias voláteis pelo método da estufa a 105 °C, conforme descrito no item 4.3.1.

O resultado encontrado neste trabalho para o teor de lipídios obtido por extração Soxhlet com hexano ($5,1 \pm 0,2 \%$, m/m) foi superior ao encontrado por Carvalho, Santos e Cavalheiro (2009). Os autores encontraram rendimento de $0,6 \%$ (m/m) para o solvente hexano, porém mediante o emprego da técnica de banho ultrassônico. Na literatura consultada não foram encontrados relatos sobre extração Soxhlet de folhas de *C. sylvestris* que pudessem ser utilizados como comparativos.

Além das características apresentadas, a caracterização das partículas utilizadas na formação do leito da ESC é de importância para a aplicação de modelos de transferência de massa descrito por Sovová (1994) e Goto, Sato e Hirose (1993). Após o recebimento e subsequente operação de moagem da matéria-prima, realizou-se a determinação do diâmetro médio de partícula, calculado de acordo com as Equações 4.3 e 4.4. Este resultado é apresentado na Tabela 5.2 juntamente com os valores de massa específica aparente e real do sólido, de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente; e a porosidade do leito, calculada conforme a Equação 4.6. Para o diâmetro médio da partícula obteve-se o valor de $0,37 \pm 0,04$ mm (ou 372 ± 37 μm) e para as massas específicas aparente e real, os valores encontrados foram $0,58 \pm 0,03$ g/cm³ e $1,454 \pm 0,006$ g/cm³, respectivamente. Com esses dois valores, a porosidade do leito calculada foi de $0,6011$.

Tabela 5.2 - Caracterização da partícula e do leito de partículas formado para a extração com fluido supercrítico.

Diâmetro médio de partícula (mm)	Massa específica aparente ρ_a (g/cm ³)	Massa específica real ρ_r (g/cm ³)	Porosidade do leito (ϵ)
$0,37 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,03$	$1,454 \pm 0,006$	$0,6011$

5.2. Extração supercrítica (ESC)

5.2.1. Testes preliminares e determinação das etapas CER, FER e DCP

Alguns ensaios prévios foram realizados para possibilitar a definição das condições de operação adequadas para obtenção de

extratos de *Casearia sylvestris* por meio de extrações com CO₂ supercrítico e extrações à baixa pressão. Os parâmetros de processo determinados nos ensaios preliminares foram: tamanho de partícula, massa de sólidos para formação do leito fixo de partículas e tempo de extração.

De acordo com o resultado apresentado na Tabela 5.2, o diâmetro médio de partícula calculado resultou em $0,37 \pm 0,04$ mm. A matriz sólida foi avaliada visualmente após a extração com fluido supercrítico, e observou-se compactação adequada e coloração homogênea, com perda da cor verde intensa, tanto na direção radial quanto na direção longitudinal, indicando a não formação de caminhos preferenciais de extração (MARTÍNEZ, 2005).

Nos testes preliminares, bem como nos experimentos cinéticos e nos experimentos de rendimento global, apresentados nas seções 4.7.2 e 4.7.3, respectivamente, testou-se a utilização de 15 g de amostra para a formação do leito. Esta quantidade de amostra foi escolhida por dois motivos: (a) quantidade de matéria-prima adequada para obtenção de extrato suficiente para ser empregada nas análises de atividade antioxidante, teor de fenólicos total, efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante, perfil químico, equilíbrio de fases e ensaios de precipitação e encapsulamento dos extratos de *C. sylvestris*, descritos no Capítulo 4, e (b) formação de um leito de partículas com altura de, pelo menos, o dobro do diâmetro do extrator, a fim de se desprezar a dispersão axial no leito durante a extração, visando a modelagem matemática. O volume ocupado pela matéria-prima no extrator foi calculado através da altura preenchida pelas partículas sólidas dentro do leito, sendo este volume igual a 26 ± 1 mL. O restante do volume do leito foi preenchido com esferas de vidro separadas da matéria-prima por uma fina camada de algodão, evitando assim sua mistura e mantendo constante a altura do leito durante a extração.

A vazão de solvente (CO₂) selecionada foi 8 ± 2 g/min para as extrações de rendimento e estudo da cinética. Para a determinação do rendimento global (X_0) foi necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão

empregadas. Este tempo foi definido com base nas etapas da curva de extração, conforme descrito no item 3.2.3.4. Na etapa de taxa constante de extração (CER) as partículas se encontram completamente envoltas por uma camada superficial de soluto, fazendo com que o processo seja caracterizado pela transferência de massa por convecção entre a superfície do sólido e o solvente. Após a etapa CER, ocorre a etapa decrescente de extração (FER), causada pela exaustão da camada de soluto na superfície das partículas. A partir deste momento, o processo difusional começa a controlar a transferência de massa, pois o solvente encontra espaços livres para penetração na matriz sólida, solubilização do soluto e posterior difusão da mistura soluto-solvente para a superfície da partícula. A última etapa ou etapa difusional apresenta taxa quase nula de extração, onde a inclinação da curva diminui e a curva se aproxima do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (X_0) (FERREIRA, 1991; FERREIRA; MEIRELES, 2002).

Desta forma, para a determinação de X_0 , o tempo de extração deve assegurar que a etapa de extração quase nula seja alcançada. A Figura 5.1 apresenta a curva de extração a 200 bar, 40 °C e vazão 8 ± 2 g/min obtida no equipamento apresentado no item 4.7.1. A Figura 5.1 também apresenta os períodos de extração CER, FER e DCP.

Pela análise do comportamento da curva de extração do soluto com o tempo (Figura 5.1), pode-se observar que o tempo necessário para que a etapa difusiva seja alcançada é de aproximadamente 200 minutos. A partir disto, padronizou-se um tempo de extração de 210 minutos, ou 3,5 horas, garantindo assim que a etapa difusional seja alcançada, sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de X_0 devido à extração da maior parte de soluto disponível. Este tempo de extração (3,5 horas) e a vazão de solvente (8 ± 2 g/min) implicam em um consumo de 1.680 g de CO_2 por extração ($m_{\text{solvente}}/M = 112$). O Apêndice I apresenta os dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do tempo para a curva de extração com fluido supercrítico de *C. sylvestris* a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO_2 .

De acordo com a Figura 5.1, o período CER ocorre aproximadamente entre 0 e 60 minutos, o período FER está

compreendido entre 60 e 210 minutos e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 210 minutos. A Tabela 5.3 apresenta os parâmetros cinéticos de cada um dos períodos, descritos em 3.4.3.5, e obtidos a partir da Figura 5.1.

Figura 5.1 - Curva de extração com fluido supercrítico de *C. sylvestris* a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO₂.

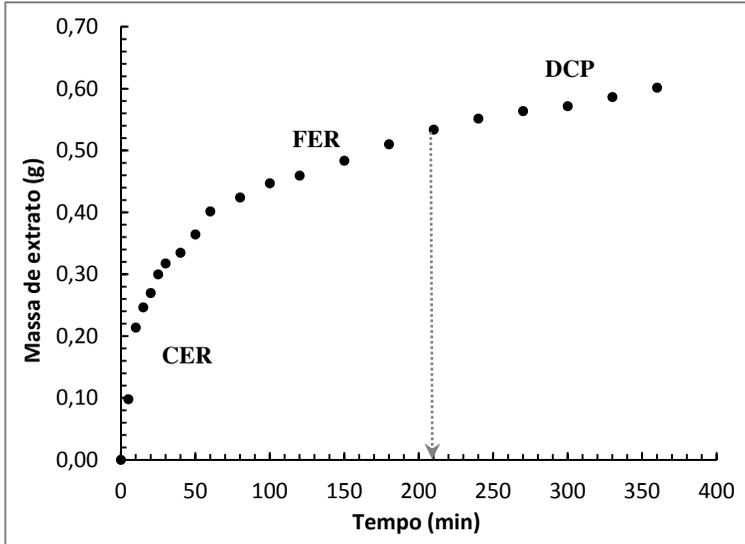


Tabela 5.3 - Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico de *C. sylvestris*, realizada a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g/min de CO₂.

Período de Extração			
Parâmetro	CER ⁽⁶⁾	FER ⁽⁷⁾	DCP ⁽⁸⁾
$t^{(1)}$ (min)	0 - 60	60 - 210	> 210
$m^{(2)}$ (g)	0,4016	0,1322	0,0679
$X_0^{(3)}$ (%)	66,74	21,97	11,28
$M^{(4)}$ (g/min)	0,0067	0,0009	0,0004
$Y^{(5)}$	$8,0320 \cdot 10^{-4}$	-	-

⁽¹⁾t: duração da etapa de extração; ⁽²⁾m: massa de extrato aproximada; ⁽³⁾X₀: rendimento da etapa; ⁽⁴⁾M: taxa de extração; ⁽⁵⁾Y: concentração de soluto na fase solvente (kg/kg); ⁽⁶⁾CER: etapa de extração constante; ⁽⁷⁾FER: etapa de extração decrescente; ⁽⁸⁾DCP: etapa difusional.

5.2.2. Determinação do rendimento global de extrato (X_0)

Os rendimentos dos extratos *C. sylvestris* obtidos através das técnicas de extração a baixa pressão, como Soxhlet e maceração, com diferentes solventes, estão apresentados na Tabela 5.4. O índice de polaridade dos solventes empregados e a análise estatística pelo Teste de *Tukey* para os resultados de rendimento também são mostrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de *C. sylvestris* com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade (em base seca).

Técnica de Extração	Solvente	IP do Solvente ⁽¹⁾	X_0 (%) ⁽²⁾
SOX	HX	0	5,1 ^{de} ± 0,2
SOX	DCM	3,1	6,5 ^{cde} ± 0,2
SOX	CLF	4,1	7,0 ^{cde} ± 0,3
SOX	ETOAC	4,4	8 ^c ± 1
SOX	ETOH	5,2	23 ^a ± 1
MAC	HX	0	4,0 ^c ± 0,2
MAC	DCM	3,1	6,2 ^{cde} ± 0,3
MAC	CLF	4,1	6,6 ^{cde} ± 0,2
MAC	ETOAC	4,4	7,3 ^{cd} ± 0,7
MAC	ETOH	5,2	13 ^b ± 1

SOX: Soxhlet; MAC: maceração; HX: hexano; DCM: diclorometano; CLF: clorofórmio; ETOAC: acetato de etila; ETOH: etanol.

⁽¹⁾ Índice de polaridade do solvente (PHENOMENEX,2013).

⁽²⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados na Tabela 5.4 indicam que os maiores rendimentos foram obtidos para as extrações em Soxhlet com etanol (SOX-ETOH) e com acetato de etila (SOX-ETOAC) e para maceração com etanol (MAC-ETOH) e com acetato de etila (MAC-ETOAC), alcançando valores de 23 ± 1 % (m/m) e 8 ± 1 % (m/m) e de 13 ± 1 % (m/m) e $7,3 \pm 0,7$ % (m/m), respectivamente. De acordo com a ANOVA não existe diferença significativa entre as extrações SOX-ETOAC e MAC-ETOAC, porém ambas diferem significativamente das extrações SOX-ETOH e MAC-ETOH, ao nível de significância de 5 %.

De acordo com a Tabela 5.4, os rendimentos das demais extrações, SOX-HX, SOX-DCM, SOX-CLF, MAC-DCM, MAC-CLF, não diferiram significativamente entre si, ao nível de significância de 5 %, bem como das extrações SOX e MAC com acetato de etila. Essas últimas apenas apresentaram rendimentos ligeiramente superiores às demais. Pela ANOVA, a extração que apresentou diferença significativa em relação às demais foi MAC-HX, com o mais baixo valor de rendimento de $4,0 \pm 0,2$ % (m/m).

Ao se comparar os diferentes métodos de extração para um mesmo solvente nota-se que a extração SOX-ETOH (23 ± 1 %, m/m) apresentou um rendimento maior e estatisticamente diferente do rendimento de MAC-ETOH (13 ± 1 %, m/m). Neste caso, a temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações solvente-componentes da *C. sylvestris* podem ter contribuído para a maior dissolução e rendimento. Na extração em Soxhlet, realizada em temperaturas mais elevadas, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas quando comparadas a extrações em temperatura inferior, como é o caso da maceração. Assim, com uma maior temperatura de processo, o solvente pode alcançar com maior facilidade os espaços da matriz sólida que contém solutos, solubilizando uma maior variedade e quantidade destes compostos (MARKON et al., 2007).

Avaliando-se o efeito da polaridade do solvente no rendimento de extração observa-se que rendimentos mais elevados de extrato de *C. sylvestris* foram obtidos com o solvente mais polar, como é o caso do etanol, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade mais elevada. De acordo com Barwick (1997), a polaridade de um composto é definida em função da habilidade da molécula em participar de interações, de todos os tipos, com outras moléculas polares presentes no sistema. Em contrapartida, as extrações com solventes de baixa polaridade, como o hexano e o CO₂ (Tabela 5.5), apresentaram os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes na matriz vegetal da *C. sylvestris*. Para os solventes de polaridade intermediária, como diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, os valores de rendimento

apresentaram-se semelhantes aos obtidos nas extrações com solventes apolares.

Bandeira et al. (2006) estudaram a otimização das condições de extração de casearinas provenientes de *C. sylvestris* utilizando a metodologia de superfície de resposta. Dentre os resultados obtidos, os autores relataram que o processo de extração por maceração, utilizando solvente puro, teve condições ótimas estimadas em 52 horas de extração, índice de polaridade do solvente igual a 5,1 e rendimento de extrato bruto de 7,8 %. Neste trabalho, o solvente que possui índice de polaridade semelhante ao indicado pelos autores é o etanol (5,2), o qual apresentou um rendimento de 13 ± 1 % obtido pela mesma técnica (Tabela 5.4), porém, utilizando um tempo de processo 3,2 vezes maior (7 dias) que o indicado por Bandeira et al. (2006). O tempo de extração de 7 dias utilizado neste trabalho, foi adotado de acordo com o indicado pela literatura consultada para a execução da técnica (item 4.4.2). Quando o processo é realizado por sonicação, para um solvente com índice de polaridade igual a 5,4 (também próximo ao etanol), o tempo de extração é reduzido para 1,4 horas e o rendimento aumentado para 14,6 % (BANDEIRA et al., 2006).

Carvalho, Santos e Cavalheiro (2009) trabalharam na identificação de diterpenos clerodânicos de extratos de diferentes partes da *C. sylvestris*, obtidos por extração em 03 etapas sequenciais da mesma matéria-prima em banho ultrassônico. Como resultados, os autores apresentaram 6,8 % de rendimento para extração etanólica e 0,6 % de rendimento para extração com hexano, ambas utilizando as folhas de *C. sylvestris* como matéria-prima. Neste trabalho, mesmo utilizando a maceração como técnica de extração comparativa ao trabalho dos autores citados, os rendimentos obtidos foram superiores aos relatados, apresentando 13 ± 1 % para o etanol e $4,0 \pm 0,2$ % para o hexano (Tabela 5.4), indicando que o banho ultrassônico pode não ser a técnica mais indicada para obtenção de extratos de folhas de *C. sylvestris*.

De acordo com os resultados obtidos nas técnicas à baixa pressão com diferentes solventes, o etanol e o acetato de etila mostraram-se solventes adequados para serem utilizados como

cossolvente para a ESC, por apresentarem os mais altos rendimentos, tanto na extração com Soxhlet quanto na extração por maceração (Tabela 5.4).

Segundo Martínez et al. (2003), o rendimento global da extração para o processo ESC em leito fixo de partícula e método dinâmico de extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado. A Tabela 5.5 apresenta os resultados médios de rendimento global de extração (X_0) dos experimentos realizados por ESC com *C. sylvestris* e as condições de temperatura (T) e pressão (P) utilizadas nos ensaios, calculado pela Equação 4.7. Os dados correspondentes de massa específica (ρ) do CO₂ também são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de *C. sylvestris* com vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca).

T (°C)	P (bar)	ρ CO ₂ (g/cm ³) ⁽¹⁾	X_0 (%) ⁽²⁾
40	100	0,629	3,5 ^c ± 0,2
50	100	0,385	3,0 ^{cd} ± 0,1
60	100	0,290	1,8 ^d ± 0,2
40	200	0,840	3,8 ^{bc} ± 0,1
50	200	0,785	4,11 ^{bc} ± 0,06
60	200	0,724	5,6 ^a ± 0,5
40	300	0,911	4,11 ^{bc} ± 0,07
50	300	0,871	4,9 ^{ab} ± 0,3
60	300	0,830	5,8 ^a ± 0,6

⁽¹⁾ ANGUS; ARMSTRONG; DE REUCK, 1976.

⁽²⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

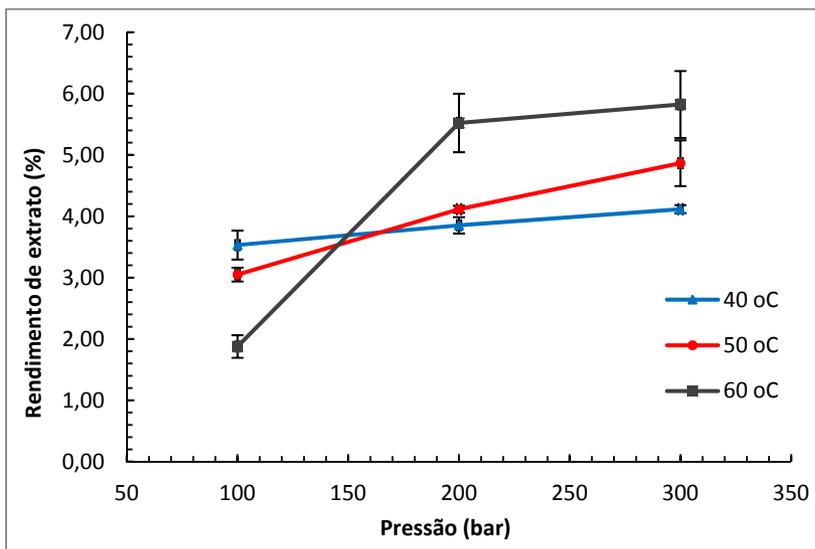
De acordo com a Tabela 5.5 os maiores rendimentos de ESC obtidos para a *C. sylvestris* foram de $5,8 \pm 0,6$ % (m/m) para a condição de 300 bar e 60 °C e de $5,6 \pm 0,5$ % (m/m) para a condição de 200 bar e 60 °C, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). As outras

condições testadas de pressão (de 100 até 300 bar) e temperaturas (de 40 °C até 60 °C), como pode ser verificado na Tabela 5.5, apresentaram resultados X_0 estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Ainda de acordo com a Tabela 5.5, os resultados demonstram que o rendimento da extração aumenta com o aumento da pressão à temperatura constante. Para a condição isotérmica de 50 °C, o rendimento aumenta de $3,0 \pm 0,1$ % (m/m) para $4,9 \pm 0,3$ % (m/m) quando a pressão de operação é elevada de 100 para 300 bar, respectivamente, sendo estatisticamente diferentes entre si. O mesmo comportamento também é observado na temperatura de 60 °C. Este desempenho é justificado pela elevação da massa específica do solvente supercrítico com a pressão, ou seja, ocorre um aumento do poder de solvatação do CO₂ com a densidade (BRUNNER, 1994).

Já o efeito da temperatura é adverso. Enquanto a densidade do solvente aumenta com a diminuição da temperatura, aumentando o poder de solvatação, a pressão de vapor do soluto diminui com a temperatura, reduzindo o poder de solvatação (BRUNNER, 1994). Assim, a partir dos dados apresentados na Tabela 5.5, na condição de 100 bar, o rendimento diminui de $3,5 \pm 0,2$ % (m/m) para $1,8 \pm 0,2$ % (m/m) com a elevação da temperatura de 40 °C para 60 °C, devido a redução na massa específica do CO₂ supercrítico. Porém, um efeito contrário ocorre para pressões acima da região entre 140 e 160 bar. O aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C aumenta o rendimento, de acordo com os dados apresentados na Tabela 5.5. Este aumento no rendimento pode ser melhor visualizado na Figura 5.2, que apresenta as isotermas de rendimento do extrato de *C. sylvestris* em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação (dados da Tabela 5.5) para as temperaturas de 40 °C a 60 °C. Desta forma, acima da pressão entre 140 e 160 bar, o efeito da pressão de vapor é dominante, enquanto que abaixo desta região de pressão o efeito da densidade do solvente é mais importante. Esta oposição de efeitos resulta na inversão das isotermas de rendimento, conhecido como fenômeno de retrogradação (MICHIELIN et al., 2005).

Figura 5.2 - Isotermas de rendimento com a pressão de extração para as ESC de *C. sylvestris* em experimentos realizados com vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min.



Na Figura 5.2 percebe-se que as isotermas mostram uma inversão na região entre 140 e 160 bar, representando a possível região de retrogradação. Este fenômeno representa a influência da pressão de vapor do soluto e do poder de solvatação do solvente, no valor da solubilidade e, conseqüentemente, no rendimento de processo (MICHIELIN et al., 2005; CASAS et al., 2007; ALMEIDA; FERREIRA, 2007).

Kizberger et al. (2009) relataram que a faixa de inversão das isotermas para o extrato de cogumelo *Shiitake* é próxima a 170 bar. Segundo Mezzomo et al. (2010), a faixa de inversão das isotermas de 30 °C, 40 °C e 50 °C para o óleo de amêndoa de pêssego ocorre entre 260 bar e 280 bar. Michielin et al. (2009) identificaram o fenômeno da retrogradação para *Cordia verbenacea* na faixa de pressão compreendida entre 140 bar e 150 bar, para todas as isotermas testadas. Estes resultados são semelhantes ao comportamento encontrado neste estudo, onde se sugere que para pressões abaixo da inversão a densidade do solvente é o efeito dominante, enquanto que para pressões acima

desta inversão, a pressão de vapor do soluto é o principal mecanismo que afeta o processo de extração (MICHIELIN et al., 2005), conforme já mencionado anteriormente. A discrepância entre as faixas de inversão mencionadas ocorre devido a diferenças nas matrizes vegetais utilizadas, estando relacionada à composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e da estrutura dos ácidos graxos presentes no soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010).

A Tabela 5.6 apresenta a ANOVA para os resultados de rendimento da extração supercrítica de *C. sylvestris* em função dos efeitos das variáveis temperatura (T) e pressão (P) de operação.

Tabela 5.6 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 40 °C a 60 °C, e pressão (P), de 100 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de *C. sylvestris*.

Efeito	SQ ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	F ⁽³⁾	p ⁽⁴⁾
T (°C)	0,8265	2	5,442	0,025175
P (bar)	11,2253	2	73,910	0,000001
Interação T x P	6,2446	4	20,558	0,000082
Erro	0,7594	10	-	-

⁽¹⁾ SQ: Soma dos Quadrados; ⁽²⁾ GL: Graus de liberdade; ⁽³⁾ F: Valor F (estatística do teste); ⁽⁴⁾ p: Probabilidade.

Segundo a ANOVA, a pressão ($p = 0,000001$) e a temperatura ($p = 0,025175$) apresentaram efeito significativo sobre o valor de X_0 , assim como a interação entre pressão e temperatura ($p = 0,000082$), ao nível de 5 % de significância, indicando que o efeito da pressão depende da temperatura, dentro da faixa de pressão estudada (100 bar a 300 bar).

Para avaliar a influência da temperatura e da pressão sobre o rendimento global da ESC para a região próxima ao ponto de inversão das isotermas (140 bar a 160 bar) foi realizada a análise estatística dos valores de X_0 . Os resultados obtidos pela ANOVA são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T) nas pressões de 100 a 200 bar sobre o rendimento da ESC de *C. sylvestris*.

Efeito	SQ⁽¹⁾	GL⁽²⁾	F⁽³⁾	p⁽⁴⁾
T (°C)	0,0264	2	0,215	0,811818
P (bar)	6,6495	1	108,095	0,000017
Interação T x P	5,0666	2	41,181	0,000135
Erro	0,4306	7	-	-

⁽¹⁾ SQ: Soma dos Quadrados; ⁽²⁾ GL: Graus de liberdade; ⁽³⁾ F: Valor *F* (estatística do teste); ⁽⁴⁾ *p*: Probabilidade.

Segundo a ANOVA, a temperatura ($p = 0,811818$) não apresentou efeito significativo no rendimento global da *C. sylvestris* ao nível de 5 % de significância. No entanto, o efeito da pressão ($p = 0,000017$) e a interação entre pressão e temperatura ($p = 0,000135$) são significativos estatisticamente, sendo considerados como fatores de influência no rendimento da extração na faixa de pressão de 100 bar a 200 bar.

O fato da temperatura não apresentar influência significativa sobre o rendimento global de 100 a 200 bar é devido ao efeito contrário que esta apresenta na região de inversão das isotermas (entre 140 e 160 bar). Para pressões menores que a pressão de inversão a menor temperatura (40 °C) implica em maior rendimento e para pressões maiores que a de inversão ocorre o contrário e, desta forma, na análise estatística o efeito da temperatura não se mostra significativo.

De acordo com os resultados da ANOVA apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7, o efeito da pressão sobre o rendimento é encontrado quando os resultados X_0 são avaliados de 100 a 300 bar e na faixa que inclui a inversão (100 a 200 bar). Isto confirma que o efeito da pressão é dominante em todo o processo de ESC para a *C. sylvestris*. Já, o efeito da temperatura apresentado como não significativo estatisticamente na região da inversão (Tabela 5.7), pode estar relacionado à pequena faixa de temperatura avaliada ($\Delta T=10$ °C entre as isotermas) e às diferenças não significativas entre a maioria dos rendimentos (Tabela 5.5).

De acordo com os resultados obtidos para as extrações à baixa pressão (Tabela 5.4), os rendimentos obtidos com Soxhlet e maceração foram, em sua maioria, superiores aos rendimentos da ESC (Tabela 5.5), exceto para uso de hexano (apolar) como solvente. Os rendimentos de Soxhlet (Tabela 5.4) que foram mais expressivos foram obtidos com, etanol (23 ± 1 %, m/m) e acetato de etila (8 ± 1 %, m/m), assim como para a maceração (Tabela 5.4), com rendimentos de extração de 13 ± 1 % (m/m) e $7,3 \pm 0,7$ % (m/m), para etanol e acetato de etila, respectivamente. Já nas extrações com fluido supercrítico (Tabela 5.5), os melhores rendimentos foram obtidos a 300 bar e 60 °C ($5,8 \pm 0,6$ %, m/m) e 200 bar e 60 °C ($5,6 \pm 0,5$ %, m/m).

Assim, com a finalidade de aumentar o rendimento da extração supercrítica e ampliar a quantidade de compostos solubilizados pela mistura solvente/cossolvente, considerou-se o emprego de um solvente orgânico junto à ESC para obtenção do extrato de *C. sylvestris*. Como o CO₂ é um solvente de caráter apolar, a adição de um cossolvente com característica polar faz com que compostos polares, não extraídos inicialmente pelo CO₂ puro, possam ser solubilizados pela mistura deste com o cossolvente.

Baseado nos melhores resultados de rendimento das extrações à baixa pressão (Tabela 5.4), os solventes etanol e acetato de etila, apresentaram os melhores resultados, sendo estes selecionados para serem empregados como cossolventes ao CO₂ na ESC devido a não toxicidade destes, uso comum na indústria de alimentos e farmacêutica, a facilidade de evaporação do extrato, sendo também relatada na literatura sua utilização na tecnologia supercrítica (CASAS et al., 2007; SALGIN, 2007; MEZZOMO et al., 2010; MICHIELIN, 2009). Utilizou-se etanol e acetato de etila como cossolventes ao CO₂, em concentrações de 2 % - 11 % e 2 % - 8 %, respectivamente, em relação à massa de CO₂ empregada, na condição de 200 bar, 50 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min, por ser essa uma condição de extração supercrítica intermediária entre as avaliadas neste trabalho. A influência da utilização do etanol e do acetato de etila como cossolventes no rendimento da ESC pode ser observada na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para ESC de *C. sylvestris* em função de diferentes concentrações de etanol e acetato de etila como cossolventes na condição de 200 bar, 50°C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca).

T (°C)	P (bar)	Cossolvente (%) ⁽¹⁾	X ₀ (%) ⁽²⁾
Etanol			
50	200	0	4,11 ^c ± 0,06
50	200	2	7,9 ^a ± 0,3
50	200	5	6,4 ^b ± 0,7
50	200	8	8,2 ^a ± 0,1
50	200	11	7,3 ^{ab} ± 0,3
Acetato de etila			
50	200	0	4,11 ^A ± 0,06
50	200	2	4,6 ^A ± 0,3
50	200	5	4,16 ^A ± 0,01
50	200	8	4,5 ^A ± 0,3

⁽¹⁾ Cossolventes utilizados: etanol e acetato de etila.

⁽²⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A partir dos dados da Tabela 5.8, as ESC de extrato de *C. sylvestris* a 200 bar e 50 °C tiveram seus rendimentos aumentados para todas as concentrações de etanol e de acetato de etila testadas. Para o etanol, o rendimento foi aumentado de $4,11 \pm 0,06$ % (m/m) para $8,2 \pm 0,1$ % (m/m), quando foi utilizado 0% e 8 % de etanol como cossolvente, respectivamente. Este comportamento deve-se à maior solubilização de compostos polares pela mistura etanol/CO₂, não ocorrendo quando se utiliza CO₂ puro, reduzindo a seletividade e aumentando o rendimento. De acordo com a Tabela 5.8, percebe-se uma variação nos valores de X_0 com adição de diferentes concentrações de etanol, sendo melhor visualizada na Figura 5.3.

Pelos resultados do Teste de *Tukey*, apresentados na Tabela 5.8, os rendimentos obtidos com a utilização de 2 %, 8 % e 11 % de etanol não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5 % de significância, nos valores de X_0 . Porém, apresentaram rendimentos

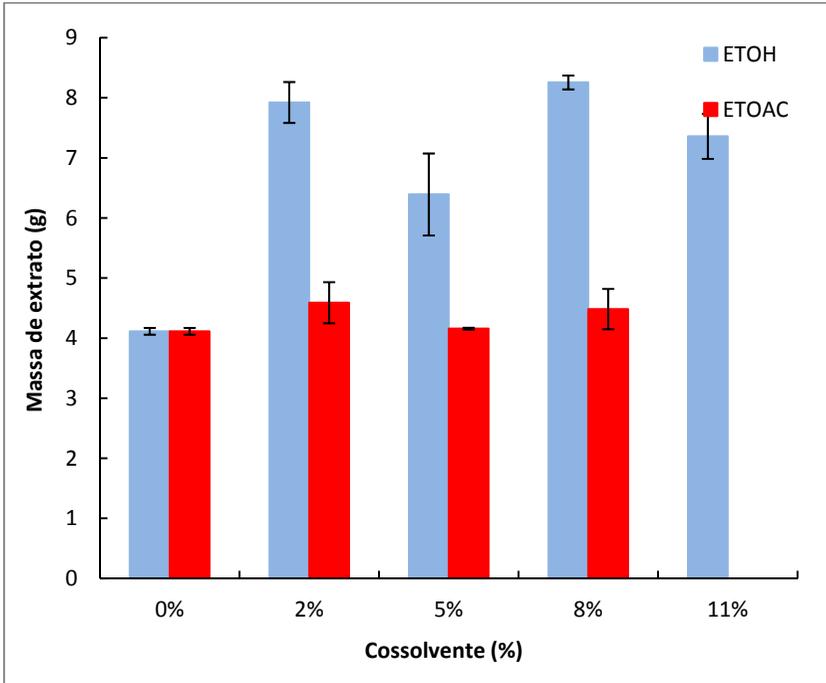
estatisticamente diferentes do rendimento obtido sem a utilização de cossolvente. Em contrapartida, a utilização de 5 % de etanol apresentou rendimentos estatisticamente menor, $6,4 \pm 0,7$ % (m/m), do que as condições de 2 % e 8%, mas ainda assim, significativamente maior do que a condição sem o uso de modificador. Isto se deve ao maior número de compostos solúveis na mistura, reduzindo a seletividade, modificando as características da mistura de solvente e aumentando o rendimento (CAMPOS et al, 2008).

A concentração de cossolvente afeta o rendimento do processo supercrítico, possivelmente baseado em dois fatores principais: (1) o aumento da concentração de etanol, que pode induzir a saturação do CO₂ com etanol e consequente formação de duas fases, para condições específicas de temperatura e pressão do sistema; e (2) o efeito do etanol, ou seja, formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de etanol (entre o hidrogênio de uma molécula de etanol e o oxigênio de outra), bem como somente entre os compostos polares do soluto. Para que ocorra a solubilização do soluto as ligações de hidrogênio devem ser formadas entre o etanol (solvente) e o soluto. Contudo, quando o etanol está em altas concentrações na mistura, não há energia suficiente para quebrar as ligações entre as moléculas de etanol, causando a indisponibilidade de moléculas de etanol e, assim, menos moléculas de soluto serão solubilizadas, reduzindo a extração e o rendimento do processo (MORRISON; BOYD, 1996).

Avaliando os resultados da Tabela 5.8 para o acetato de etila como cossolvente, pelos Teste de *Tukey* os rendimentos obtidos com a utilização de 2 %, 5 % e 8 % de acetato de etila não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5 % de significância, e nem do rendimento obtido sem a utilização de cossolvente. Estes resultados evidenciam que a adição de acetato de etila à extração supercrítica de *C. sylvestris*, na condição de 200 bar, 50 °C e e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min, não afeta o rendimento, independente da quantidade de cossolvente adicionada. O efeito da concentração de cossolvente no rendimento de extração é melhor observado na Figura 5.3, para as concentrações de 0 %, 2 %, 5 %, 8 % e 11 % (m/m) de etanol e 0 %, 2

%, 5 % e 8 % (m/m) de acetato de etila, obtidos na condição de extração a 200 bar, 50 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min.

Figura 5.3 - Efeito da concentração do cossolvente etanol e acetato de etila no rendimento da ESC de extrato de *C. sylvestris* a 200 bar, 50 °C e e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min.



Maiores quantidades de cossolvente favorecem as interações soluto/cossolvente, aumentando o rendimento (HOLLENDER et al., 1997). Geralmente, o tipo de cossolvente tem maior impacto na eficiência da extração do que sua concentração, devido ao tipo de interação matriz-compostos e aos parâmetros físico-químicos do cossolvente. A maioria deles alcança melhores resultados em altas concentrações, enquanto outros reagem ao contrário (LUTERMANN et al., 1998).

Além dos experimentos com etanol e acetato de etila como cossolventes na condição de 200 bar, 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3,5 horas de extração, para avaliar a influência no rendimento da ESC provocada pela adição de diferentes quantidades de modificadores, foram realizadas extrações utilizando etanol como cossolvente, nas concentrações de 2, 5 e 8 % (m/m), na condição de 300 bar, 40 °C e 50 °C, vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min e 3,5 horas de extração, visando comparar a atividade biológica dos extratos em outra condição de temperatura e pressão. Estes resultados são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para ESC de *C. sylvestris* em função de diferentes concentrações de etanol como cossolvente na condição de 300 bar, temperaturas de 40 °C e 50 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min (em base seca).

T (°C)	P (bar)	Cossolvente (%) ⁽¹⁾	X ₀ (%) ⁽²⁾
40	300	0	4,11 ^f ± 0,07
40	300	2	6,6 ^{cd} ± 0,3
40	300	5	6,0 ^{de} ± 0,2
40	300	8	7,3 ^{bcd} ± 0,8
50	300	0	4,9 ^{ef} ± 0,3
50	300	2	11,1 ^a ± 0,2
50	300	5	8,3 ^b ± 0,1
50	300	8	8,0 ^{bc} ± 0,3

⁽¹⁾ Cossolvente utilizado: etanol.

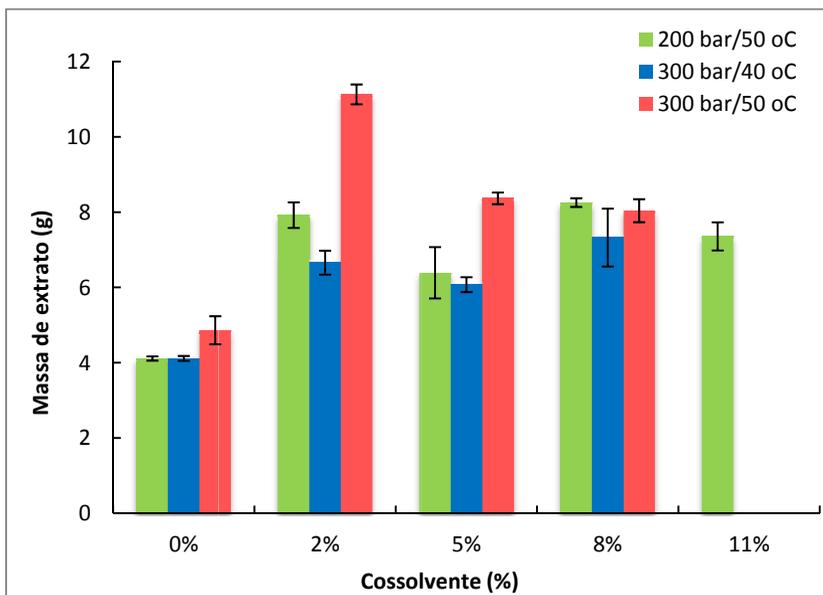
⁽²⁾ Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Avaliando os resultados da Tabela 5.9 para o etanol como cossolvente, considerando a temperatura de extração e a quantidade de etanol adicionada, o valor de X_0 foi aumentado para todas as quantidades de etanol utilizadas. O maior rendimento obtido foi na condição de 300 bar, 50 °C e adição de 2 % de etanol (11,1 ± 0,2 %, m/m), seguido da condição de 300 bar, 50 °C e adição de 5 % de etanol (8,3 ± 0,1 %, m/m). De acordo com os resultados do Teste de Tukey (Tabela 5.9), estas duas condições de extração apresentaram

rendimentos estatisticamente diferentes entre si e entre os demais, ao nível de 5 % de significância. As outras condições testadas, também apresentaram aumento no rendimento de extração da *C. sylvestris*, quando comparada às extrações isentas de modificador.

A Figura 5.4 apresenta um comparativo do efeito da adição de etanol no rendimento da ESC de extrato de *C. sylvestris* para as diferentes condições testadas. Na Figura 5.4 observa-se que a adição de etanol aumentou o rendimento para todas as condições de temperatura e pressão testadas. O maior aumento de rendimento ocorreu na condição de 300 bar e 50 °C, adicionada de 2 % de etanol, seguido da condição a 300 bar e 50 °C, adicionada de 5 % e 8 % de etanol.

Figura 5.4 - Comparativo do efeito da concentração do cossolvente etanol no rendimento da ESC de extrato de *C. sylvestris* a 200 bar e 50 °C, 300 bar e 40 °C e 300 bar e 50 °C, onde todas as condições foram realizadas com vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min.



CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE II: Determinação experimental do equilíbrio de fases de extratos de *Casearia sylvestris* e obtenção de extratos encapsulados pelo método SAS

6.1. Determinação experimental do equilíbrio de fases de extratos de *C. sylvestris*

Os dados de equilíbrio de fases obtidos para o sistema multicomponente (*C*) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, também chamado de sistema pseudoternário, estão apresentados na Tabela 6.1 para a faixa de temperatura de 35 °C a 75 °C e fração mássica de CO₂ (*w*) de 60 % a 95 %.

A Tabela 6.1 apresenta os resultados de equilíbrio de fases realizados, de acordo com o procedimento descrito em 4.9, e apresentados em termos de pressão de transição associados aos erros experimentais para cada condição, representado pelo desvio padrão (σ). O diagrama pressão-composição (*P-w*) para os resultados da Tabela 6.1 são apresentados na Figura 6.1.

Tabela 6.1 - Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂.

T (°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de Transição	T (°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de Transição
<i>w</i> _{CO₂} =0,60				<i>w</i> _{CO₂} =0,85			
35	62,8	0	ESLV-PB	35	67,3	0,2	ESLV-PB
45	75,7 5	0,07	ESLV-PB	45	82,5	0,3	ESLV-PB
55	88,1	0,1	ELV-PB	55	97,9	0,3	ELV-PB
65	100,8	0,2	ELV-PB	65	112,4	0,7	ELV-PB
75	113, 0	0,4	ELV-PB	75	125,6	0,2	ELV-PB

$w_{CO_2}=0,65$				$w_{CO_2}=0,875$			
35	64,2	0,1	ESLV-PB	35	77	2	ESLL
					68,7	0,4	ESLLV
45	77,4	0,07	ESLV-PB	45	99	0,6	ESLL
	5				82,6	0,2	ESLLV
55	90,7	0,4	ELV-PB	55	117	2	ELL
					96,6	0,5	ELLV
65	104,	0,2	ELV-PB	65	130	6	ELL
	8				109,2	0,9	ELLV
75	118,3	0,3	ELV-PB	75	134	3	ELL
					127	8	ELLV
$w_{CO_2}=0,70$				$w_{CO_2}=0,90$			
35	66	1	ESLV-PB	35	79	6	ESLL
					68,7	0,8	ESLLV
45	80,6	0,4	ESLV-PB	45	99,9	2	ESLL
					83,6	0,4	ESLLV
55	94,9	0	ELV-PB	55	119	3	ELL
					97	1	ELLV
65	109,2	0,3	ELV-PB	65	152,0	0,4	ELL
					111	2	ELLV
75	122	0,2	ELV-PB	75	140,1	0,1	ELL
					125	2	ELLV
$w_{CO_2}=0,75$				$w_{CO_2}=0,925$			
35	66,4	0,4	ESLV-PB	35	80,9	5	ESLL
					68,95	0,07	ESLLV
45	81,3	0,6	ESLV-PB	45	101,2	0,1	ESLL
					84	1	ESLLV
55	96,3	0,2	ELV-PB	55	123,8	0,4	LLE
					99,8	0,4	ELLV
65	110,	0,3	ELV-PB	65	141	2	ELL
	6				114,5	0,8	ELLV
75	123,	0,2	ELV-PB	75	150	2	ELL
	0				132,3	0,4	ELLV
$w_{CO_2}=0,80$				$w_{CO_2}=0,95$			
35	67	1	ESLV-PB	35	89,3	9	ELL
					72	3	ELLV

45	82,2	0,2	ESLV-PB	45	109 87	10 4	ELL ELLV
55	95,6	0,2	ELV-PB	55	116,6 104	0,5 2	ELL ELLV
65	109,4	0,4	ELV-PB	65	139 120	9 2	ELL ELLV
75	121,6 5	0,07	ELV-PB	75	142 131,7	5 5	ELL ELLV

T: Temperatura (°C); P: Pressão (bar); σ : Desvio padrão (bar); ELV: Equilíbrio líquido-vapor; ELL: Equilíbrio líquido-líquido; ELLV: Equilíbrio líquido-líquido-vapor; ESLV: Equilíbrio sólido-líquido-vapor; ESLL: Equilíbrio sólido-líquido-líquido; ESLLV: Equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor; PB: Ponto de bolha; w_{CO_2} : Fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

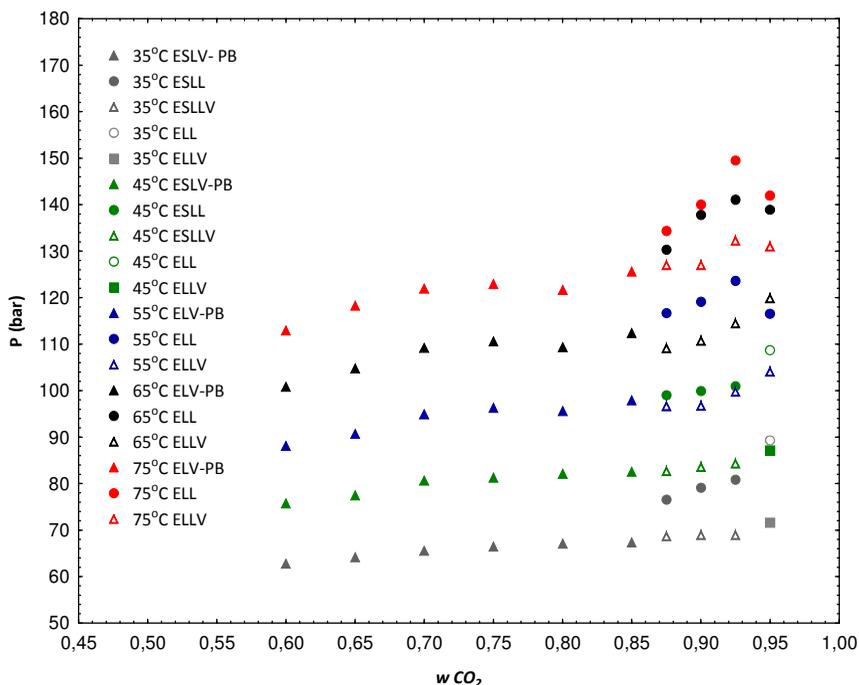
Como pode ser observado na Tabela 6.1 e no diagrama *P-w* (Figura 6.1), as medidas experimentais revelaram um comportamento de fases complexo para o sistema multicomponente formado pelo extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, ocorrendo os seguintes comportamentos de equilíbrio: líquido-vapor (ELV), líquido-líquido (ELL), líquido-líquido-vapor (ELLV), sólido-líquido-vapor (ESLV), sólido-líquido-líquido (ESLL) e sólido-líquido-líquido-vapor (ESLLV).

Para frações mássicas de CO₂ de 60 % a 80 % também podem ser observados, de acordo com a Tabela 6.1 e a Figura 6.1, pontos de bolha nas transições sólido-líquido-vapor e líquido-vapor. Na área acima das isotermas foi detectada uma única fase, enquanto que uma fase de equilíbrio líquido-vapor aparecer na região abaixo das isotermas. Para frações mássicas de CO₂ entre 87,5 % e 95 %, os comportamentos de fases detectados foram transições líquido-líquido, líquido-líquido-vapor, sólido-líquido-líquido e sólido-líquido-líquido-vapor.

Adicionalmente, para frações de CO₂ entre 60 % e 92,5 %, partículas sólidas foram observadas na fase líquida para temperaturas de 35 °C e 45 °C. Para esta faixa de fração mássica de CO₂, todas as transições ocorreram com a presença de partículas sólidas do extrato de *C. sylvestris*, possivelmente devido a baixa temperatura e à proximidade da saturação da solução orgânica. Para conteúdos de CO₂ maiores que

92,5 % não foi possível detectar visualmente a presença de partículas sólidas na fase líquida possivelmente devido a pequena quantidade de extrato na presença de grande quantidade de CO₂, o que dilui o extrato e a precipitação não ocorre. A presença da fase sólida ocorre para misturas assimétricas onde a solubilidade do componente leve é limitada na fase líquida do componente não volátil, resultando em pequenos pontos relativos de congelamento em altas pressões (McHUGH; PAULAITIS, 1980).

Figura 6.1 - Dados *P-w* de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C.



P: Pressão (bar); ELV: equilíbrio líquido-vapor; ELL: equilíbrio líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; ESLV: equilíbrio sólido-líquido-vapor; ESLL: equilíbrio sólido-líquido-líquido; ESLLV: equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor; PB: ponto de bolha; w_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

Considerando que o ponto crítico final superior (UCEP - *Upper Critical End Point*) representa o ponto crítico da mistura na presença de excesso de sólido (McHUGH; PAULAITIS, 1980), os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a temperatura UCEP encontra-se próxima a 45 °C. Ainda, neste trabalho, a solubilidade do sólido no sistema estudado parece ser mais dependente da temperatura do que da pressão.

De acordo com Shariati e Peters (2002) e De Gioannis, Gonzalez e Subra (2004), a existência de uma fase sólida é devido à presença do antissolvente (CO₂) que reduz a solubilidade do soluto na mistura. Franceschi et al. (2008b) estudaram o comportamento dos sistemas CO₂ + diclorometano + β-caroteno e CO₂ + diclorometano + PHBV e observaram que, em baixas concentrações, o CO₂ age como cossolvente, enquanto em altas concentrações, o CO₂ atua como antissolvente. A concentração limitante do CO₂ para que este atue como antissolvente depende da concentração do extrato e do polímero na solução orgânica. Dessa forma, soluções diluídas normalmente necessitam de grandes quantidades de CO₂ para induzir a formação da fase sólida, enquanto soluções concentradas necessitam de pequenas quantidades de CO₂ para induzir a formação de sólidos, devido à saturação da solução (FRANCESCHI et al., 2008b).

Para conteúdos de CO₂ acima de 95 % em massa, para todas as temperaturas testadas, o sistema estudado modificou sua aparência de transparente para turvo, sem ocorrer separação de fases para todas as pressões testadas. Este comportamento é semelhante ao comportamento de fases característico do *tipo V*, representado por misturas binárias contendo alcoóis. Também, para frações mássicas de CO₂ superiores a 95 %, foi difícil detectar experimentalmente de forma visual os pontos de transição de ELL, ESSL, ELLV e ESSLV devido ao pequeno intervalo de pressão e de fração molar dos componentes envolvidos, bem como a possível proximidade do ponto crítico da mistura (PRAUSNITZ; LICHTENTHALER; AZEVEDO, 1999).

O sistema estudado apresentou região de imiscibilidade líquido-líquido (LL) e de sólido-líquido-líquido (SLL) para todas as temperaturas testadas, para conteúdos de CO₂ maiores que 87,5 %, como

apresentado na Figura 6.1. Este tipo de comportamento de transição é comumente observado em sistemas contendo CO₂ com alta assimetria molecular entre os componentes (REID; PRAUSNITZ; POLING, 1987), o que parece ser o caso do sistema estudado. Diferenças entre a natureza química dos constituintes do sistema (CO₂ e compostos do extrato) podem causar o complexo comportamento de fases (ELL, ELLV, ESSL e ESSLV) detectado experimentalmente. A complexidade do comportamento de fases pode aumentar com o aumento no número de compostos presentes na mistura a ser testada, especialmente quando extratos naturais são testados no lugar de componente puros, como o estudado neste trabalho (sistema multicomponente).

Além do sistema (C) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, foram estudados o comportamento de fases dos sistemas (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ (descritos no item 4.9), visando o processo de precipitação pela metodologia SAS. Os dados de equilíbrio de fases obtidos para os dois sistemas estão apresentados na Tabela 6.2 para a faixa de temperatura de 35 °C a 75 °C e fração mássica de CO₂ (*w*) de 90 % a 95 %. A Tabela 6.2 apresenta os resultados de equilíbrio em termos de pressão de transição associados aos erros experimentais para cada condição, representado pelo desvio padrão (σ). O diagrama *P-w* para os resultados da Tabela 6.2 são apresentados na Figura 6.2.

Tabela 6.2 - Dados experimentais de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + solvente (etanol ou acetato de etila) + Pluronic F127 + CO₂.

Extrato <i>C. sylvestris</i> + ETOH + Pluronic F127 + CO ₂				Extrato <i>C. sylvestris</i> + ETOAC + Pluronic F127 + CO ₂			
T (°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de Transição	T (°C)	P (bar)	σ (bar)	Tipo de Transição
<i>w</i> _{CO₂} =0,90				<i>w</i> _{CO₂} =0,90			
35	69,2	0,2	ELLV	35	62	1	ELLV
45	85	2	ELLV	45	81,15	0,07	ELLV
55	100,1	0,6	ELLV	55	92	2	ELLV

65	111,2	0,5	ELLV	65	99	4	ELLV
75	120,25	0,07	ELLV	75	110	1	ELLV
$w_{CO_2}=0,925$				$w_{CO_2}=0,925$			
35	66	1	ELLV	35	70,2	0,4	ELLV
45	86,05	0,07	ELLV	45	82,8	0,6	ELLV
55	104,6	0,5	ELLV	55	90,55	0,07	ELLV
65	110,05	0,07	ELLV	65	95,35	0,07	ELLV
75	117,8	0,2	ELLV	75	102	2	ELLV
$w_{CO_2}=0,95$				$w_{CO_2}=0,95$			
35	62,9	0,5	ELLV	35	69,0	0,2	ELLV
45	84,9	0,3	ELLV	45	82,95	0,07	ELLV
55	96,4	0,2	ELLV	55	88,2	0,4	ELLV
65	105,2	0,4	ELLV	65	102,0	0,4	ELLV
75	116	2	ELLV	75	109,8	0,8	ELLV

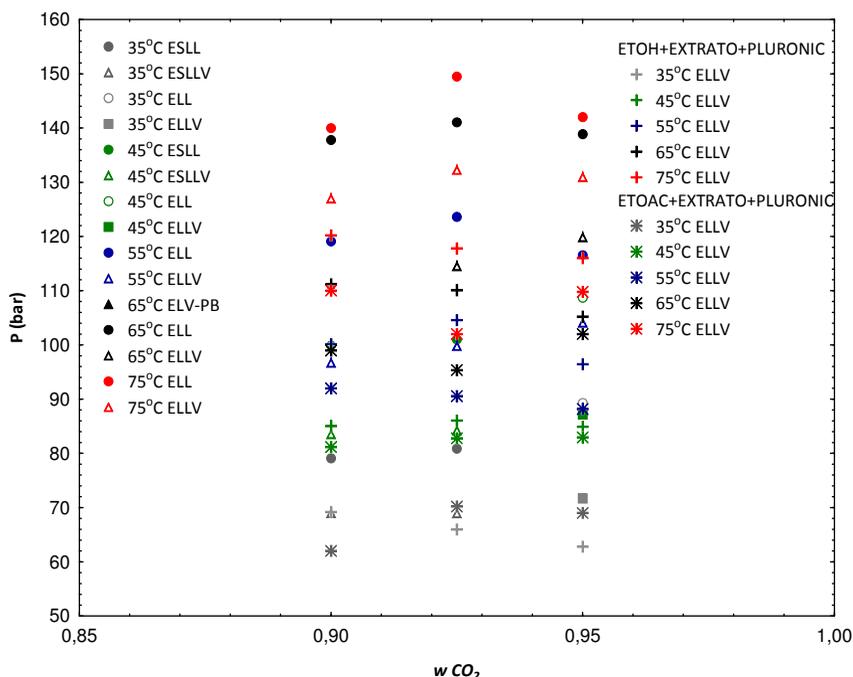
T: Temperatura (°C); P: Pressão (bar); σ : Desvio padrão (bar); ELLV: Equilíbrio líquido-líquido-vapor; w_{CO_2} : Fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

Como pode ser visualizado na Tabela 6.2 e no diagrama $P-w$ (Figura 6.2), as medidas experimentais revelaram um comportamento de fases complexo para os sistemas multicomponente (A) e (B), ocorrendo o comportamento de equilíbrio líquido-líquido-vapor (ELLV) para os dois sistemas, em todas as temperaturas e frações mássicas de CO₂ estudadas.

De acordo com a Tabela 6.2 e a Figura 6.2 todas as transições ELLV que ocorreram para os sistemas (A) e (B) foram observadas em pressões acima daquelas relatadas para o sistema (C) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, não ocorrendo a visualização de duas transições de fases na mesma temperatura e fração mássica de CO₂, como apresentado na Tabela 6.1 e Figura 6.1. Com isso, pode-se dizer que no presente estudo a adição de um soluto ao sistema, no caso o polímero Pluronic F127, influencia no comportamento de fases do sistema, elevando as pressões de transição ou, até mesmo, modificando o diagrama de fases. Transições do tipo líquido-líquido (ELL), sólido-líquido-líquido-vapor (ESLLV) e sólido-líquido-vapor (ESLV) não

foram observadas para as frações mássicas de CO₂ de 90 % a 95 % para os sistemas (A) e (B). Para as frações de CO₂ avaliadas para os sistemas (A) e (B) também não foram observadas partículas sólidas na fase líquida nas temperaturas de 35 °C e 45 °C, possivelmente devido a pequena quantidade de extrato em grande quantidade de CO₂ e à adição de Pluronic F127.

Figura 6.2 - Dados *P-w* de equilíbrio de fases para os sistemas multicomponentes formados por (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂; (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ e (C) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C e frações mássicas de CO₂ de 0,90 a 0,95.



P: Pressão (bar); ELL: equilíbrio líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; ESLV: equilíbrio sólido-líquido-vapor; ESLL: equilíbrio sólido-líquido-líquido; ESLLV: equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor; PB: ponto de bolha; w_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO₂).

Embora o ELLV tenha sido detectado nos sistemas (A) e (B), não foi observada a transição ELL, como encontrado no sistema (C) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂. Isso pode indicar que o diagrama de fases foi alterado pela adição do polímero, fazendo com que o ELL não seja detectado, sendo difícil afirmar se o ELL está ou não presente no sistema, devido a restrições de pressão de operação do equipamento e, conseqüentemente, se os pontos de operação do ensaio de precipitação (item 6.2) estão em uma região de duas fases.

No estudo de Franceschi (2009), a adição de β -caroteno aos sistemas binários formados por CO₂ + etanol e CO₂ + acetato de etila não modificou a região de transição líquido-vapor dos sistemas estudados, assim como a adição de PHBV ao sistema binário CO₂ + diclorometano, ou seja, a similaridade entre os diagramas de fases binários e ternários foi mantida.

De acordo com Reverchon, De Marco e Torino (2007), a presença de um soluto deve ser considerada no sistema, pois este pode modificar o equilíbrio líquido-vapor de sistemas binários solvente + CO₂. Como regra geral, o soluto modifica o ponto crítico da mistura do sistema ternário para pressões mais elevadas, quando comparado ao sistema binário correspondente, alterando o diagrama de fases.

Em sistemas ternários formados por solvente + soluto + antissolvente, todos os componentes devem ser considerados. Contudo, o processo SAS baseia-se no fato de que o soluto é praticamente insolúvel na mistura solvente + antissolvente. Se esta hipótese é verificada, a presença do soluto pode ser desprezada e o sistema de fase fluida formado no precipitador pode ser tratado como um sistema binário. Portanto, as considerações sobre a posição do ponto de operação do processo podem ser realizadas de acordo com as isotermas do diagrama $P-w$ e os processos SAS serão operados em pressões acima do ponto crítico da mistura binária. Caso a presença do soluto na fase fluida formada no precipitador não possa ser desprezada (ou seja, quando o soluto é praticamente insolúvel no fluido supercrítico, mas possui considerável solubilidade na mistura antissolvente + solvente) o equilíbrio de fases pode ser diferente em relação ao sistema binário

correspondente. Por exemplo, na mesma pressão, o ponto de operação do diagrama ternário pode estar localizado em condições subcríticas ou dentro da região de duas fases (REVERCHON et al., 2010).

6.2. Precipitação e encapsulamento de extratos de *C. sylvestris*

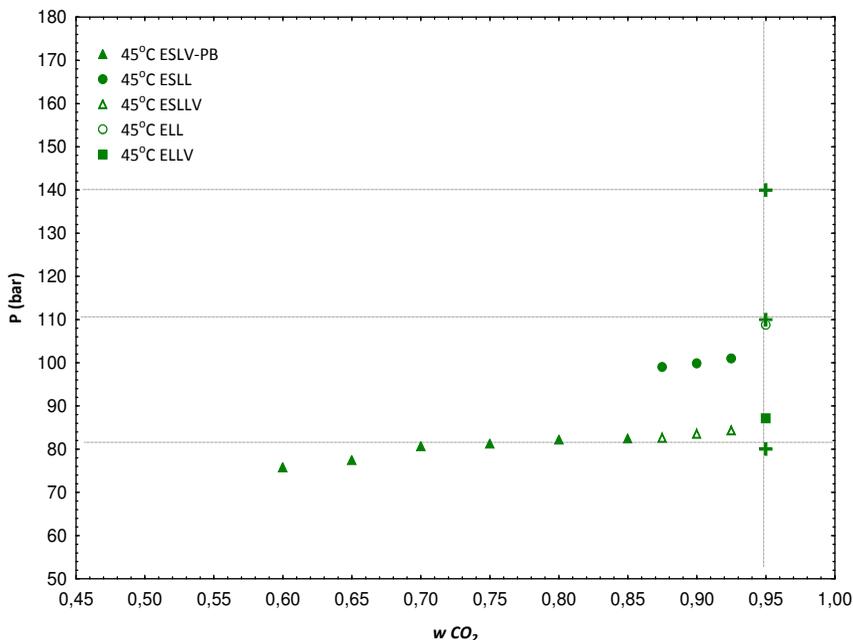
O processo de precipitação por SAS foi aplicado para a obtenção de partículas coprecipitadas (extrato bioativo encapsulado em Pluronic F127) nas condições apresentadas na Figura 6.3, correspondendo às pressões de 80, 110 e 140 bar relacionadas a pressões abaixo, próximo e acima do ponto crítico da mistura extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂, respectivamente, na temperatura de 45 °C.

A 110 e 140 bar o sistema apresenta miscibilidade completa entre o solvente orgânico (etanol) e o CO₂, indicando que estas condições podem ser empregadas para a produção de micropartículas. Por outro lado, a pressão de 80 bar não é recomendada para a precipitação devido a possível formação de filmes e partículas aglomeradas, uma vez que o sistema encontra-se na região de duas fases (MIGUEL et al., 2006).

Métodos de coprecipitação a altas pressões, como a técnica SAS, apresentam um grande número de variáveis experimentais, como a concentração inicial do núcleo (extrato bioativo) e da cobertura (polímero) e da afinidade entre eles, que podem ser controladas e/ou ajustadas quando comparadas aos métodos tradicionais. Contudo, o número de variáveis controláveis que afetam a morfologia e o tamanho das partículas possibilita aumentar a eficiência de *loading* do encapsulamento (quantidade de extrato nas partículas coprecipitadas) (COCERO et al., 2009; YEO; KIRAN, 2005). Se existir afinidade entre o composto bioativo e o material de cobertura haverá o encapsulamento, caso contrário os componentes precipitarão separadamente (FALK et al., 1997).

Como apresentado na Figura 6.3, o comportamento do equilíbrio de fases a 45 °C para o sistema extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ permite a identificação de regiões de fases relacionadas às

Figura 6.3 - Dados P - w de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO_2 para temperaturas de 35 °C a 75 °C e pontos experimentais de precipitação a 45 °C para o sistema extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO_2 .



P : Pressão (bar); ESLV: equilíbrio sólido-líquido-vapor; ESLL: equilíbrio sólido-líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; ELL: equilíbrio líquido-líquido; ESLLV: equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor; PB: ponto de bolha; w_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO_2); (+): pressões de precipitação realizados a 45 °C para o sistema extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO_2 (80, 110 e 140 bar).

condições de pressão selecionadas para os experimentos de precipitação (80, 110 e 140 bar). Os ensaios foram realizados em uma região homogênea (110 e 140 bar), onde os componentes são completamente miscíveis, e em uma região de duas fases (80 bar). A fração mássica de CO_2 de 95 % (m/m) foi definida como condição de precipitação adequada para promover intensa mistura entre a solução orgânica e o antissolvente dentro do precipitador. Um alto fluxo de solvente promove uma redução no tamanho médio das partículas e na sua distribuição de

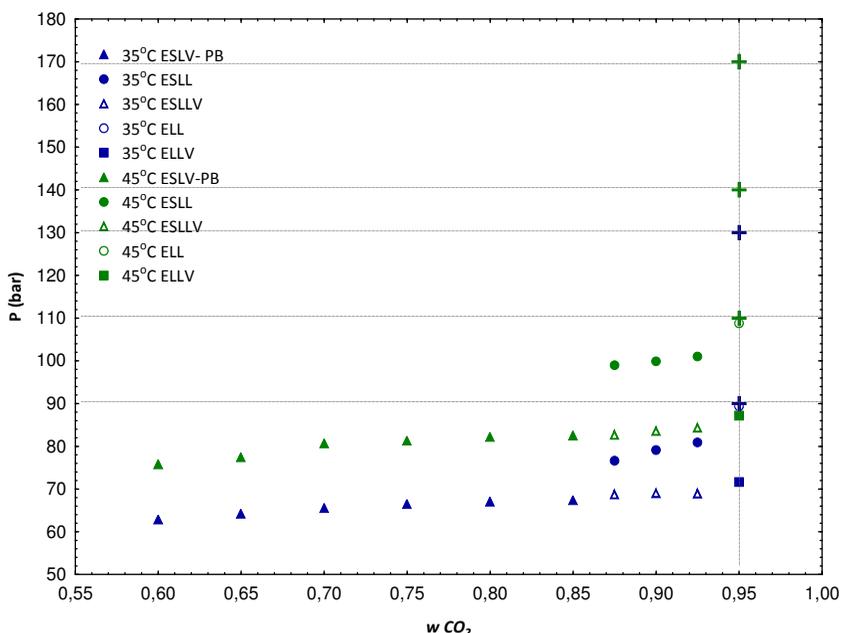
tamanho, enquanto que um elevado fluxo de solução orgânica gera um aumento no tamanho de partícula (FRANCESCHI et al., 2009).

Silva et al. (2008a) apresentaram como composição química do extrato de *C. sylvestris*, obtido por hidrodestilação, 20,8 % de β -acoradieno, 18,1 % de β -cariofileno, 15,9 % de espatulenol, 5,2 % de germacreno B, 4,7 % de α -humuleno, 3,9 % de germacreno D entre outros componentes minoritários. Alguns desses importantes componentes foram estudados por Michielin et al. (2009), para a determinação de dados de equilíbrio de fases para os sistemas α -humuleno + CO₂ and β -cariofileno + CO₂. De forma a correlacionar os dados de equilíbrio de fases da literatura, obtidos por Michielin et al. (2009), com as condições de precipitação estudadas nesse trabalho, os dados de composição do extrato de *C. sylvestris* obtido por Silva et al. (2008a) foi utilizado como aproximação da composição dos extratos obtidos com fluido supercrítico. A fração molar de cada componente de interesse, α -humuleno e β -cariofileno, foi calculada em relação ao CO₂ (α -humuleno + CO₂ e β -cariofileno + CO₂) em base livre de etanol e outros componentes presentes no extrato. Considerando as frações calculadas, os dados de equilíbrio de fases apresentados por Michielin et al. (2009) mostram que ambos os sistemas estão em uma região de fase única a 140 bar, enquanto a 80 bar o sistema apresenta um comportamento líquido-vapor. No entanto, a 110 bar ambos os sistemas parecem estar situados na região de transição entre uma fase e duas fases. Devido à alta solubilidade alcançada em altas pressões, podem ser obtidos menores valores de *loading* a 140 bar quando comparados a 80 bar e 110 bar, isto é, parte dos componentes do extrato, que são solúveis em CO₂, podem ser arrastados pela mistura solvente/antissolvente e, portanto, menores valores de *loading* poderão ser obtidos em ensaios de precipitação em altas pressões.

O processo de precipitação por SAS também foi aplicado para a obtenção de partículas coprecipitadas (extrato bioativo micronizado encapsulado em Pluronic F127) nas condições apresentadas na Figura 6.4, para os sistemas (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ (descritos no item 4.10). As pressões aplicadas foram 90,

130 e 170 bar, para a temperatura de 35 °C, e pressões de 110, 140 e 170 bar, para a temperatura de 45 °C, correspondendo a valores de pressão acima do ponto crítico das misturas (A) e (B), para cada temperatura citada.

Figura 6.4 - Dados P - w de equilíbrio de fases para o sistema multicomponente formado por extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ para temperaturas de 35 °C a 75 °C e pontos experimentais de precipitação a 35 °C e 45 °C para os sistemas extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂.



P: Pressão (bar); ELV: equilíbrio líquido-vapor; ELL: equilíbrio líquido-líquido; ELLV: equilíbrio líquido-líquido-vapor; ESLV: equilíbrio sólido-líquido-vapor; ESLL: equilíbrio sólido-líquido-líquido; ESLLV: equilíbrio sólido-líquido-líquido-vapor; PB: ponto de bolha; w_{CO_2} : fração mássica de dióxido de carbono (CO₂); (+): pressões de precipitação realizadas a 35 °C para os sistemas extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ (90, 130 e 170 bar); (+): pressões de precipitação realizadas a 45 °C para os sistemas extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ (110, 140 e 170 bar).

Nas pressões utilizadas nos experimentos de precipitação dos sistemas (A) e (B), os sistemas parecem apresentar miscibilidade completa entre o solvente orgânico (etanol ou acetato de etila) e o CO₂, indicando que essas condições podem ser empregadas para a produção de micropartículas. Como apresentado na Figura 6.4, o comportamento do equilíbrio de fases a 35 °C e 45 °C para os sistemas (A) e (B) permite a identificação de regiões de fases relacionadas às condições de pressão selecionadas para os experimentos de precipitação. Os ensaios foram realizados em uma região homogênea, onde os componentes são completamente miscíveis. A fração mássica de CO₂ de 95 % (m/m) foi definida como condição de precipitação adequada para promover intensa mistura entre a solução orgânica e o antissolvente dentro do precipitador.

6.3. Caracterização das partículas obtidas pelo processo SAS

6.3.1. Morfologia e estimativa de tamanho das partículas

Os resultados de MEV das partículas precipitadas obtidas a 80, 110 e 140 bar e 45 °C e valores constantes de concentração da solução e fluxo de antissolvente estão apresentados na Figura 6.5. As micrografias da Figura 6.5 indicam que as partículas precipitadas podem ser consideradas como disformes e a estimativa do tamanho de partícula para todas as condições testadas apresentaram-se dentro da faixa micrométrica.

O efeito da pressão no aspecto das partículas também foi observado nos resultados de tamanho de partícula, isto é, partículas maiores ($311 \pm 71 \mu\text{m}$) foram obtidas na região de duas fases (80 bar) comparadas às partículas produzidas acima do ponto crítico de mistura, onde o aumento na pressão sugere um aumento no tamanho de partícula de $168 \pm 38 \mu\text{m}$ (110 bar) para $181 \pm 44 \mu\text{m}$ (140 bar). Acima do ponto crítico da mistura (próximo a 110 bar), o aumento da pressão, em temperatura constante, aumenta a densidade do CO₂, resultando em uma melhor dispersão da solução orgânica (extrato + polímero + solvente orgânico) no CO₂, reduzindo o tamanho da partícula formada devido

à rápida difusão do solvente para fora das partículas formadas (extrato + polímero + solução solvente), causando a precipitação do polímero e do extrato (PRIAMO et al., 2010). Estudos da literatura mostraram resultados semelhantes em relação ao efeito da pressão de precipitação na estimativa de tamanho e morfologia das partículas (FRANCESCHI et al., 2008b; MEZZOMO et al., 2012). Em relação à morfologia das partículas, todas as amostras obtidas nas diferentes condições de pressão (80, 110 e 140 bar) apresentaram-se disformes, assim como relatado por Mezzomo et al. (2012) na precipitação de carotenoides do resíduo de camarão em Pluronic F127, e o efeito da pressão sobre a morfologia não foi detectado para a faixa de pressão estudada. O mesmo comportamento foi relatado por Franceschi et al. (2008b) para as partículas de β -caroteno.

Nos métodos SAS, quando a precipitação ocorre abaixo do ponto crítico da mistura, em uma região de duas fases, as partículas precipitadas podem exibir maiores tamanhos de partícula quando comparadas às precipitações realizadas próximas ao ponto crítico da mistura (região de uma fase), o que promove alta solubilidade e, assim, partículas menores (REVERCHON et al., 2003; FRANCESCHI et al., 2008b). Acima do ponto crítico da mistura (região de uma fase), com o aumento da pressão o tamanho de partícula tende a aumentar até um valor máximo (MIGUEL et al., 2006; FRANCESCHI et al., 2008b) provavelmente devido à aglomeração de partículas na fase solvente. Um aumento na pressão causa o aumento da solubilidade (do CO₂ no solvente orgânico), o que promove a transferência de massa do CO₂ + solvente orgânico para fora das gotas de solução, geradas pelo jato de solução orgânica (extrato + polímero + solvente orgânico), levando a altas taxas de nucleação e menores partículas de extrato de *C. sylvestris* e polímero com estreita distribuição de tamanho.

A literatura acerca da técnica SAS relata que os polímeros apresentam limitada variedade de morfologia nos precipitados formados. Por exemplo, a morfologia do PLA, parece ser insensível às condições aplicadas no processo SAS, dentro da faixa de condições estudadas. Essa característica pode estar relacionada com o alto peso molecular dos

polímeros e às modificações que ocorrem nas propriedades das soluções devido à presença desses componentes. Além disso, os polímeros tendem a formar partículas agregadas devido à redução da temperatura de transição vítrea quando estão dissolvidos no CO₂ supercrítico (REVERCHON et al., 2010).

As micrografias apresentadas na Figura 6.6 mostram a morfologia e estimativas de tamanho de amostras de Pluronic F127 não precipitado, Figura 6.6(a) e (b), e precipitadas pelo processo SAS a 140 bar e 45 °C, utilizando etanol, Figura 6.6(c) e (d), e acetato de etila, Figura 6.6(e) e (f), como solventes orgânicos.

Observando a Figura 6.6(a) e (b), percebe-se que as partículas de Pluronic F127 não processadas apresentam morfologia esférica e superfície lisa, com estimativa de tamanho de partícula de $594 \pm 159 \mu\text{m}$. Quando esse polímero foi precipitado a 140 bar e 45 °C utilizando etanol como solvente, a Figura 6.6(c) e (d) mostra que a morfologia das partículas modificou-se para disforme e foi detectada uma redução na estimativa de tamanho das partículas para $535 \pm 147 \mu\text{m}$. Quando foi utilizado acetato de etila como solvente no processo de precipitação, na mesma condição citada, a Figura 6.6(e) e (f) mostra que a morfologia obtida continuou apresentando característica disforme, porém ocorreu uma estimativa do tamanho de partícula inferior ao obtido com etanol, apresentando o valor médio de $298 \pm 95 \mu\text{m}$. Ambas as condições de precipitação (com etanol ou acetato de etila) obtiveram partículas dentro da faixa micrométrica.

As Figuras 6.7 e 6.8 apresentam as micrografias e as estimativas de tamanho das partículas das amostras obtidas dos sistemas (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e (B) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂, respectivamente, ambas precipitadas pelo processo SAS nas pressões de 90, 130 e 170 bar a 35 °C e 110, 140 e 170 bar a 45 °C, com valores constantes de concentração de solução e fluxo de antissolvente. As micrografias indicam que as partículas precipitadas podem ser consideradas disformes e a estimativa de tamanho para as amostras produzidas em todas as condições testadas encontram-se dentro da faixa micrométrica.

Figura 6.6 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras de Pluronic F127: (a) e (b) Pluronic F127 não processado ($594 \pm 159 \mu\text{m}$); (c) e (d) Pluronic F127 precipitado pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) a 140 bar e 45°C usando etanol como solvente orgânico ($535 \pm 147 \mu\text{m}$); (e) e (f) Pluronic F127 precipitado pelo processo antissolvente supercrítico (SAS) a 140 bar e 45°C usando acetato de etila como solvente orgânico ($298 \pm 95 \mu\text{m}$).

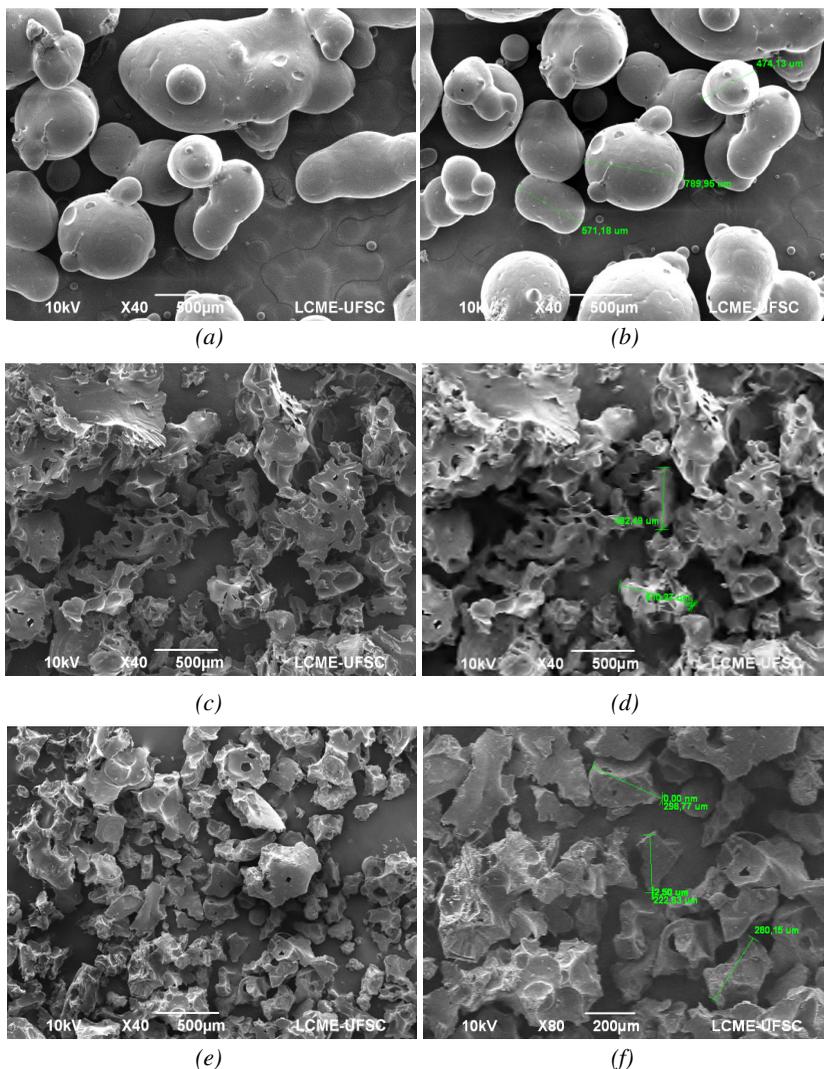


Figura 6.7 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras do sistema (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS): (a) 90 bar e 35 °C ($191 \pm 49 \mu\text{m}$); (b) 130 bar e 35 °C ($222 \pm 63 \mu\text{m}$); (c) 170 bar e 35 °C ($168 \pm 38 \mu\text{m}$); (d) 110 bar e 45 °C ($655 \pm 198 \mu\text{m}$); (e) 140 bar e 45 °C ($230 \pm 61 \mu\text{m}$); (f) 170 bar e 45 °C ($221 \pm 69 \mu\text{m}$).

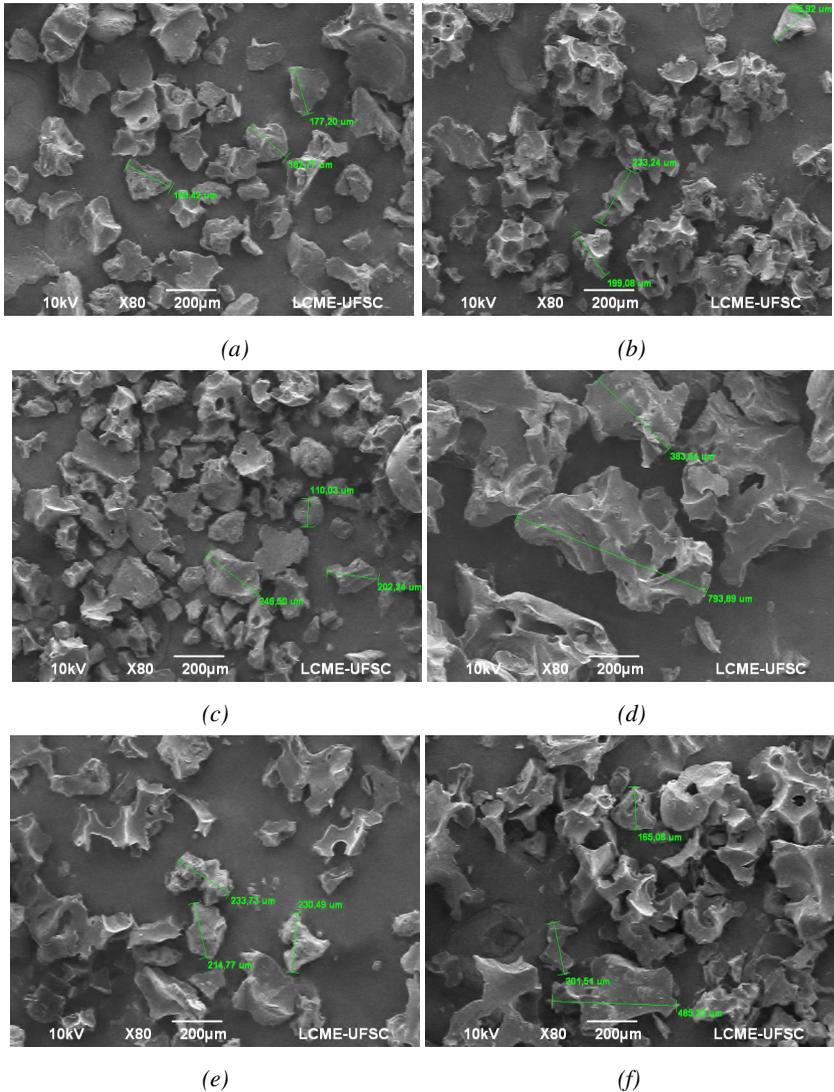
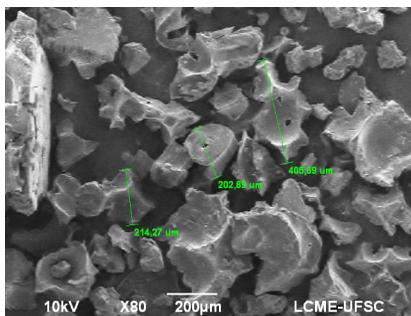
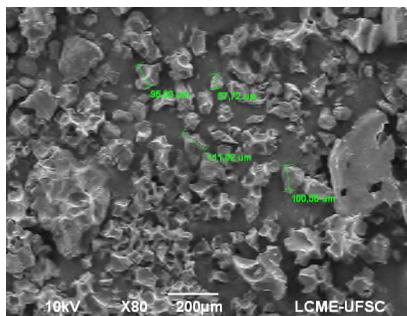


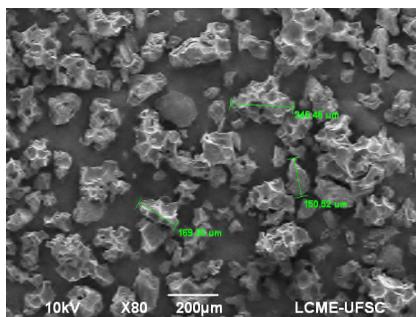
Figura 6.8 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e respectivas estimativas de tamanho das amostras do sistema (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo processo antissolvente supercrítico (SAS): (a) 90 bar e 35 °C ($274 \pm 114 \mu\text{m}$); (b) 130 bar e 35 °C ($102 \pm 8 \mu\text{m}$); (c) 170 bar e 35 °C ($158 \pm 36 \mu\text{m}$); (d) 110 bar e 45 °C ($600 \pm 102 \mu\text{m}$); (e) 140 bar e 45 °C ($600 \pm 171 \mu\text{m}$); (f) 170 bar e 45 °C ($346 \pm 108 \mu\text{m}$).



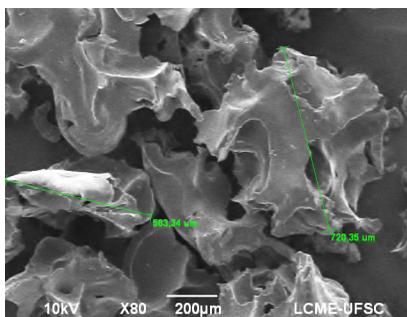
(a)



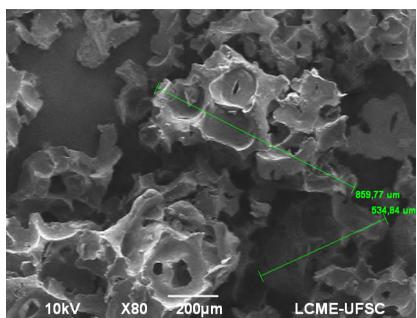
(b)



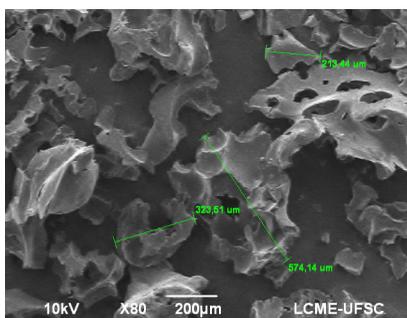
(c)



(d)



(e)



(f)

Considerando os resultados apresentados nas Figuras 6.7 e 6.8, o efeito da temperatura no aspecto das partículas é observado nas estimativas de tamanho, ou seja, partículas maiores foram obtidas na temperatura de 45 °C comparadas às produzidas na temperatura de 35 °C.

As partículas obtidas utilizando etanol como solvente orgânico (Figura 6.7) na temperatura de 35 °C não sofreram efeito da pressão na estimativa de tamanho, ao contrário do que ocorreu na temperatura de 45 °C, onde o aumento na pressão reduziu o tamanho estimado das partículas. Analisando o tamanho estimado das partículas utilizando acetato de etila como solvente orgânico, o efeito da pressão foi observado para a temperatura de 35 °C, onde o tamanho estimado das partículas foi reduzido com o aumento da pressão. Esse comportamento não foi observado para a temperatura de 45 °C, indicando que essa temperatura não é adequada para o processo de precipitação com acetato de etila devido à alta estimativa de tamanho das partículas produzidas.

Em relação à morfologia das partículas, apresentadas nas Figuras 6.7 e 6.8, todas as amostras obtidas em diferentes condições de temperatura e pressão e tipo de solvente orgânico utilizado (etanol ou acetato de etila) foram disformes. Além disso, não foi detectado efeito da pressão na morfologia das partículas obtidas, dentro da faixa de pressão estudada. O mesmo comportamento foi relatado por Franceschi et al. (2008b) na precipitação do β -caroteno e PHBV e a coprecipitação de ambos pelo processo SEDS utilizando CO₂ supercrítico.

Observando as micrografias das Figuras 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8, percebe-se que independente da condição SAS de temperatura e pressão aplicada, a morfologia da partícula contendo Pluronic F127 não é alterada. As partículas precipitadas apresentadas nas Figuras 6.5 a 6.8 podem ser consideradas como disformes e a estimativa do tamanho de partícula para todas as condições testadas apresentaram-se dentro da faixa micrométrica.

6.3.2. Caracterização por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

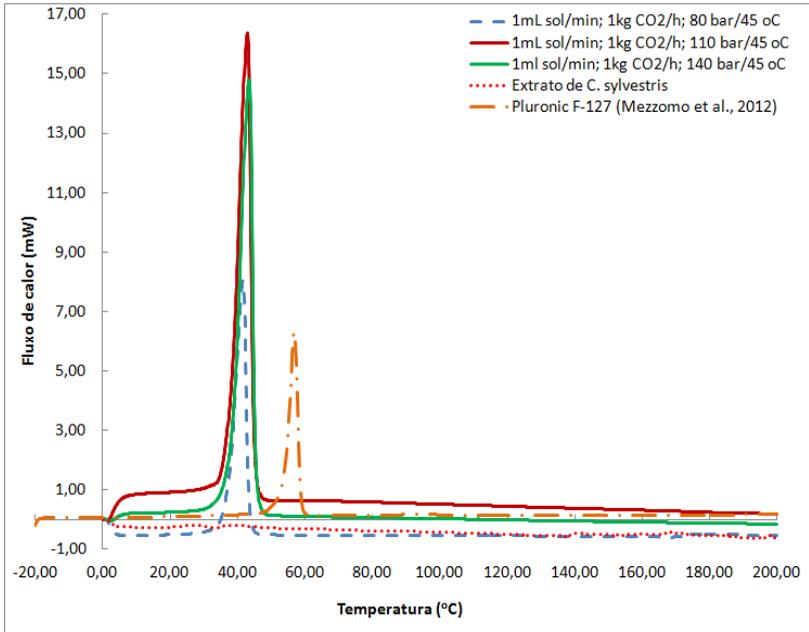
A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada para caracterização do extrato de *C. sylvestris*, do Pluronic F127 e das partículas precipitadas. Os resultados de DSC fornecem a indicação sobre o desempenho da coprecipitação, isto é, indicam a eficiência de incorporação da substância (extrato) dentro da matriz do carreador (polímero). A maioria dos carreadores são polímeros ou materiais com base polimérica que podem sofrer modificações durante o encapsulamento ou processo de coprecipitação. Também, a cristalinidade do polímero e da substância submetida ao encapsulamento pode ser modificada durante o processo de precipitação, cujas modificações são detectadas nas análises por DSC (KIRAN; RAMSDELL, 2008; COCERO et al., 2009).

A incorporação do extrato dentro do polímero pode ser detectada pela ausência de picos de cristalinidade e de fusão da substância ativa, o que normalmente é observado quando o componente ativo não é recoberto pelo polímero. Alguns extratos não possuem pico característico detectável, apresentando somente variações no fluxo de calor na análise de DSC. Por outro lado, um processo de incorporação ineficiente ocorre quando há precipitação separada de ambas as substâncias (extrato e polímero) (COCERO et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012).

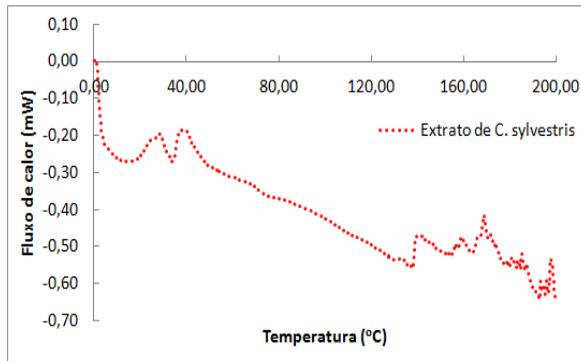
Os resultados de DSC para as amostras do sistema (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ na temperatura de 45 °C, obtidas pelo processo SAS são apresentados na Figura 6.9, onde também são apresentadas as curvas de aquecimento do polímero puro não precipitado (Pluronic F127) e do extrato de *C. sylvestris*.

A curva do DSC, Figura 6.9(a), apresentou um pico próximo a 40 °C para todas as amostras obtidas por SAS. O polímero puro apresentou um pico próximo a 55 °C, enquanto que o extrato não apresentou nenhum pico característico. O pico exibido a 40 °C para as amostras do processo SAS possivelmente estão relacionadas ao pico de

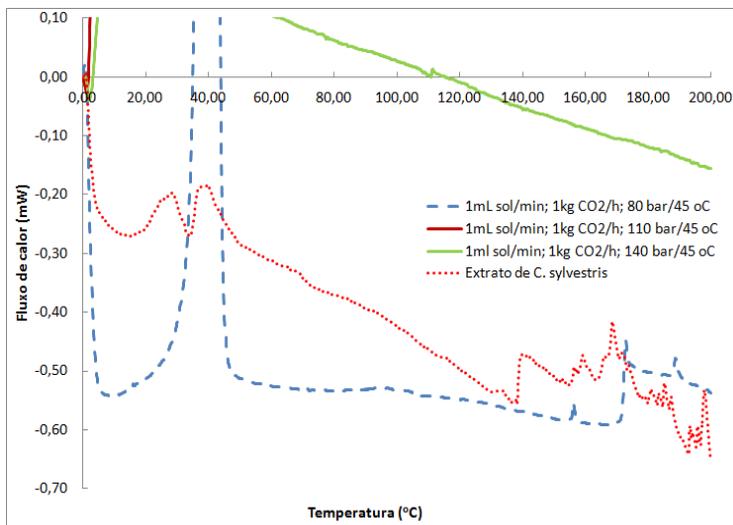
Figura 6.9 - (a) Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS); (b) Ampliação das variações de fluxo de calor do DSC para o extrato de *C. sylvestris*; (c) Ampliação comparativa das variações de fluxo de calor do DSC entre o extrato puro de *C. sylvestris* e a amostra precipitada pelo método SAS a 80 bar e 45 °C.



(a)



(b)



(c)

fusão do polímero, uma vez que a curva de aquecimento do polímero não precipitado indica um ponto de fusão próximo a 55 °C (MEZZOMO et al., 2012). Relacionando os resultados de DSC das amostras SAS com a amostra de polímero não precipitado, observa-se um decréscimo na temperatura de fusão (de 55 para 40 °C) e, também, na entalpia de fusão. Este resultado pode ser devido à diminuição da cristalinidade do polímero com a precipitação SAS ou à modificação da forma cristalina do Pluronic F127 durante o processo de recristalização.

O aumento na curva de aquecimento do DSC para o extrato de *C. sylvestris*, apresentado na Figura 6.9(b), mostra que não ocorre pico característico para o extrato, apresentando apenas variações no fluxo de calor. Similarmente, a Figura 6.9(c) apresenta um aumento nas curvas de DSC (amostras SAS e extrato de *C. sylvestris*), onde pode ser observado que apenas a amostra SAS obtida a 80 bar e o extrato apresentaram variações no fluxo de calor entre 120 e 200 °C. Este comportamento sugere que não ocorreu coprecipitação no processo SAS a 80 bar, indicando que o produto obtido é uma mistura de partículas segregadas de extrato e polímero (COCERO et al., 2009). Analisando os resultados das outras amostras SAS (110 e 140 bar), a ausência de

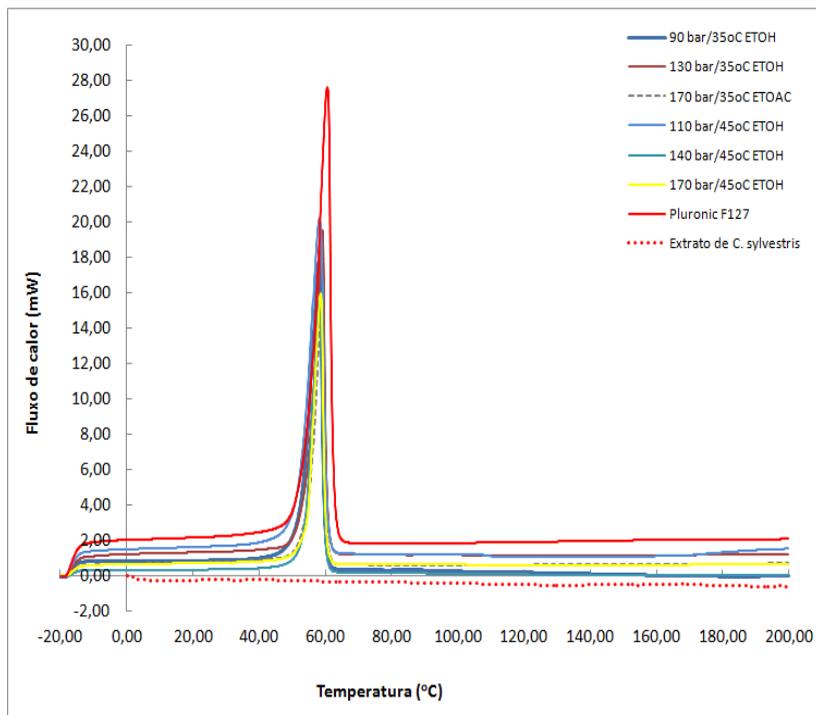
variações de fluxo de calor, característico do extrato de *C. sylvestris*, sugere que ocorreu coprecipitação, isto é, a substância ativa (extrato) foi incorporada na matriz polimérica (Pluronic F127).

Os resultados de DSC para as amostras de SAS obtidas para os sistemas (A) e (B) são apresentados nas Figuras 6.10 e 6.11, respectivamente, onde são apresentadas também as curvas de aquecimento do polímero puro não precipitado (Pluronic F127) e para o extrato de *C. sylvestris*.

As curvas de aquecimento de DSC, apresentadas nas Figuras 6.10 (etanol) e 6.11 (acetato de etila), mostraram que o polímero não processado possui uma banda próxima aos 60 °C, enquanto que o extrato de *C. sylvestris* não apresenta pico característico. O pico encontrado próximo à temperatura de 60 °C para as amostras obtidas pelo processo SAS são, provavelmente, relacionadas ao ponto de fusão do Pluronic F127 não precipitado próximo à temperatura de 55 °C (MEZZOMO et al., 2012).

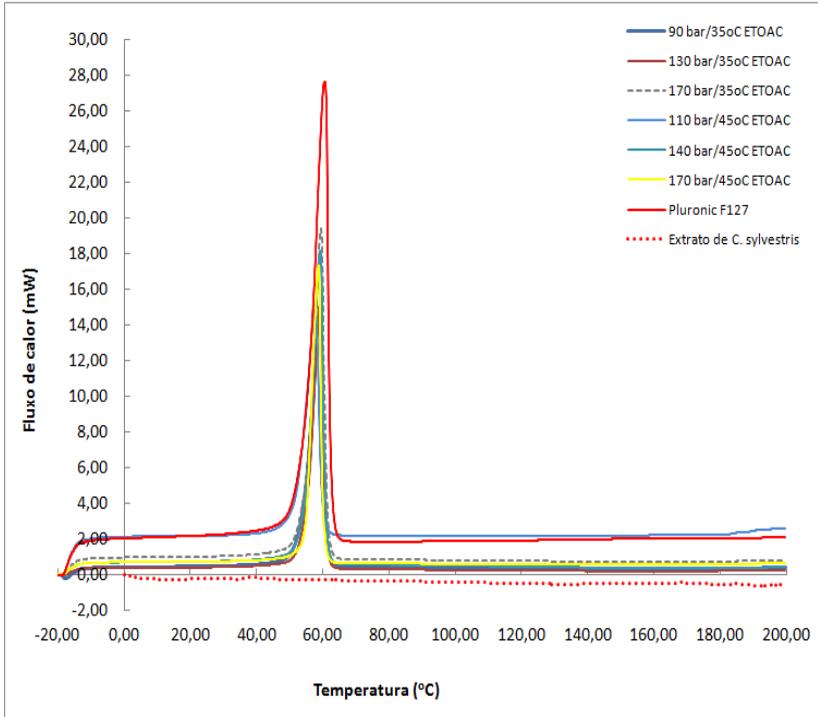
Com relação às amostras submetidas ao processo SAS, as curvas obtidas pelo DSC apresentaram uma ligeira redução na temperatura de fusão (de aproximadamente 60 °C para cerca de 55 °C) e na entalpia de fusão, quando comparadas à amostra de Pluronic F127 não precipitado. Esse resultado pode estar associado à redução na cristalinidade do polímero após a precipitação pelo processo SAS ou à modificação parcial na cristalinidade do Pluronic F127 durante o processo de recristalização. Além disso, a incorporação do extrato dentro do polímero (coprecipitação) pode ser confirmada pela ausência de picos de cristalinidade e fusão da substância ativa, o que normalmente observa-se quando o composto ativo não é recoberto pelo polímero. Alguns extratos não apresentam pico característico detectável, mas somente variações no fluxo de calor na análise de DSC (COCERO et al., 2009; MEZZOMO et al., 2012).

Figura 6.10 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras do sistema (A) extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS) a 35 °C e 45 °C.



De acordo com os resultados obtidos para as amostras precipitadas pelo processo SAS e, considerando a ausência de variações de fluxo de calor do extrato de *C. sylvestris*, o que é característica do extrato, pode-se dizer que ocorreu o encapsulamento ou coprecipitação, ou seja, a substância ativa (extrato) foi incorporada dentro da matriz do carreador (Pluronic F127) para os sistemas A e B submetidos às condições de precipitação a 90, 130 e 170 bar, na temperatura de 35 °C, e a 110, 140 e 170 bar, na temperatura de 45 °C.

Figura 6.11 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) obtida para o polímero puro (Pluronic F127), extrato de *C. sylvestris* e amostras do sistema (B) extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂ precipitadas pelo método antissolvente supercrítico (SAS) a 35 °C e 45 °C.



CAPÍTULO 7: RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE III: Determinação do perfil químico e do teor de compostos fenólicos total e avaliação das atividades antioxidante, hipolipemiante e hipoglicemiante e efeito antiobesidade dos extratos de *Casearia sylvestris*

7.1. Teor de compostos fenólicos total (TFT)

Os valores encontrados de teor de compostos fenólicos total (TFT) para os extratos de *C. sylvestris* obtidos por ESC, Soxhlet e maceração são apresentados na Tabela 7.1. Embora os compostos fenólicos sejam considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, a determinação destes pelo método de Folin-Ciocalteu, expressa em termos de teor de ácido gálico presente na amostra, não caracteriza completamente a atividade antioxidante, representando apenas uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A curva padrão de ácido gálico (utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos total), para as diferentes concentrações testadas e as suas respectivas absorvâncias, está apresentada no Apêndice II.

De acordo com a Tabela 7.1, a quantidade de compostos fenólicos obtida nos extratos ESC não apresentou tendência de variação linear com o aumento ou a diminuição da temperatura e da pressão. As condições de ESC que apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos foram 300 bar, 50 °C e 5 % ETOAC (78 ± 10 mg EAG/g) e 300 bar, 50 °C e 8 % ETOH (62 ± 3 mg EAG/g), as quais se mostraram estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As condições a baixa pressão que apresentaram os melhores resultados para teor de fenólicos total foram SOX-ETOH e MAC-ETOH, com valores de $169,4 \pm 0,6$ mg EAG/g e 135 ± 4 mg EAG/g, respectivamente.

Tabela 7.1 - Teor de compostos fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), para os extratos de *C. sylvestris* e BHT obtidos por diferentes metodologias de extração.

Grupo	Extração	Solvente	Teor de Compostos
			Fenólicos Total (mg EAG/g) ⁽¹⁾⁽²⁾
1	SOX	HX	48,9 ^{dEF} ± 0,9
	SOX	DCM	34,0 ^{eHIJ} ± 0,9
	SOX	CLF	43 ^{cdFG} ± 2
	SOX	ETOAC	46 ^{cdEFG} ± 1
	SOX	ETOH	169,4 ^{aA} ± 0,6
	MAC	HX	41 ^{cGH} ± 3
	MAC	DCM	47 ^{dEFG} ± 1
	MAC	CLF	44 ^{cdFG} ± 2
	MAC	ETOAC	47 ^{dEFG} ± 2
	MAC	ETOH	135 ^{bb} ± 4
2	ESC 40 °C/100 bar	CO ₂	33,4 ^{biIL} ± 0,6
	ESC 50 °C/100 bar	CO ₂	45 ^{aFG} ± 1
	ESC 60 °C/100 bar	CO ₂	8,4 ^{fS} ± 0,9
	ESC 40 °C/200 bar	CO ₂	25 ^{eMNO PQ} ± 2
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂	19 ^{dQR} ± 2
	ESC 60 °C/200 bar	CO ₂	25 ^{eMNO PQ} ± 1
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂	19,5 ^{dQR} ± 0,6
	ESC 50 °C/300 bar	CO ₂	35,4 ^{bHI} ± 0,3
ESC 60 °C/300 bar	CO ₂	13,7 ^{eRS} ± 0,9	
3	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	22 ^{iPQ} ± 1
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	29,4 ^{efghiJLMNO} ± 0,3
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	27 ^{fghiJLMNOP} ± 2
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 11 % ETOH	53,2 ^{cE} ± 0,7
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 2 % ETOAC	35,4 ^{defHI} ± 0,9
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	24 ^{hiOPQ} ± 4
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 8 % ETOAC	26 ^{ghiLMNOPQ} ± 3
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	32 ^{efgIJLM} ± 2
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	43,1 ^{dFG} ± 0,3
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	36 ^{deHI} ± 2
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	32 ^{efghiJLMN} ± 3	

ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	27 ^{fghiJLMNOP} ± 4
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	62 ^{bd} ± 3
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	78 ^{ac} ± 10
BHT⁽³⁾	-	268 ± 13

SOX: Soxhlet; MAC: maceração; ESC: extração supercrítica; ETOH: etanol; ETOAC: acetato de etila; DCM: diclorometano; HX: hexano; CLF: clorofórmio; BHT: Butil-hidroxitolueno; ■ melhores resultados.

⁽¹⁾ Letras minúsculas iguais no mesmo grupo indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

⁽²⁾ Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

⁽³⁾ BENELLI et al. (2010).

Observando a Tabela 7.1, o teor de compostos fenólicos para os extratos obtidos à baixa pressão apresentaram valores que estatisticamente não diferiram significativamente entre si para a maioria das condições de extração (exceto para SOX-ETOH e MAC-ETOH), quando analisados pelo Teste de *Tukey*. Isto sugere que os compostos fenólicos possuem maior afinidade por solventes de polaridade entre intermediária e alta (3,1 a 5,2). Este comportamento também pode ser observado nos resultados obtidos para as extrações supercríticas adicionadas de cossolvente, onde ocorreu aumento do teor de compostos fenólicos, para a maioria dos casos, associado com a elevação da polaridade da mistura de solvente (CO₂ e etanol/acetato de etila).

Avaliando-se o comportamento das extrações supercríticas sem adição de cossolventes (Tabela 7.1) em relação à temperatura de operação, observa-se que o teor de fenólicos total diminui, sem diferença significativa entre os resultados obtidos, com o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C, para todos os casos, exceto para as extrações a 100 bar e 50 °C (45 ± 1 mg EAG/g) e 300 bar e 50 °C (35,4 ± 0,3 mg EAG/g), onde o valor do TFT foi aumentado com a elevação da temperatura. A condição de 100 bar e 60 °C apresentou 8,4 ± 0,9 mg EAG/g, sendo este o menor valor para o TFT entre todas as condições avaliadas.

Com relação à variação da pressão na ESC sem adição de cossolvente, conforme os resultados apresentados na Tabela 7.1, de

forma geral, o aumento da pressão diminuiu os valores de TFT para os ensaios realizados a 40 °C e 50 °C. Porém, um efeito contrário ocorreu para a temperatura de 60 °C, onde a elevação da pressão de 100 bar para 200 e 300 bar aumentou o teor de fenólicos total, em relação à pressão de 100 bar.

Para as extrações realizadas com adição de cossolventes, a adição do modificador e o aumento da quantidade adicionada aumentaram os valores de TFT, tanto para o etanol quanto para o acetato de etila, quando comparadas à extração com CO₂ puro na mesma condição (200 bar e 50 °C). O ensaio com a adição de 11 % ETOH alcançou o valor de TFT de $53,2 \pm 0,7$ mg EAG/g, sendo esse o único valor diferente estatisticamente, em relação às demais condições avaliadas ($p < 0,05$).

Para as extrações realizadas à 300 bar, na temperatura de 40 °C e com adição de etanol como cossolvente, as quantidades de modificador adicionadas (2, 5 e 8 %) aumentaram o valor do TFT em relação à condição com CO₂ puro ($19,5 \pm 0,6$ EAG/mg) na mesma condição de pressão e de temperatura e todas apresentaram resultados diferentes estatisticamente (32 ± 2 EAG/mg, $43,1 \pm 0,3$ mg EAG/g, 36 ± 2 EAG/mg, respectivamente) da condição apenas com CO₂ puro. Já para a condição de 300 bar e 50 °C adicionada de 2, 5 e 8 % de etanol, os valores de TFT encontrados foram semelhantes ao obtido para a condição utilizando somente CO₂, exceto para o ensaio com adição de 8 % ETOH (62 ± 3 mg EAG/g).

Considerando todas as condições de ESC adicionadas ou não de ETOH, observa-se que o emprego de diferentes concentrações de etanol como cossolvente, em alguns casos, teve influência positiva sobre o conteúdo de compostos fenólicos quando comparados ao CO₂ puro, ou seja, melhorou os valores de TFT. Para o caso do acetato de etila, observa-se o mesmo comportamento.

Em geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares. Contudo, alguns destes apresentam uma ampla faixa de polaridade, podendo também ser solubilizados por hexano e CO₂ supercrítico (ZIAKOVA; BRANDSTETEROVA, 2002), conforme pode

ser observado nos resultados apresentados na Tabela 7.1. Porém, a quantidade de compostos fenólicos quantificados nos extratos obtidos pelos métodos Soxhlet e maceração, em especial utilizando etanol e acetato de etila como solventes, sugerem que estes são eficientes na extração de compostos com atividade antioxidante de misturas complexas presentes nas matrizes vegetais, confirmando a sua indicação como cossolventes junto à ESC.

Bravo (1998) e Kalt et al. (2001) relatam que existe uma grande variação entre o conteúdo de compostos fenólicos total presente nos vegetais. As diferenças estão relacionadas à complexidade dos grupos constituintes e à variabilidade das matérias-primas. Além disso, as diferenças encontradas para TFT na literatura para um mesmo vegetal dependem, principalmente, das diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação destes compostos. Os compostos fenólicos presentes nos vegetais são encontrados na forma livre e ligada, porém esta última geralmente é excluída das análises, sendo o TFT subestimado (SUN et al., 2002). Ao mesmo tempo, a quantidade de compostos fenólicos das plantas também depende de fatores como o gênero, espécie e cultivar da planta e de condições de cultivo, colheita e armazenamento (TOMAS-BARBERAN; ESPIN, 2001; RAPISARDA, 1999).

7.2. Avaliação da atividade antioxidante

7.2.1. Método DPPH

Na Tabela 7.2 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* obtidos por Soxhlet e maceração com solventes de diferentes polaridades e por ESC obtidos em diferentes condições de extração. Utilizou-se o BHT, um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante como controle positivo do ensaio. A atividade antioxidante é apresentada em AA %, ou seja, em capacidade de um composto inibir a degradação oxidativa, e em CE₅₀, isto é, a concentração onde o composto apresenta 50 % da sua atividade

Tabela 7.2 - Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* e BHT através do método DPPH, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA) e concentração efetiva a 50 % (CE₅₀).

Grupo	Extração	Solvente	CE ₅₀ (µg/mL) ⁽¹⁾⁽²⁾	% AA (500 µg/mL) ⁽¹⁾⁽²⁾
1	SOX	HX	699 ^{fEFGH} ± 16	35 ^{eLM} ± 1
	SOX	DCM	316 ^{cABC} ± 8	79 ^{cCD} ± 2
	SOX	CLF	282 ^{bAB} ± 2	83,3 ^{bcBC} ± 0,3
	SOX	ETOAC	297 ^{bcAB} ± 14	84 ^{bB} ± 2
	SOX	ETOH	244 ^{aA} ± 2	90 ^{aA} ± 1
	MAC	HX	642 ^{cDEFGH} ± 13	38,72 ^{eKL} ± 0,09
	MAC	DCM	419 ^{dABCDEF} ± 13	59 ^{dFGH} ± 3
	MAC	CLF	421 ^{dABCDEF} ± 2	58,4 ^{dFGH} ± 0,9
	MAC	ETOAC	239,7 ^{aA} ± 0,3	90,3 ^{aA} ± 0,8
	MAC	ETOH	231 ^{aA} ± 6	92,2 ^{aA} ± 0,9
2	ESC 40 °C/ 100 bar	CO ₂	4.569 ^{eM} ± 362	5,7 ^{eP} ± 0,3
	ESC 50 °C/ 100 bar	CO ₂	2.674 ^{dL} ± 335	8 ^{eP} ± 2
	ESC 60 °C/ 100 bar	CO ₂	6.251 ^{fN} ± 601	4,4 ^{eP} ± 0,1
	ESC 40 °C/ 200 bar	CO ₂	1.055 ^{abcIJK} ± 56	24 ^{cN} ± 1
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂	980 ^{abcHIJ} ± 10	24,7 ^{cN} ± 0,3
	ESC 60 °C/ 200 bar	CO ₂	1.370 ^{cK} ± 110	19 ^{dO} ± 1
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂	744 ^{abFGHI} ± 27	34 ^{bLM} ± 1
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂	596 ^{aBCDEFG} ± 7	42,6 ^{aJK} ± 0,5
	ESC 60 °C/ 300 bar	CO ₂	1.224 ^{bcJK} ± 45	22 ^{cNO} ± 1
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	680 ^{gDEFGH} ± 20	38 ^{gKL} ± 1

3	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	409 ^{cABCDEF} ± 3	62,1 ^{cdEFG} ± 0,2
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	398 ^{cABCDE} ± 10	64 ^{cdEF} ± 2
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 11 % ETOH	254 ^{aAB} ± 3	91,4 ^{aA} ± 0,1
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 2 % ETOAC	398 ^{cABCDE} ± 14	65 ^{cE} ± 3
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	770 ^{hGHI} ± 30	33 ^{ghLM} ± 2
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 8 % ETOAC	519 ^{efABCDEFG} ± 6	48 ^{fIJ} ± 2
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	430 ^{cdABCDEFG} ± 10	58 ^{deGH} ± 2
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	339 ^{bABCD} ± 4	74 ^{bd} ± 1
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	345 ^{bABCD} ± 12	74 ^{bd} ± 3
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	529 ^{fABCDEFG} ± 9	47,8 ^{fIJ} ± 0,8
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	471 ^{deABCDEFG} ± 41	54 ^{efHI} ± 4
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	245 ^{aA} ± 4	91,4 ^{aA} ± 0,2
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	808 ^{hGHI} ± 26	32 ^{hM} ± 2
	BHT ⁽³⁾	-	261 ± 12	89,7 ± 0,5

SOX: Soxhlet; MAC: maceração; ESC: extração supercrítica; ETOH: etanol; ETOAC: acetato de etila; DCM: diclorometano; HX: hexano; CLF: clorofórmio; BHT: Butil-hidroxitolueno; melhores resultados.

(1) Letras minúsculas iguais no mesmo grupo indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

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

(3) BENELLI et al. (2010).

máxima. Neste trabalho, a atividade antioxidante refere-se à maior concentração de extrato de *C. sylvestris* testada (500 mg/mL).

Os extratos obtidos à baixa pressão que apresentaram os melhores valores de concentração efetiva (CE_{50}) pelo método DPPH (Tabela 7.2) foram as frações MAC-ETOH ($231 \pm 6 \mu\text{g/mL}$), MAC-ETOAC ($239,7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$), SOX-ETOH ($244 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), SOX-CLF ($282 \pm 2 \mu\text{g/mL}$) e SOX-ETOAC ($297 \pm 14 \mu\text{g/mL}$), porém sem diferença estatística entre os mesmos ($p < 0,05$). Os valores de CE_{50} destes extratos, conforme a Tabela 7.2, são comparáveis ao valor obtido para o BHT ($261 \pm 12 \mu\text{g/mL}$). Isto significa que estes extratos teriam o mesmo potencial antioxidante do BHT. As extrações SOX e MAC utilizando hexano como solvente apresentaram os mais altos valores de CE_{50} ($699 \pm 16 \mu\text{g/mL}$ e $642 \pm 13 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), ou seja, as mais baixas atividades antioxidantes dentre as extrações à baixa pressão. Por outro lado, as técnicas de extração SOX e MAC utilizando diclorometano e MAC utilizando clorofórmio como solventes apresentaram valores de CE_{50} intermediário aos anteriormente citados.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7.2, pode-se inferir que alguns compostos com atividade antioxidante possuem afinidade por solventes de polaridade intermediária a alta (entre 3,1 e 5,2).

Para os extratos obtidos por tecnologia supercrítica (Tabela 7.2), observou-se que o aumento da temperatura de extração de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ para $50 \text{ }^\circ\text{C}$, em geral, reduz os valores de CE_{50} e, conseqüentemente, aumenta a atividade antioxidante dentro da faixa de pressão avaliada. O mesmo não ocorre quando a temperatura é elevada de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A literatura indica $50 \text{ }^\circ\text{C}$ como temperatura ótima de extração para compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais devido a sua sensibilidade térmica (PINELO; SINEIRO; NÚÑEZ, 2006). Entre os extratos de ESC obtido com CO_2 puro, a condição que apresentou o melhor valor de CE_{50} foi 300 bar e $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ($596 \pm 7 \mu\text{g/mL}$), igual estatisticamente aos resultados obtidos para o dióxido de carbono supercrítico puro ($p < 0,05$), na condição de 300 bar e $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ($744 \pm 27 \mu\text{g/mL}$), 200 bar e $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ($980 \pm 10 \mu\text{g/mL}$) e 200 bar e $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ($1.055 \pm$

56 µg/mL). Dessa forma, de acordo com a Tabela 7.2, a elevação da temperatura de 40 °C para 50 °C favoreceu a melhoria da % AA e do CE₅₀ dos extratos, confirmando dados já relatados da literatura.

Ao avaliar-se o aumento da pressão de extração, considerando a temperatura constante, os resultados da Tabela 7.2 indicam que há melhoria significativa nos valores de CE₅₀ e % AA, para todas as temperaturas avaliadas neste trabalho. Como exemplo, o valor do CE₅₀ a 100 bar e 40 °C é modificado de 4.569 ± 362 µg/mL para 744 ± 27 µg/mL a 300 bar e 40 °C.

Quando os valores de atividade antioxidante e CE₅₀ são relacionados com temperatura e pressão, não é encontrada uma tendência definida para aumento ou redução destes valores. Este comportamento pode estar relacionado aos diferentes compostos extraídos em cada uma das condições experimentais, fazendo com que, também, ocorram variações no potencial antioxidante. Estes resultados indicam que mudanças na pressão e na temperatura e, conseqüentemente, na densidade do fluido supercrítico, alteram a concentração dos compostos antioxidantes extraídos de *C. sylvestris*. Como ocorreu uma redução na atividade antioxidante com o aumento da temperatura, pode-se inferir que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possam ter sofrido degradação térmica com o aumento da temperatura (HU; HU; XU, 2005).

De acordo com os resultados obtidos e com a literatura, a condição de extração realizada na temperatura de 50 °C foi escolhida para ser adicionada dos cossolventes, por ser esta uma temperatura ótima para extração de compostos com atividade antioxidante. Assim, os extratos de ESC obtidos a 200 bar e 50 °C com a adição de etanol (2, 5, 8 e 11 %) ou de acetato de etila (2, 5 e 8%) como cossolvente apresentaram destacada atividade antioxidante e, conseqüentemente, menores valores de CE₅₀. De acordo com os resultados da Tabela 7.2, a adição de maiores quantidade de modificador melhora o valor de CE₅₀ obtido, apesar da maioria dos resultados serem iguais estatisticamente ($p < 0,05$), exceto para a condição de 200 bar, 50 °C e 5 % ETOAC (770

$\pm 30 \mu\text{g/mL}$), em que o valor de CE_{50} aumentou em relação à condição de 200 bar, 50°C e 2 % ETOAC ($398 \pm 140 \mu\text{g/mL}$).

Para as condições de ESC a 300 bar e 40°C adicionadas de etanol, o melhor valor de CE_{50} observada foi obtida com adição de 5 % ETOH ($339 \pm 4 \mu\text{g/mL}$). Em todas as condições testadas (2, 5 e 8%) foi observado um aumento nos valores de atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris*, quando comparadas à mesma condição de ensaio realizada apenas com CO_2 puro ($744 \pm 27 \mu\text{g/mL}$), apresentando diferença significativa para o valor de CE_{50} . Quando comparada à condição de 200 bar, 50°C e adição de etanol nas diferentes concentrações, o valor de CE_{50} obtido diminuiu, porém sem diferença significativa entre os valores observados para as duas condições.

Os valores de CE_{50} dos extratos de *C. sylvestris* obtidos a 300 bar, 50°C e 2, 5 e 8 % de adição de etanol melhoraram os resultados de CE_{50} , porém foram estatisticamente iguais em comparação à extração, na mesma condição, com CO_2 puro ($596 \pm 7 \mu\text{g/mL}$), com exceção da condição com adição de 8 % ETOH ($245 \pm 4 \mu\text{g/mL}$). Quando as extrações a 300 bar, 50°C e 2, 5 e 8 % de adição de etanol foram comparadas às extrações a 300 bar, 40°C e adicionadas de etanol, observou-se que não existe diferença significativa entre os valores de CE_{50} obtidos.

A adição de 5 % ETOAC à condição de extração de 300 bar e 50°C , de acordo com a Tabela 7.2, não melhorou o valor de CE_{50} ($808 \pm 26 \mu\text{g/mL}$), sendo este valor maior quando comparado à condição com CO_2 puro ($596 \pm 7 \mu\text{g/mL}$) e comparável às outras condições de ESC sem modificadores.

De forma geral, observando-se os resultados da Tabela 7.2, pode-se dizer que existe uma tendência à redução dos valores de CE_{50} , ou melhoria da atividade antioxidante, pela adição de modificadores (etanol e acetato de etila), sendo os resultados semelhantes ao valor de CE_{50} do BHT ($261 \pm 12 \mu\text{g/mL}$). Quando comparadas às extrações convencionais, os valores de CE_{50} dos extratos de *C. sylvestris* obtidos por ESC adicionadas de cossolventes se equivalem aos extratos obtidos por Soxhlet e maceração, com diclorometano, clorofórmio, acetato de

etila e etanol em ambas as técnicas. Este comportamento sugere que as técnicas que mais favoreceram a solubilização de compostos com atividade antioxidante, detectados pelo método DPPH, foram as que utilizaram solventes de polaridade intermediária e alta na extração.

De acordo com Güntzel (2008), importante atividade antioxidante, determinada pelo método DPPH, é observada tanto no extrato etanólico quanto no extrato aquoso de *C. sylvestris* obtidos por maceração, estando esta atividade relacionada à composição química dos extratos. Para concentrações dos extratos etanólico e aquoso de 100 µg/mL, o autor relata atividade antioxidante de aproximadamente 90 % para ambos os extratos, estando bastante próxima dos padrões BHT (92 %) e quercitina (95 %), utilizados como controle positivo do método. O mesmo fato foi observado no presente trabalho para o extrato de *C. sylvestris* obtido por maceração com etanol, alcançando o valor de atividade antioxidante igual a $92,2 \pm 0,9$ %, estatisticamente semelhante ao BHT ($89,7 \pm 0,5$ %).

No trabalho de Menezes, Schwarz e Santos (2004), foi determinado o potencial antioxidante de extratos aquosos (hidroalcoólico) de várias espécies de plantas medicinais brasileiras, entre elas a *C. sylvestris*, pelo método do DPPH. Como resultado, os autores relatam o valor de CE_{50} igual a 471,80 µg/mL para a *C. sylvestris*. O valor encontrado pelos autores é semelhante a resultados obtidos para algumas condições de extração realizadas no presente trabalho, como ESC 300 bar, 50 °C e 5 % ETOH (471 ± 41 µg/mL), ESC 300 bar, 40 °C e 2 % ETOH (430 ± 10 µg/mL), MAC-CLF (421 ± 2 µg/mL), MAC-DCM (419 ± 13 µg/mL) e ESC 200 bar, 50 °C e 5 % ETOH (409 ± 3 µg/mL). As outras condições de extração avaliadas nesse trabalho apresentaram valores diferentes de CE_{50} (Tabela 7.2), sendo alguns destes inferiores ao relatado por Menezes, Schwarz e Santos (2004), indicando que os extratos obtidos neste trabalho possuem melhor atividade antioxidante que o extrato aquoso de *C. sylvestris*.

7.2.2. Método ABTS

A Tabela 7.3 apresenta os valores de inibição de formação do radical ABTS, expressos em percentual de inibição, e os valores de capacidade antioxidante, expressos em equivalentes de Trolox, para os extratos de *C. sylvestris*. Avaliando-se os resultados apresentados na Tabela 7.3, observa-se que os compostos detectados pelo método ABTS apresentam diferentes polaridades, relacionados ao solvente utilizado na técnica empregada. Percebe-se que os melhores resultados foram provenientes das extrações SOX e MAC que utilizaram solventes de índice de polaridade média e alta (ETOAC e ETOH). De acordo com a Tabela 7.3, os melhores valores de capacidade antioxidante obtidos frente ao radical ABTS para as extrações a baixa pressão foram obtidos nas condições SOX-ETOH e MAC-ETOH, com $573 \pm 7 \mu\text{M ET/g}$ e $442 \pm 4 \mu\text{M ET/g}$, respectivamente, sendo diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e em relação às demais condições aplicadas.

Para as extrações utilizando CO_2 supercrítico puro, os melhores resultados de capacidade antioxidante foram encontrados para as condições de ESC a 200 bar e 40°C ($93 \pm 4 \mu\text{M ET/g}$), estatisticamente diferente dos demais valores obtidos ($p < 0,05$), seguida das extrações a 300 bar e 40°C ($79 \pm 3 \mu\text{M ET/g}$) e 200 bar a 50°C ($74 \pm 6 \mu\text{M ET/g}$) e 60°C ($71 \pm 3 \mu\text{M ET/g}$), iguais estatisticamente entre si. As outras condições testadas resultaram em valores de capacidade antioxidante abaixo de $47 \pm 5 \mu\text{M ET/g}$ (300 bar e 60°C). De acordo com a Tabela 7.3, é observada uma melhora nos resultados de capacidade antioxidante quando a pressão é elevada de 100 bar para 200 bar, não ocorrendo o mesmo quando a elevação ocorre de 200 para 300 bar. Em relação à temperatura, essa aparentemente não influencia nos resultados.

Comparando-se os resultados da ESC com CO_2 puro com as técnicas a baixa pressão, observa-se que esses resultados de capacidade antioxidante foram inferiores aos obtidos por MAC e SOX. Alguns resultados de ESC com CO_2 puro foram semelhantes a MAC e SOX utilizando HX e DCM como solventes, possivelmente indicando que o CO_2 supercrítico puro não é o solvente mais adequado para a extração de compostos com atividade antioxidante frente ao radical ABTS.

Tabela 7.3 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* através do método ABTS, expressos através do percentual de inibição (% Inibição) e capacidade antioxidante (CA) expressa em equivalentes de Trolox (ET).

Grupo	Extração	Solvente	% Inibição ⁽¹⁾⁽²⁾	CA ($\mu\text{M ET/g}$) ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
1	SOX	HX	8,39 ^{fgKL} \pm 0,08	93 ^{fgKL} \pm 1
	SOX	DCM	8,3 ^{fgKLM} \pm 0,4	91 ^{fgKLM} \pm 6
	SOX	CLF	11,3 ^{cG} \pm 0,3	133 ^{cG} \pm 4
	SOX	ETOAC	22,2 ^{cC} \pm 0,1	284 ^{cC} \pm 1
	SOX	ETOH	43,2 ^{aA} \pm 0,5	573 ^{aA} \pm 7
	MAC	HX	7,6 ^{gLMN} \pm 0,2	82 ^{gMN} \pm 2
	MAC	DCM	12,4 ^{dF} \pm 0,2	148 ^{dF} \pm 3
	MAC	CLF	9,0 ^{fJK} \pm 0,4	102 ^{fJK} \pm 6
	MAC	ETOAC	12,9 ^{dF} \pm 0,1	154 ^{dF} \pm 1
	MAC	ETOH	33,8 ^{bb} \pm 0,3	442 ^{bb} \pm 4
2	ESC 40 °C/ 100 bar	CO ₂	3,67 ^{dP} \pm 0,08	28 ^{dP} \pm 1
	ESC 50 °C/ 100 bar	CO ₂	3,5 ^{dP} \pm 0,3	26 ^{dP} \pm 4
	ESC 60 °C/ 100 bar	CO ₂	3,59 ^{dP} \pm 0,09	27 ^{dP} \pm 1
	ESC 40 °C/ 200 bar	CO ₂	8,4 ^{aKL} \pm 0,3	93 ^{aKL} \pm 4
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂	7,1 ^{bN} \pm 0,4	74 ^{bN} \pm 6
	ESC 60 °C/ 200 bar	CO ₂	6,8 ^{bN} \pm 0,2	71 ^{bN} \pm 3
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂	7,4 ^{bMN} \pm 0,2	79 ^{bMN} \pm 3
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂	4,8 ^{cO} \pm 0,1	44 ^{cO} \pm 1
	ESC 60 °C/ 300 bar	CO ₂	5,0 ^{cO} \pm 0,4	47 ^{cO} \pm 5
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	6,98 ^{hN} \pm 0,08	73 ^{hN} \pm 1

3	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	8,9 ^{fgJK} ± 0,2	100 ^{fgJK} ± 3
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	10,7 ^{dGH} ± 0,2	125 ^{dGH} ± 3
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 11 % ETOH	14,6 ^{bE} ± 0,3	178 ^{bE} ± 4
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 2 % ETOAC	12,6 ^{cF} ± 0,2	151 ^{cF} ± 3
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	8,7 ^{gK} ± 0,1	97 ^{gK} ± 1
	ESC 50 °C/ 200 bar	CO ₂ + 8 % ETOAC	10,2 ^{deHI} ± 0,3	118 ^{deHI} ± 5
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	8,6 ^{gK} ± 0,4	96 ^{gK} ± 5
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	9,4 ^{efgIJK} ± 0,2	106 ^{efgIJK} ± 3
	ESC 40 °C/ 300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	15,0 ^{bE} ± 0,4	183 ^{bE} ± 6
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	10,2 ^{deHI} ± 0,3	118 ^{deHI} ± 4
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	9,7 ^{efIJ} ± 0,2	111 ^{efIJ} ± 2
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	20,4 ^{aD} ± 0,3	258 ^{aD} ± 4
	ESC 50 °C/ 300 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	9,8 ^{defHIJ} ± 0,1	112 ^{efHIJ} ± 1

SOX: Soxhlet; MAC: maceração; ESC: extração supercrítica; ETOH: etanol; ETOAC: acetato de etila; DCM: diclorometano; HX: hexano; CLF: clorofórmio; melhores resultados.

(¹) Letras minúsculas iguais no mesmo grupo indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

(²) Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Quando as condições de ESC foram adicionadas de cossolventes (etanol ou acetato de etila) os valores de capacidade antioxidante obtidos apresentaram uma melhora significativa nos

resultados obtidos para alguns casos. As melhores capacidades antioxidantes foram encontradas nas condições a 300 bar e 50 °C adicionada de 8 % ETOH, 300 bar e 40 °C adicionada de 8 % ETOH e 200 bar e 50 °C adicionada de 11 % ETOH, obtendo valores iguais a $258 \pm 4 \mu\text{M ET/g}$, $183 \pm 6 \mu\text{M ET/g}$ e $178 \pm 4 \mu\text{M ET/g}$, respectivamente. As condições de ESC adicionadas de acetato de etila que obtiveram os melhores resultados de capacidade antioxidante frente ao radical ABTS foram 200 bar e 50 °C adicionada de 2 % ETOAC ($151 \pm 3 \mu\text{M ET/g}$), foram 200 bar e 50 °C adicionada de 8 % ETOAC ($118 \pm 5 \mu\text{M ET/g}$) e foram 300 bar e 50 °C adicionada de 5 % ETOAC ($112 \pm 1 \mu\text{M ET/g}$). Os resultados da Tabela 7.3 mostram que a adição de cossolventes (ETOH ou ETOAC) melhora a capacidade antioxidante avaliada pelo método ABTS quando esses resultados são comparados com a extração na mesma condição apenas com CO₂ puro. De forma geral, maiores quantidades de cossolvente adicionado na extração melhoram a capacidade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris*.

A capacidade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* obtidos pelo radical ABTS variaram de $26 \pm 4 \mu\text{M ET/g}$ a $573 \pm 7 \mu\text{M ET/g}$. Como outros exemplos de capacidade antioxidante frente ao radical ABTS tem-se o trabalho de Andrade (2011), onde os melhores valores obtidos de capacidade antioxidante para a casca e borra do café foram $381 \pm 16 \mu\text{M ET/g}$ (SOX-ETOAC) e $275 \pm 12 \mu\text{M ET/g}$ (100 bar e 60 °C), respectivamente. Para extratos de erva baleeira o melhor valor de capacidade antioxidante obtido pelo método ABTS, avaliado por Michielin (2009), foi de $1048 \pm 7 \mu\text{M ET/g}$ para maceração com acetato de etila. Ainda, a capacidade do vinho tinto envelhecido apresentou valores de 880 a 1530 $\mu\text{M ET/g}$ (ARNOUS et al., 2001), enquanto que extratos de erva-mate apresentaram valores de 402 a 1113 $\mu\text{M ET/g}$ (CANTERLE, 2005).

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

A Tabela 7.4 apresenta os valores obtidos para o método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos em

percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação, para os extratos de *C. sylvestris* e BHT.

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

Para as técnicas a baixa pressão os melhores resultados de % AA pelo método do β -caroteno/ácido linoleico foram obtidos para as extrações com Soxhlet utilizando acetato de etila (111 ± 3 %), clorofórmio (100 ± 5 %) e etanol (99 ± 9 %), conforme a Tabela 7.4, sendo estes resultados de % AA estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$) e semelhantes ao BHT (113 ± 7 %), assim como as extrações SOX-HX e SOX-DCM (86 ± 5 % e 98 ± 1 %, respectivamente). Estes resultados indicam que os compostos antioxidantes detectados nos extratos citados são de diferentes polaridades, relacionados aos solventes utilizados nas extrações.

Para os extratos de *C. sylvestris* obtidos por maceração observa-se que os valores do % AA foram menores que os resultados obtidos pelos extratos Soxhlet para todos os solventes utilizados. Os valores para MAC variaram de 35 ± 2 % (ETOH) a 75 ± 5 % (HX), sendo praticamente todos estatisticamente iguais entre si, mas diferentes do valor encontrado para o BHT. Ao contrário do encontrado para a extração Soxhlet, os extratos obtidos por maceração, apresentaram maior % AA para os solventes de baixa polaridade, HX e DCM, indicando que a técnica empregada na extração de compostos com atividade biológica influencia no tipo de composto antioxidante extraído, como pode ser visualizado na Tabela 7.4.

Observando a Tabela 7.4, a atividade antioxidante detectada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico para os extratos obtidos com a tecnologia supercrítica utilizando CO_2 indica que o % AA dos extratos de *C. sylvestris* é devido, possivelmente, à presença de compostos de

Tabela 7.4 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *C. sylvestris* e BHT através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico, expressos em termos de percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação.

Grupo	Extração	Solvente	% AA (120 min) ⁽¹⁾⁽²⁾
1	SOX	HX	86 ^{bcABCDEF} ± 5
	SOX	DCM	98 ^{abABCD} ± 1
	SOX	CLF	100 ^{abABCD} ± 5
	SOX	ETOAC	111 ^{aAB} ± 3
	SOX	ETOH	99 ^{abABCD} ± 9
	MAC	HX	75 ^{cdCDEF} ± 5
	MAC	DCM	71 ^{cdDEFG} ± 5
	MAC	CLF	66 ^{dFG} ± 4
	MAC	ETOAC	44 ^{eGHI} ± 4
	MAC	ETOH	35 ^{eHI} ± 2
2	ESC 40 °C/100 bar	CO ₂	71,7 ^{abDEFG} ± 0,3
	ESC 50 °C/100 bar	CO ₂	66 ^{bEFGH} ± 3
	ESC 60 °C/100 bar	CO ₂	18 ^{eI} ± 5
	ESC 40 °C/200 bar	CO ₂	71 ^{abDEFG} ± 3
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂	98 ^{abABCD} ± 6
	ESC 60 °C/200 bar	CO ₂	91 ^{abABCDE} ± 18
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂	82 ^{abABCDEF} ± 17
	ESC 50 °C/300 bar	CO ₂	106 ^{aAB} ± 4
ESC 60 °C/300 bar	CO ₂	19 ^{eI} ± 5	
3	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	73 ^{cDEFG} ± 16
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	87 ^{abcABCDEF} ± 3
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	80 ^{bcCDEF} ± 5
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 11 % ETOH	86 ^{abcABCDEF} ± 4
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 2 % ETOAC	110 ^{aA} ± 1
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	103 ^{abABC} ± 18
	ESC 50 °C/200 bar	CO ₂ + 8 % ETOAC	90 ^{abcABCDEF} ± 7
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	93,9 ^{abcABCDE} ± 0,7
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	90 ^{abcABCDEF} ± 3
	ESC 40 °C/300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	90 ^{abcABCDEF} ± 4
	ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 2 % ETOH	92,39 ^{abcABCDEF} ± 0,03
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOH	81 ^{bcCDEF} ± 1	

ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 8 % ETOH	91,44 ^{abcABCDE} ± 0,03
ESC 50 °C/300 bar	CO ₂ + 5 % ETOAC	108 ^{aAB} ± 3
BHT⁽³⁾	-	113 ± 7

SOX: Soxhlet; MAC: maceração; ESC: extração supercrítica; ETOH: etanol; ETOAC: acetato de etila; DCM: diclorometano; HX: hexano; CLF: clorofórmio; BHT: Butil-hidroxitolueno; ■ melhores resultados.

(1) Letras minúsculas iguais no mesmo grupo indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

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

(3) BENELLI et al. (2010).

baixa polaridade nos extratos. As condições de ESC a 100 bar apresentaram atividade antioxidante semelhante estatisticamente às extrações pelo método da maceração, exceto para a condição de 100 bar e 60 °C ($18 \pm 5 \%$). Dentre as outras condições com CO₂ puro, destacam-se as condições de ESC a 200 bar e 50 °C ($98 \pm 6 \%$) e 300 bar e 50 °C ($106 \pm 4 \%$), que não diferem estatisticamente, pelo Teste de Tukey, entre si, sendo semelhantes ao BHT ($113 \pm 7 \%$).

Quando é analisada a variação da atividade antioxidante em função da pressão de ESC para uma mesma temperatura, nota-se que não ocorrem variações significativas com o aumento da pressão, uma vez que os resultados semelhantes estatisticamente entre si, exceto para a condição de 100 bar e 300 bar, ambas a 60 °C. Quando se considera a variação de temperatura, em uma condição isobárica, o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C não causa alteração significativa na atividade antioxidante dos extratos de *C. sylvestris*, exceto para a temperatura de 60 °C a 100 bar e 300 bar. Estes resultados sugerem que o aquecimento da solução, durante a realização do ensaio de atividade antioxidante ou a elevação da temperatura durante o processo de extração, não causa a redução da atividade antioxidante de 40 °C para 50 °C (KANG et al., 2006).

Nas extrações supercríticas adicionadas de cossolvente (etanol e acetato de etila) ocorre um aumento no potencial antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico de $73 \pm 16 \%$, quando é utilizado 2 % de etanol, para $86 \pm 4 \%$, com 11 % de etanol, na condição a 200 bar e

50 °C (Tabela 7.4), embora essa elevação não seja diferente estatisticamente, ao nível de 5 % de significância. Quando foi utilizado acetato de etila na condição a 200 bar e 50 °C, ocorreu a redução não significativa do % AA de 110 ± 1 % (2 % ETOAC) para 90 ± 7 % (8 % ETOAC). Para as condições de ESC a 300 bar e 40 °C e 50 °C adicionadas de 2, 5 e 8 % de etanol, os resultados obtidos para atividade antioxidantes foram semelhantes estatisticamente entre si ($p < 0,05$). A condição de ESC a 300 bar, 50 °C e 5 % ETOAC apresentou 108 ± 3 % de atividade antioxidante semelhante ao BHT (113 ± 7 %). De acordo com a literatura, essas alterações de aumento e redução com a adição de cossolventes em termos de atividade antioxidante, mesmo que não significativas, ocorrem devido à redução do efeito do etanol e do acetato de etila como cossolventes na mistura supercrítica, diminuindo extração de compostos polares (CAMPOS et al., 2008).

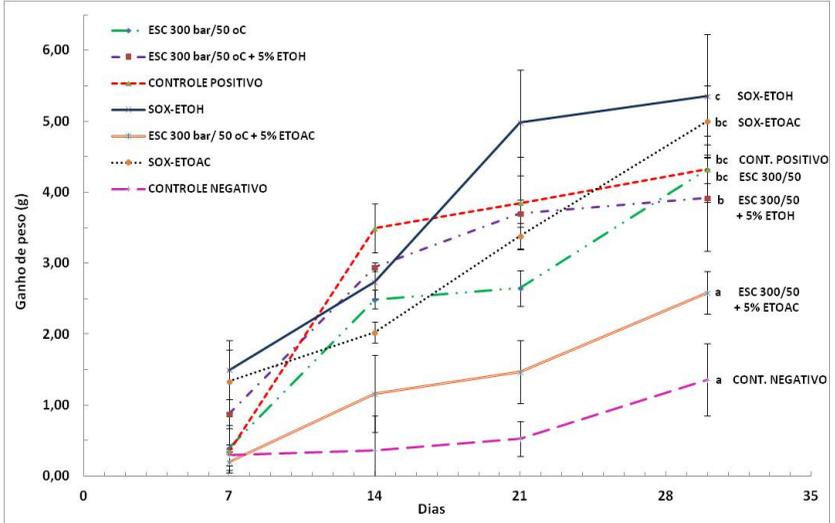
Como já discutido no item 5.2.2, a adição de diferentes concentrações de etanol (2, 5, 8 e 11 %) e acetato de etila (2, 5 e 8 %) como cossolventes na extração supercrítica levaram a um aumento no rendimento de extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC com o aumento da concentração de cossolvente aplicada (Tabelas 5.8 e 5.9) devido a modificações nas características da mistura supercrítica (CO₂ + cossolvente). Porém, nos resultados obtidos para atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 7.4) observa-se que não ocorreu melhora no potencial antioxidante com o aumento da concentração de modificador adicionada. De acordo com a literatura, como já mencionado anteriormente, a concentração de cossolvente afeta a extração supercrítica, provavelmente baseada (a) no aumento na concentração de etanol ou de acetato de etila podendo saturar o CO₂ com conseqüente formação de duas fases, para uma mesma condição específica de pressão e temperatura do sistema; e (b) no efeito do etanol ou do acetato de etila sobre o soluto, isto é, o efeito sobre a solubilização das moléculas polares do soluto. Quando o modificador está presente em excesso na mistura, não há energia suficiente para separar as moléculas de etanol/acetato de etila, causando uma menor solubilização de algumas moléculas do soluto com atividade antioxidante (MORRISON; BOYD, 1996).

De forma geral, quando os extratos de *C. sylvestris* foram avaliados pelos métodos TFT, DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e ABTS neste trabalho, percebe-se que nem sempre os extratos que apresentaram melhores resultados por uma metodologia foram os mesmos em outra, indicando que os extratos de *C. sylvestris* possuem compostos bioativos de diferentes polaridades e grupos químicos. Cabe também ressaltar os importantes resultados apresentados pela ESC nas diferentes metodologias testadas, fazendo desta uma técnica válida para a obtenção de extratos ricos em compostos com atividade biológica.

7.3. Efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante

Os resultados do efeito antiobesidade e das atividades hipolipemiante e hipoglicemiante *in vivo* dos grupos tratados com 100 mg/kg_{camundongo}·dia de extratos de *C. sylvestris*, obtidos nas condições SOX-ETOH, SOX-ETOAC, ESC 300 bar/50 °C, ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH e ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC, e os dos grupos de controle positivo e negativo estão apresentados nas Figuras 7.1 e 7.2, respectivamente.

Na Figura 7.1 estão representados graficamente os ganhos de peso dos camundongos para todos os grupos do experimento, conforme descrito no item 4.14, durante os 30 dias de tratamento. Comparando-se o ganho de peso dos grupos tratados com os extratos de *C. sylvestris* com o controle positivo ao final do tratamento, percebe-se que os grupos que receberam os extratos supercríticos de *C. sylvestris* ESC 300 bar/50 °C ($4,3 \pm 0,2$ g), ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH ($3,9 \pm 0,7$ g) e ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC ($2,6 \pm 0,3$ g) apresentaram menores ganhos de peso corporal do que o controle positivo ($4,3 \pm 0,5$ g), sendo que a condição ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC apresentou o menor ganho de peso do experimento (redução de 39,5 % de ganho de peso em **Figura 7.1** - Gráfico do ganho de peso dos camundongos Balb/c tratados durante 30 dias com os extratos de *C. sylvestris* e dieta hipercalórica e grupos de controle positivo e negativo.



Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

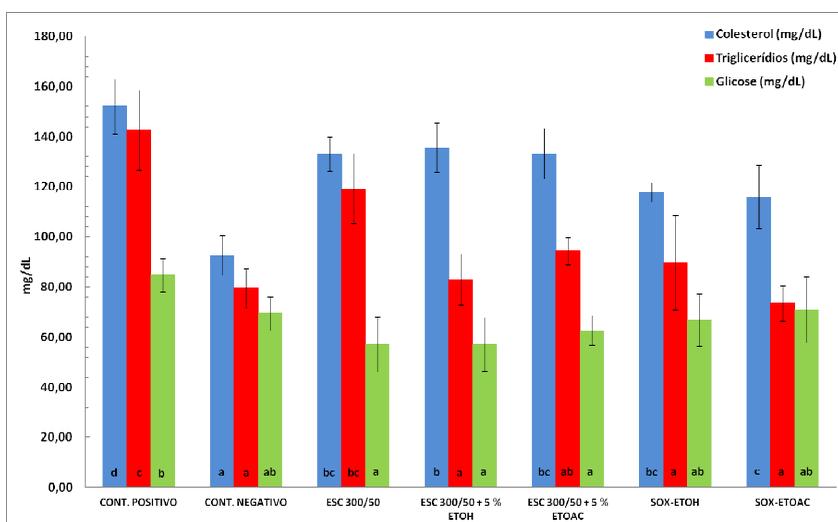
relação ao controle positivo). Essa condição é estatisticamente diferente do grupo de controle positivo e dos demais grupos do experimento, equiparando-se estatisticamente ($p < 0,05$) ao controle negativo ($1,2 \pm 0,5$ g). As outras condições testadas SOX-ETOH e SOX-ETOAC apresentaram ganhos de peso maiores e estatisticamente iguais em relação ao controle positivo, ao nível de 5 % de significância.

A redução no peso dos camundongos tratados com diferentes extratos de *C. sylvestris* possivelmente está associada à redução nos níveis sanguíneos de triglicerídios, colesterol e glicose. A partir desses resultados, apresentados na Figura 7.2, observa-se que todos os grupos tratados com extratos de *C. sylvestris* apresentaram redução nos níveis de colesterol, triglicerídios e glicose em relação ao grupo de controle positivo.

Para os níveis de colesterol, todas as condições avaliadas apresentaram valores significativamente menores que o nível de colesterol encontrado para o controle positivo (152 ± 11 mg/dL), que se trata do grupo hipercalórico alimentado com dieta hipercalórica e água sem administração de extrato de *C. sylvestris*, porém mais elevados que o controle negativo (92 ± 8 mg/dL), ou seja, grupo sem tratamento, o

qual recebeu somente ração regular *ad libitum* e água, sem qualquer administração de extrato de *C. sylvestris* nem dieta hipercalórica. A melhor condição para a redução do nível de colesterol, entre todos os grupos testados, foi obtida para o grupo SOX-ETOH (116 ± 13 mg/dL), reduzindo em 23,7 % o nível de colesterol sanguíneo em relação ao controle positivo.

Figura 7.2 - Níveis de colesterol, triglicéridios e glicose em camundongos Balb/c tratados durante 30 dias com extratos de *C. sylvestris* e dieta hipercalórica e grupos de controle positivo e negativo.



Letras iguais para a mesma análise (colesterol, triglicéridios e glicose) indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Para os níveis de triglicéridios, assim como para o colesterol, foram obtidos níveis inferiores ao obtido para o controle positivo (143 ± 16 mg/dL), sendo que as condições SOX-ETOAC (74 ± 7 mg/dL), ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH (83 ± 10 mg/dL) e SOX-ETOH (90 ± 19 mg/dL) foram as que mais reduziram os níveis de triglicéridios (48, 41 e 37 % de redução em relação ao controle positivo, respectivamente), sendo estatisticamente iguais ($p < 0,05$) ao controle negativo, que apresentou valor igual a 78 ± 8 mg/dL para triglicéridios.

Finalmente, os níveis de glicose também foram mantidos abaixo do controle positivo (85 ± 7 mg/dL) pela administração dos extratos de *C. sylvestris*. Os resultados obtidos ainda mostraram que os extratos testados mantiveram o nível glicêmico abaixo do controle negativo (69 ± 7 mg/dL), exceto para a condição SOX-ETOAC (71 ± 13 mg/dL). Dentre os resultados apresentados para redução dos níveis de glicose, o grupo tratado com o extrato de *C. sylvestris* obtido na condição ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH (57 ± 11 mg/dL) apresentou redução de 33 % em relação ao controle positivo e, inclusive, 18 % em relação ao controle negativo.

A redução no ganho de peso e nos níveis de colesterol, triglicerídios e glicose promovida pelos extratos de *C. sylvestris* testados pode estar relacionada aos valores de teor de fenólicos total e atividades antioxidantes (item 7.1 e 7.2), bem como ao perfil químico (apresentada em 7.4) destes extratos. Substâncias com propriedades antioxidantes, como os flavonóides, possuem capacidade de regular a termogênese e a oxidação lipídica, prevenindo, desta forma, o depósito de gordura no organismo e regulando o peso corporal (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7.1, o melhor resultado para teor de fenólicos total, dentre os extratos aplicados nos ensaios *in vivo*, foi obtido para a extração SOX-ETOH ($169,4 \pm 0,6$ mg EAG/g), assim como para o ensaio de atividade antioxidante pelo radical DPPH (Tabela 7.2: 244 ± 2 µg/mL). Além disso, essa condição apresentou a melhor capacidade antioxidante pela inibição do radical ABTS (Tabela 7.3: 573 ± 7 µM ET/g) e elevado valor de atividade antioxidante pelo método do β-caroteno/ácido linoleico (Tabela 7.4: 99 ± 9 %). Todos esses resultados podem justificar o melhor desempenho do extrato de *C. sylvestris* obtido nessa condição para a redução nos níveis de colesterol e o segundo melhor resultado para a redução dos triglicerídios (Figura 7.2), além do perfil químico (item 7.4 e Apêndice IV). Porém, para a redução de ganho de peso (Figura 7.1), o extrato SOX-ETOH não se mostrou eficiente quando comparado aos outros extratos testados.

A condição SOX-ETOAC mostrou-se a mais adequada para a redução do colesterol (Figura 7.2), apesar de os resultados de teor de fenólicos total e atividades antioxidantes serem inferiores aos obtidos pela condição SOX-ETOH, exceto para o método do β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 7.4). Possivelmente, isso pode ser explicado pela composição do extrato obtido nessa condição de extração (item 7.4 e Apêndice IV).

Observando-se a redução dos níveis de glicose dos camundongos submetidos ao experimento (Figura 7.2), o extrato de *C. sylvestris* que apresentou o melhor resultado foi o obtido na condição ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH. Entre os extratos utilizados nos experimentos *in vivo*, essa condição não apresentou resultados de destaque para o teor de fenólicos total e para as atividades antioxidantes (item 7.1 e 7.2, respectivamente). Porém, a composição do extrato obtida nessa condição apresentou diversos compostos (item 7.4 e Apêndice IV) e a combinação entre eles pode ser o fator responsável pelos resultados obtidos.

De acordo com os resultados da Figura 7.1, observa-se que o extrato de *C. sylvestris* obtido na condição ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC promoveu o menor ganho de peso dos camundongos entre os grupos avaliados. Essa condição apresentou bons resultados de atividade antioxidante pelo radical ABTS (Tabela 7.3) e pelo método do β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 7.4), semelhante ao extrato ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH. A composição do extrato ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC (item 7.4 e Apêndice IV) pode também estar associada ao efeito redutor de peso.

Cabe salientar que os resultados aqui obtidos não indicam o melhor extrato para cada um dos itens avaliados (efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante), pois cada um deles é formado por diferente compostos e o efeito de sinergismo entre eles promove os efeitos aqui observados. Entre os componentes identificados nos extratos de *C. sylvestris* (item 7.4 e Apêndice IV), o β -sitosterol é o único relatado pela literatura como redutor do colesterol sanguíneo, por competir com esse pela absorção (MATSUOKA, 2008). Esse composto

foi identificado nos extratos ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH e ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC (item 7.4 e Apêndice IV) o que pode justificar o bom desempenho dos extratos obtidos nessas condições nos experimentos de redução dos níveis de colesterol.

Werle et al. (2009) testaram extratos de *C. sylvestris* obtidos por maceração, utilizando como líquido extrator água destilada e etanol 70 %, para obtenção dos extratos aquoso e hidroalcoólico, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, os níveis séricos de triglicerídios dos animais que receberam a suspensão de extrato hidroalcoólico apresentaram uma redução significativa de 110 mg/dL (grupo de controle) para 80 mg/dL. Entretanto, não foi observadas reduções nos níveis séricos de triglicerídios para os ratos que receberam a suspensão do extrato aquoso.

A literatura destaca várias atividades para a *C. sylvestris*, como seu efeito antiulcerativo (BASILE et al., 1990), atividade anti-inflamatória (RUPPELT et al., 1991) e a habilidade de inibir a atividade da Pdr5p ATPase (RANGEL et al., 2008). A medicina popular relata a ação da *C. sylvestris* como agente hipotrigliceridemiante (WERLE et al., 2009). Schoenfelder et al. (2008) utilizaram o extrato concentrado de *C. sylvestris*, obtido na maceração com metanol, dissolvido em água destilada. No experimento foram utilizados camundongos machos *Swiss*, que receberam o extrato de *C. sylvestris* nas concentrações 125, 250 e 500 mg/kg, enquanto o grupo de controle recebeu a substância *orlistat*. O tratamento com o extrato metanólico de *C. sylvestris* causou efeito inibitório tanto na elevação dos triglicerídios séricos quanto nas lipases séricas, após administração de óleo de oliva. O efeito inibitório máximo ocorreu para a concentração de 500 mg/kg, quando o extrato inibiu a elevação dos triglicerídios em 86 % (2 horas), 77 % (4 horas) e 69 % (6 horas).

A partir dos resultados obtidos com os ensaios descritos nos itens 4.10 a 4.12 (Tabelas 7.1 a 7.4 e Figuras 7.1 e 7.2), pode-se sugerir que os diferentes extratos de *C. sylvestris* testados apresentam considerável efeito antiobesidade, hipolipemiante e hipoglicemiante. Porém, estudos complementares a este, como por exemplo, o ensaio de

absorção de lipídios, devem ser realizados para que tais propriedades sejam atribuídas aos extratos de *C. sylvestris*.

Os resultados apresentados neste trabalho para efeito antiobesidade e atividades hipolipemiante e hipoglicemiante de extratos da *Casearia sylvestris* estão sob pedido de patente pelo Departamento de Inovação Tecnológica (DIT) da UFSC.

7.4. Determinação do perfil química dos extratos

O Quadro 7.1 apresenta os compostos identificados nos diferentes extratos de *Casearia sylvestris* obtidos pelas técnicas a baixa pressão (maceração e Soxhlet) e com fluido supercrítico. Os extratos foram analisados através de CG-EM conforme procedimento descrito em 4.15. No Apêndice IV, são apresentados os espectros de massas de todos os extratos de *C. sylvestris*, os tempos de retenção, o número do registro CAS (*Chemical Abstract Service*) e os percentuais relativos de cada composto majoritário, correspondentes aos dados de CG-EM.

A partir dos dados do Quadro 7.1 observa-se que foram identificados cinquenta e nove compostos presentes nos diferentes extratos de *C. sylvestris* analisados. Os principais componentes identificados em termos de percentual de área relativa e/ou incidência nos diferentes extratos foram o (-)-espatulenol; (+)-espatulenol; 1(5)-guaien-11-ol; ácido n-hexadecanóico; aloaromadendreno; *cis*- β -farneseno; *trans*- β -farneseno; D-germacreno; fitol; óxido de β -cariofileno; α -cariofileno/ α -humuleno; β -cariofileno; β -cubebeno; 2,3-oxidosqualeno; octacosano; tetratetracontano; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; 2,2-dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicoso-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano; hentriacontano; β -sitosterol; *cis*-nerolidol; γ -elemeno; hentriacontano; epóxido de α -humuleno II e tetracosano.

Na literatura existem poucos relatos sobre a composição química do óleo essencial ou de extratos de *C. sylvestris*. Esteves et al. (2011) e Silva et al. (2008a) descreveram a composição química do óleo essencial da *C. sylvestris* (item 3.1.1) e alguns componentes citados por esses autores também estão presentes nos resultados encontrados neste

trabalho. De maneira geral, são encontradas na literatura pesquisas que buscam a quantificação e identificação de casearinas, casearvestrinas e caseargrewiinas. No presente estudo, ainda não foi realizada a identificação desses compostos devido à dificuldade de purificação do extrato. Além disso, nas condições de extração ESC 100 bar/40 °C, ESC 100 bar/50 °C, ESC 100 bar/60 °C, ESC 200 bar/40 °C e ESC 300 bar/60 °C foram encontrados cristais nos extratos de *C. sylvestris*, estando estes em processo de identificação.

Nos extratos de *C. sylvestris* obtidos foram identificados sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$ ou $(C_5H_8)_n$), que são compostos conhecidos por suas atividades anti-inflamatória, citotóxica e antitumoral (CARVALHO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2009). Dentre os compostos identificados, os principais sesquiterpenos encontrados nos extratos de *C. sylvestris* foram o β -cariofileno, γ -Cariofileno, óxido de β -cariofileno, α -humuleno/ α -cariofileno, D-germacreno, δ -cadineno, valenceno, biciclogermacreno, β -cubebeno, β -elemeno, α -gurjuneno, γ -gurjuneno, aromadendreno, aloaromadendreno, α -selineno, γ -elemeno, *cis*- β -farneseno, *trans*- β -farneseno, 1(5)-guaaien-11-ol, cedreno e α -himachaleno. Além desses componentes, também foram identificados sesquiterpenos oxigenados, destacando-se o *cis*-nerolidol, (-)-espatulenol, (+)-espatulenol, β -eudesmol, τ -cadinol, guaiol, bulnesol, cubenol, elemol, epóxido de isoaromadendreno, epóxido de α -humuleno II, epóxido de *trans*-Z- α -bisaboleno e *trans*-longipinocarveol.

Dentre os componentes identificados (Quadro 7.1), o fitol pode ser considerando como um dos principais compostos por ser encontrado em todos os extratos obtidos. Além do fitol, o (-)-espatulenol também aparece em todos os extratos, exceto para a condição ESC 200 bar/40 °C, onde é encontrado o seu isômero (+)-espatulenol. Outro importante componente identificado, devido à sua importância nutricional, foi a vitamina E, encontrada nos extratos obtidos a 200 bar/50 °C + 8 % ETOAC e 300 bar/50 °C + 5 % ETOH.

O fitol, pertencente aos diterpenos ($C_{20}H_{32}$) oxigenados, é um componente da clorofila das plantas. Pode ser utilizado como precursor para a fabricação sintética de vitamina E e vitamina K₁. Além disso,

pode ser empregado na indústria química e farmacêutica como agente de fragrância (DAINES et al., 2003; NETSCHER, 2007; MCGINTY; LETIZIA; API, 2010). Além do fitol, foi identificado nos extratos de *C. sylvestris* o 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, ou *trans*-fitol, que possuiu atividade antiproliferativa e comprovada atividade antitumoral (ARAÚJO et al., 2009).

De acordo com a literatura, os componentes (-)-espatulenol e (+)-espatulenol apresentam atividades biológicas importantes, como propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER et al., 2004).

A vitamina E é um diterpeno que ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais, grãos de cereais e seus respectivos óleos, além de estar presente também no fígado de animais marinhos (MOURÃO et al., 2005). A vitamina E é um antioxidante potente e apresenta um papel fundamental na proteção do organismo contra efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio. A carência dessa vitamina causa dificuldades visuais, alterações neurológicas e problemas de no sistema reprodutor (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O triterpeno ($C_{30}H_{48}$) oxigenado 2,3-oxidosqualeno é um intermediário na síntese de lanosterol e cicloartenol, precursores do esterol da membrana celular (ABE, 2007). Outro componente importante encontrado em algumas amostras analisadas foi o β -sitosterol, um composto indicado para o tratamento de muitas doenças como aterosclerose, hiperplasia benigna de próstata e câncer de cólon (NAIR; KANFER; HOOGMARTENS, 2006; YOKOTA et al., 2006). O β -sitosterol é um fitoesterol ($C_{29}H_{50}O$), ou esterol de plantas, proveniente do estigmasterol, um composto triterpênico. Sozinho ou em combinações com outros fitoesteróis semelhantes, o β -sitosterol reduz os níveis de colesterol do sangue e inibe sua absorção no intestino (MATSUOKA, 2008).

O sesquiterpeno guaiol é utilizado no tratamento de tosse, artrite e sífilis. O eudesmol é utilizado como fixador na perfumaria, enquanto o *cis*- β -farneseno é utilizado como agente de fragrância e

flavorizante, assim como o cubenol e o hexa-hidrofarneasil acetona. Também O sesquiterpeno valenceno, comumente encontrado em pequenas concentrações em plantas cítricas, é empregado como ingrediente de aromas e fragrâncias, especialmente para a indústria de bebidas (AVÉ; GREGORY; TINGEY, 1987; FERNANDES, 2009). O sesquiterpeno α -himachaleno é encontrado em óleos essenciais diversas árvores, sendo um composto utilizado na perfumaria, assim como o α -selineno (ARAÚJO et al., 2005; HO; CHEIN, 2006).

O composto 1(5)-guaien-11-ol, outro sesquiterpeno encontrado, apresenta atividade anti-inflamatória (MENDES et al., 2013). O biciclogermacreno também possui importante atividade anti-inflamatória, além de propriedades antibacterianas (GÜNTZEL, 2008).

Compostos como óxido de β -cariofileno e cubenol podem estar relacionados com atividade antimicrobiana e antifúngica (ZHANG et al., 2009; AI et al., 2014). O óxido de β -cariofileno também possui atividade anticarcinogênica, sendo de grande importância para a indústria farmacêutica (SANTOS et al., 2012). Da mesma forma, o germacreno-D é capaz de inibir o crescimento de alguns fungos e bactérias em ensaios *in vitro* (MACHADO et al., 2012).

Segundo Zhang et al. (2008), os óxidos de ledeno I e II apresentam fortes atividades antibacteriana e antioxidante (SUN et al., 2010). O elemol também possui propriedades antimicrobianas. Quando este composto está presente em quantidades substanciais (> 20 %) em plantas, essas são utilizadas na medicina popular como agente antimalária e como larvicida para mosquitos (MEVY et al., 2007).

O epóxido de *trans-Z*- α -bisaboleno é comumente encontrado como constituinte de feromônios sexuais de insetos (MORAES et al., 2008), enquanto que o *trans*- β -farneseno atua como inseticida natural em muitas espécies de plantas. Outro epóxido encontrado nos extratos de *C. sylvestris*, o epóxido de α -humuleno II, é um composto comumente proveniente da degradação do humuleno, contribuindo, por exemplo, para o sabor e aroma da cerveja (AVÉ; GREGORY; TINGEY, 1987).

Os sesquiterpenos β -elemeno e γ -elemeno, identificados nos extratos de *C. sylvestris*, são isômeros estruturais encontrados em uma grande variedade de plantas. Esses componentes contribuem para o aroma floral de algumas plantas e são utilizados como feromônios por alguns insetos. Experimentos *in vitro* demonstraram que o β -elemeno possui efeito antiproliferativo em algumas células tumorais, indicando a possibilidade de seu uso na quimioterapia (YAO et al., 2008; ZHU et al., 2011).

O α -cariofileno (ou α -humuleno), de acordo com a literatura, apresenta atividade citotóxica contra células tumorais A-549 (carcinoma pulmonar), HeLa (carcinoma cervical) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon) (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007). De forma geral, α , β e γ -cariofileno apresentam propriedades antiedêmica, fagorrepelente, antiinflamatória, antitumoral, bactericida, insetífuga e antialérgica (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; HECK; VIANA; VICENTINI, 2012).

De acordo com o estudo de Tsuneki et al. (2005), o sesquiterpeno oxigenado β -eudesmol apresenta atividade antiangiogênica em cultura de células endoteliais do cérebro e periféricas. Além disso, segundo Miyazawa (1996), o β -eudesmol possui atividade antimutagênica (SZÖKE et al, 2004). O *cis*-nerolidol, um sesquiterpeno presente nos óleos essenciais de diversas plantas, é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como um agente flavorizante utilizado em alimentos, além de apresentar propriedade antineoplásica (ARRUDA; D'ALEXANDRI; ULIANA, 2005).

O α -gurjuneno, conforme indica a literatura, possui efeito antimicrobiano contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates* e *Fusarium oxysporum* em diferentes concentrações (KAKARLA et al., 2014). Já o γ -gurjuneno, juntamente com outros componentes do extrato de *Grangea maderaspatana* (L.) Poir., apresenta propriedades antimicrobianas frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptomyces candidus* e *Candida albicans* (SINGH et al.; 2013).

De acordo com a literatura, compostos como o β -cubebeno e o γ -cariofileno apresentam atividades antiácaros e antimicrobiana, respectivamente (PONTES, 2006; JABER; WAHID; JASIM, 2012). Compostos como β -himachaleno, τ -cadinol, tetratetracontano, β -farneseno podem apresentar atividade antifúngica (SIDDIQUI et al., 2013). De acordo com Claeson et al. (1992), o τ -Cadinol possui propriedades antimicrobianas em *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton mentagrophytes*, apresentando maior efeito bactericida do que bacteriostático. O δ -cadineno é descrito pela literatura como anticarcinogênico e bactericida (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; HECK; VIANA; VICENTINI, 2012).

Além dos terpenos, foram identificados alcanos nos extratos de *C. sylvestris*, como eicosano ($C_{20}H_{42}$), dotriacontano ($C_{32}H_{66}$), hentriacontano ($C_{31}H_{64}$), hexatriacontano ($C_{36}H_{74}$), nonadecano ($C_{19}H_{40}$), octacosano ($C_{28}H_{58}$), tetracosano ($C_{24}H_{50}$) e tetratetracontano ($C_{44}H_{90}$), presentes naturalmente nas ceras e cutículas das plantas (OLIVEIRA; PRATES, 2000; CÔRTEZ et al., 2005). Desses, os que contêm mais de 20 átomos de carbono são, também, chamados de parafinas (MORRISON; BOYD, 1972).

Também foram encontrados como constituintes dos extratos de *C. sylvestris* ácidos graxos saturados como o ácido esteárico (C18:0) e o ácido n-hexadecanóico ou ácido palmítico (C16:0), além de ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3). Também foi identificado nas amostras de extratos um éster do ácido palmítico, o etil palmitato ou etil hexadecanoato ($C_{18}H_{36}O_2$).

Embora cada um dos componentes anteriormente listados apresente importantes propriedades biológicas em sua forma isolada, o efeito de sinergia entre os compostos majoritários e minoritários nos extratos de *C. sylvestris* deve ser considerada para a atividade biológica.

Quadro 7.1 - Principais compostos identificados nos extratos de *C. sylvestris* avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Componente	Condições de extração																
	100 bar			200 bar			300 bar			200bar/50°C + ETOAC			200bar/50°C + ETOH			300 bar/50°C + 5 %	
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	2%	5%	8%	2%	5%	8%	ETOAC	ETOH
(-)-Espatuleno	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(-)-β-Elemeno	x				x											x	
(+)-Espatuleno				x													
1(5)-Guaien-11-ol	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno						x											
1-Etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-ciclohexano				x				x									x
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicosá-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano														x			
2,3-Oxidosqualeno	x						x								x		
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol			x			x											
6-Isoprenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol																	

Ácido esteárico																	x			
Ácido linoleico																	x			
Ácido linolênico																	x			
Ácido n-Hexadecanoico		x	x				x			x	x				x	x	x	x		
Aloaromadendreno						x				x					x					
Aromadendreno										x										
Biciclogermacreno	x																	x		
Bulnesol	x	x																		
Cedreno					x															
cis-Nerolidol	x	x															x	x		
cis-β-Farneseno					x	x			x	x	x	x						x		
Cubenol	x																			
D-Germacreno					x	x				x	x							x	x	
Dotriacontano					x															
Eicosano																			x	
Elemol																				
Epóxido de isoaromadendreno																			x	
Epóxido de <i>trans</i> -Z-α-Bisaboleno																				
Epóxido de α-Humuleno II																				
Etil hexadecanoato/Etil palmitato																				x
Fitol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Guaiol																		x		
Hentriacontano								x											x	
Hexa-hidrofarnesil acetona		x																		
Hexatriacontano													x							
Nonadecano																				
Octacosano		x							x										x	
Óxido de Ledeno II																				
Óxido de β -Cariofileno	x	x						x		x	x			x	x	x				x
Tetracosano								x					x							
Tetratetracontano		x	x																	x
<i>trans</i> -Longipinocarveol																				
<i>trans</i> - β -Farneseno	x	x		x			x			x			x			x	x			x
Valenceno	x	x								x									x	
Vitamina E														x						x
α -Cariofileno/ α -Humuleno	x	x		x	x			x												x
α -Gurjuneno	x																		x	
α -Himachaleno																				
α -Selineno												x								x
β -Cariofileno	x	x			x			x											x	x
β -Cubebeno	x							x												
β -Elemeno		x																		
β -Eudesmol		x																		
β -Sitosterol														x					x	x

γ -Gurjuneno				x					x								
γ-Cariofileno																	
γ-Elemeno	x			x	x				x								x
δ-Cadineno																	x
τ-Cadinol					x												

Condições de extração: 1A: 100 bar/ 40 °C; 1B: 100 bar/ 50 °C; 1C: 100 bar/ 60 °C; 2A: 200 bar/ 40 °C; 2B: 200 bar/ 50 °C; 2C: 200 bar/ 60 °C; 3A: 300 bar/ 40 °C; 3B: 300 bar/ 50 °C; 3C: 300 bar/ 60 °C; 4A: 200 bar/ 50 °C + 2 % ETOAC; 4B: 200 bar/ 50 °C + 5 % ETOAC; 4C: 200 bar/ 50 °C + 8 % ETOAC; 5A: 200 bar/ 50 °C + 2 % ETOH; 5B: 200 bar/ 50 °C + 5 % ETOH; 5C: 200 bar/ 50 °C + 8 % ETOH; 6A: 300 bar/ 50 °C + 5 % ETOAC; 6B: 300 bar/ 50 °C + 5 % ETOH; 7A: MAC-CLF; 7B: MAC-DCM; 7C: MAC-ETOAC; 7D: MAC-ETOH; 7E: MAC-HX; 8A: SOX-CLF; 8B: SOX-DCM; 8C: SOX-ETOAC; 8D: SOX-ETOH; 8E: SOX-HX.

Quadro 7.1(continuação) - Principais compostos identificados nos extratos de *C. sylvestris* avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Componente	Condições de extração									
	MACERAÇÃO					SOXHLET				
	CLF	DCM	ETOAC	ETOH	HX	CLF	DCM	ETOAC	ETOH	HX
(-)-Espatuleno	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
(-)-β-Elemeno			x		x					
(+)-Espatuleno										
1(5)-Guaiien-11-ol			x		x	x		x	x	
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metile-til)-naftaleno	x									

1-Etenil-1-metil-2,4-bis (1-metiletenil)-ciclohe- xano										
2,2-Dimetil-3-(3,7,16, 20-tetrametil-heneicosa- 3,7,11,15,19-pentaenil)- oxirano		<i>x</i>	<i>x</i>			<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>		
2,3-Oxidosqualeno	<i>x</i>				<i>x</i>					
3,7,11,15-Tetrametil-2- hexadecen-1-ol			<i>x</i>							
6-Isoprenil-4,8a-dime- til-1,2,3,5,6,7,8,8a-octa- hidro-naftalen-2-ol					<i>x</i>	<i>x</i>				
Ácido esteárico										
Ácido linoleico										
Ácido linolênico										
Ácido n-Hexadecanóico	<i>x</i>		<i>x</i>		<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
Aloaromadendreno	<i>x</i>									
Aromadendreno										
Biciclogermacreno										
Bulnesol										
Cedreno										
<i>cis</i> -Nerolidol										
<i>cis</i> - β -Farneseno							<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	
Cubenol										
D-Germacreno			<i>x</i>		<i>x</i>					

Dotriacontano										
Eicosano										
Elemol	<i>x</i>									
Epóxido de isoaromadrendreno										
Epóxido de <i>trans-Z-α-Bisaboleno</i>			<i>x</i>							
Epóxido de α -Humuleno II	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>		<i>x</i>					<i>x</i>
Etil hexadecanoato/Etil palmitato				<i>x</i>						
Fitol	<i>x</i>									
Guaiol										
Hentriacontano										
Hexa-hidrofarnesil acetona						<i>x</i>				
Hexatriacontano										
Nonadecano					<i>x</i>					
Octacosano										
Óxido de Ledeno II					<i>x</i>					
Óxido de β -Cariofileno	<i>x</i>		<i>x</i>							
Tetracosano					<i>x</i>	<i>x</i>				<i>x</i>
Tetratetracontano										<i>x</i>
<i>trans</i> -Longipinocarveol			<i>x</i>							
<i>trans</i> - β -Farneseno	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>		<i>x</i>					

Valenceno										
Vitamina E										
α -Cariofileno/ α -Humuleno	x	x	x		x		x			
α -Gurjuneno			x		x					
α -Himachaleno			x							
α -Selineno					x		x			
β -Cariofileno		x			x					
β -Cubebeno										
β -Elemeno										
β -Eudesmol										
β -Sitosterol										x
γ -Gurjuneno										
γ -Cariofileno	x		x							
γ -Elemeno										
δ -Cadineno										
τ -Cadinol										

Condições de extração: 1A: 100 bar/ 40 °C; 1B: 100 bar/ 50 °C; 1C: 100 bar/ 60 °C; 2A: 200 bar/ 40 °C; 2B: 200 bar/ 50 °C; 2C: 200 bar/ 60 °C; 3A: 300 bar/ 40 °C; 3B: 300 bar/ 50 °C; 3C: 300 bar/ 60 °C; 4A: 200 bar/ 50 °C + 2 % ETOAC; 4B: 200 bar/ 50 °C + 5 % ETOAC; 4C: 200 bar/ 50 °C + 8 % ETOAC; 5A: 200 bar/ 50 °C + 2 % ETOH; 5B: 200 bar/ 50 °C + 5 % ETOH; 5C: 200 bar/ 50 °C + 8 % ETOH; 6A: 300 bar/ 50 °C + 5 % ETOAC; 6B: 300 bar/ 50 °C + 5 % ETOH; 7A: MAC-CLF; 7B: MAC-DCM; 7C: MAC-ETOAC; 7D: MAC-ETOH; 7E: MAC-HX; 8A: SOX-CLF; 8B: SOX-DCM; 8C: SOX-ETOAC; 8D: SOX-ETOH; 8E: SOX-HX.

CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES

O uso de *Casearia sylvestris* como matéria-prima para a obtenção de extratos bioativos é promissor devido à presença de compostos fenólicos e antioxidantes nos extratos obtidos. Os melhores resultados de rendimento para ESC com CO₂ puro foram obtidos nas condições a 200 bar/60 °C, 300 bar/50 °C e 300 bar/60 °C e para a condição de 200 bar/50 °C adicionada de 2 % e 8 % de etanol como cossolvente, onde o rendimento da extração aumentou aproximadamente 20 % para ambas as concentrações, enquanto que para as extrações a baixa pressão os melhores rendimentos foram obtidos por Soxhlet e maceração com etanol, seguido de acetato de etila.

Os diferentes métodos de ação antioxidante mostraram a importância da ESC na obtenção de extratos bioativos de *C. sylvestris*. Nos ensaios realizados para a determinação do teor de fenólicos total os extratos de *C. sylvestris* que apresentaram os resultados mais expressivos foram os obtidos nas extrações à baixa pressão por Soxhlet e maceração utilizando etanol como solvente, seguidos pelas outras condições à baixa pressão e pelas condições de ESC adicionadas de cossolventes, 300 bar/50 °C e 8 % de etanol e 300 bar/50 °C e 5 % de acetato de etila, sugerindo maior polaridade dos compostos fenólicos. No ensaio do radical DPPH as frações obtidas nas extrações em Soxhlet, com etanol e acetato de etila, e maceração, com etanol e acetato de etila, apresentaram bom poder antioxidante, assim como as extrações supercríticas adicionadas de cossolvente, 200 bar/50 °C e 11 % de etanol e 300 bar/50 °C e 8 % de etanol. Quando o potencial antioxidante foi avaliado pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoleico todas as condições de extração apresentaram resultados bastante semelhantes entre si, tanto para as extrações a baixa pressão e extração supercrítica, com e sem adição de cossolventes. Merecem destaque os extratos obtidos nas condições de ESC 200 bar/50 °C e 2 % de acetato de etila, 300 bar/50 °C e 5 % de acetato de etila e 300 bar/50 °C, e para as extrações em Soxhlet com acetato de etila, clorofórmio e etanol. Para o método ABTS, as melhores capacidades antioxidantes

foram obtidas para as condições obtidas em Soxhlet e maceração com etanol e Soxhlet com acetato de etila. Para as condições de ESC, as condições de extração a 300 bar/50 °C e 8 % de etanol e 300 bar/ 40 °C e 8 % de etanol destacaram-se pelos melhores resultados.

Em relação aos ensaios de efeito antiobesidade a atividades hipolipemiante e hipoglicemiante *in vivo*, os extratos obtidos nas condições de ESC 300 bar/50 °C e 5 % de acetato de etila e ESC 300 bar/50 °C e 5 % de etanol apresentaram as melhores reduções de ganho de peso para os camundongos tratados com dieta hipercalórica, em relação aos controles negativo e positivo. O efeito hipolipemiante mais significativo para a redução dos níveis de colesterol foi obtido para a condição Soxhlet com acetato de etila e etanol, enquanto que para a maior redução dos níveis de triglicéridios foi obtida também para Soxhlet com acetato de etila e para ESC 300 bar/50 °C e 5 % de etanol. A redução dos níveis de glicose teve seus melhores resultados para as condições de ESC 300 bar/50 °C e 300 bar/50 °C e 5 % de etanol. Estes resultados indicam o potencial uso da *Casearia sylvestris* como agente antiobesidade, hipolipemiante e hipoglicemiante.

A determinação do perfil químico dos extratos de *C. sylvestris* identificou compostos importantes como diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos, responsáveis pelas propriedades terapêuticas desses extratos. Entre os componentes identificados estão o (-)-espatulenol, (+)-espatulenol, *cis*- β -farneseno, *trans*- β -farneseno, D-germacreno, fitol, α -cariofileno/ α -humuleno, β -cariofileno, β -sitosterol, γ -elemeno e vitamina E. Normalmente, a literatura relata a quantificação e identificação de casearinas, casearvestrinas e caseargrewiinas. Nesse trabalho, tais componentes não foram identificados. Maiores avaliações são necessárias para a identificação e quantificação desses e de outros compostos com atividade biológica presentes nos extratos, em especial os diterpenos clerodânicos, assim como verificar a contribuição individual de cada composto na atividade biológica dos extratos. Também, é importante salientar que a atividade biológica de um extrato pode ser atribuída a possíveis efeitos de sinergismo entre os

componentes. Estes aspectos aqui relatados colocam este estudo como um importante ponto inicial para análise desta matéria-prima vegetal.

O comportamento de fases do sistema extrato de *C. sylvestris* + etanol + CO₂ apresentou transições de fases do tipo líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-líquido-vapor, entre outras, em pressões de até 152 bar. Os tipos de transições de fases encontrados refletem a complexidade do sistema estudado, relacionada à composição química dos extratos de *C. sylvestris*. Também foram realizados experimentos de equilíbrio de fases dos sistemas contendo Pluronic F127 (extrato de *C. sylvestris* + etanol + Pluronic F127 + CO₂ e extrato de *C. sylvestris* + acetato de etila + Pluronic F127 + CO₂). A determinação desses equilíbrios foi de fundamental importância para a definição das condições de temperatura e pressão para a precipitação/encapsulamento pelo processo do antissolvente supercrítico (SAS).

O processo SAS aplicado foi eficiente no encapsulamento de extratos de *C. sylvestris* em Pluronic F127, produzindo partículas coprecipitadas em todas as condições testadas, exceto para a condição a 80 bar e 45 °C, onde não ocorreu o encapsulamento. Nessa condição foi obtida a precipitação de uma mistura de partículas segregadas de extrato e polímero, possivelmente devido à formação de duas fases líquidas: uma rica em extrato de *C. sylvestris* e outra rica em Pluronic F127 no precipitador. Todas as condições de precipitação testadas produziram partículas com tamanho estimado dentro da faixa micrométrica.

Um estudo mais detalhado sobre a precipitação de extratos de *C. sylvestris* em Pluronic F127, incluindo a eficiência de encapsulamento, *loading* e o efeito da variação de parâmetros do processo SAS se faz necessário para definição de outras condições adequadas para a produção de partículas coprecipitadas utilizando fluidos supercríticos.

CAPÍTULO 9: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões relevantes para a continuidade deste trabalho podem ser destacados os seguintes itens:

- a)* Identificar as casearinas, casearvestrinas e caseargrewiinas nos extratos de *C. sylvestris*;
- b)* Identificação de flavonoides por HPLC;
- c)* Determinar a solubilidade experimental do extrato de *C. sylvestris*;
- d)* Determinar o equilíbrio de fases em outras condições experimentais, variando-se as razões extrato:solvente orgânico e polímero:solvente orgânico;
- e)* Determinar o comportamento de fases utilizando outros polímeros;
- f)* Avaliar outras condições temperatura, pressão, vazão de antissolvente e de solução orgânica no processo de precipitação por SAS;
- g)* Determinar a eficiência de encapsulamento do processo SAS para o extrato de *C. sylvestris* e Pluronic F127;
- h)* Utilizar o processo SFEE de precipitação, como o método a ser comparado com a metodologia SAS;
- i)* Avaliar a estabilidade biológica das partículas obtidas e realizar ensaios de liberação;
- j)* Avaliar o efeito antiobesidade, atividade hipolipemiante e hipoglicemiante das partículas obtidas, bem como determinar as atividades antioxidantes e teor de fenólicos total;

- k)** Verificar os efeitos citotóxico e antitumoral dos extratos de *C. sylvestris* sem os diterpenos clerodânicos para avaliar o sinergismo das substâncias presentes no extrato;
- l)** Investigar o efeito do fitol e espatulenol em termos de atividade biológica.

CAPÍTULO 10: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. **Natural Products Reports**, v. 24, p.1311-1331, 2007.

ABELL, L. L.; LEVY, E. B.; BRODIE, B. B.; Kendall, F. E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 357-366, 1952.

ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *C. sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, p. 641-676, 1973.

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-11, 2004.

AI, H. W.; KANG, Y. X.; CAO, Y.; ZHENG, C. J. Antifungal properties and chemical analysis of essential oil from *Vitex negundo* seeds. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 541-548, 2014.

ALMEIDA, P. P. DE; FERREIRA, S. R. S. **Crossover pressure for supercritical fluid extraction of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil with pure CO₂ and CO₂ plus ethanol.** In: Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA). Foz do Iguaçu, Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2007.

ANDRADE, K. S. **Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*Coffea arabica* L.)** Florianópolis: UFSC, 2011. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **CEPPA**, v. 24(2), p. 319-336, 2006.

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

A.O.A.C. **Association of Official Agricultural Chemists - Official Methods of Analysis**. 18th ed., Washington. D.C., 2005.

ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; PASTORE JR., F. **Plantas da Amazônia para produção cosmética**. Brasília, 2005. 244 p.

ARAÚJO, F. C. V.; MARQUES, F. G.; SILVA, C. C.; SANTIN, S. M. O. Terpenos isolados de *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (RUBIACEAE). **Química Nova**, v.32, 11760-1763, 2009.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-21, 2000.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p.5736-5742, 2001.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, A. M. K.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1679-1687, 2005.

ATOUI, A, K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89(1), p. 27-36, 2005.

AVÉ, D. A.; GREGORY, P.; TINGEY, W. M. Aphid repellent sesquiterpenes in glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and *S. tuberosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 44, p. 131-138, 1987.

AVERILL, B.; ELDREDGE, P. **Chemistry: Principles, Patterns, and Applications**. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2007. 1233p.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99 (1), p. 191-203, 2006.

- BANDEIRA, K. F.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Optimization of conditions for the extraction of casearins from *Casearia sylvestris* using response surface methodology. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p.168–175, 2006.
- BARWICK, V.J. Strategies for solvent selection: a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16 (6), p. 293–309, 1997.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *C. sylvestris* –I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.
- BE-JEN, W.; YEN-HUI, L.; ZER-RAN, Y. Supercritical fluid extractive fractionation: study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v.86 (2), p. 237-43, 2004.
- BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 132-140, 2010.
- BERNARDO-GIL, M, G.; RIBEIRO, M, A.; ESQUÍVEL, M. M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 73, p.14-21, 2002.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130,1999.
- BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA D. H.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71 (2), p. 181-187, 1999.

BORGES, L. L.; LUCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7(12), p. 1-20, 2011.

BORGES, M. H.; SOARES, M. A.; RODRIGUES, V. M.; O-ESCARSO, S. H. A.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; JOSE´ M. GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. A. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 127, p. 21-30, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

BRISTOW, S.; SHEKUNOV, T.; SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Analysis of the supersaturation and precipitation process with supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p.257-271, 2001.

BRUNNER, G. **Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. Darmstadt: Steinkopff, v.4, 1994. 387p.

BÜCKER, N. C. F. **Efeito antitumoral e antiangiogênico dos extratos bruto e supercrítico de *Bidens pilosa* Linné e *Casearia sylvestris* Swartz**. Florianópolis: UFSC, 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2012.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, v. 19, p. 476-482, 1973.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, p. 219-224, 1997.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. , V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-20, 2008.

CAMPOS, V. M. C. **Resposta Técnica: Óleo de casca de limão**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT, 2008.

CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. Santa Maria: UFSM, 2005. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

CAPEL, S. E.; HUNT, D.; MALMBERG, K.; PATHAK, P.; GERSTEIN, H. C. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients - A systematic overview. **Journal of the American Heart Association**, v. 32, p. 2426-2432, 2001.

CARVALHO JÚNIOR, R. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. Campinas: UNICAMP, 2004. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30(3), p. 277-284, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Cafezeiro-do-Mato - *Casearia sylvestris***, Circular Técnica, 138, Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. C. I., BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49 (6), p. 1659-1662, 1998.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; MARTÍNEZ, E. DE LA OSSA. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p.43-49, 2007.

CHASE, M. W. When in doubt, put in *Flacourtiaceae*: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin**, v. 57, p. 141-181, 2002.

CHAVES, O. M. Flora digital do Rio Grande do Sul: *Casearia sylvestris* (2012). 2012. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=8016>. Acesso em: 27 jul. 2013.

CHIAPPETA, A. D. A.; MELLO, J. F.; MACIEL, G. M. Higher plants with biological activity - Plants of Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 21, p. 43-50, 1983.

CHIASSON, H.; BÉLANGER, A.; BOSTANIAN, N.; VINCENT, C.; POLIQUIN, A. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p.167-171, 2001.

CLAESON, P.; RADSTRÖM, P.; SKÖLD, O.; NILSSON, A.; HÖGLUND, S. Bactericidal effect of the sesquiterpene T-cadinol on *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 6., p. 94-98, 1992.

COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch effect of operating conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237-241, 2002.

COCERO, M. J.; MARTÍN, Á.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p.546-555, 2009.

CORAZZA, S. R. **Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros**. SENAC: São Paulo, 2002.

CÔRTEZ, C., DAMASCENO, J. C.; FUKUMOTO, N. M.; SAKAGUTI, E. S.; SANTOS, G. T.; ALCALDE, C. R. Potencial discriminatório dos *n*-alcanos em plantas forrageiras tropicais por análises multivariadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1079-1087, 2005.

CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14 (2), p. 139-44, 1999.

DAINES, A. M.; PAYNE, R. J.; HUMPHRIES, M. E.; ABELL, A. D. The synthesis of naturally occurring Vitamin K and Vitamin K analogues. **Current Organic Chemistry**, v. 7, p. 1625-1634, 2003.

DARIVA, C. **Equilíbrio de Fases a Altas Pressões em Sistemas com Prolpropilenos. Dados Experimentais e Modelagem SAFT**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2000. Tese (Doutorado), Programa de Engenharia Química - PEQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

DE GIOANNIS, B.; GONZALEZ, A. V.; SUBRA, P. Anti-solvent and co-solvent effect of CO₂ on the solubility of griseofulvin in acetone and ethanol solutions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 49-57, 2004.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 54, p. 2441-69, 2006.

DOHRN, R.; BRUNNER, G. High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1988-1993). **Fluid Phase Equilibria**, v. 106 (1-2), p. 213-282, 1995.

DONELIAN, A. **Extração do óleo essencial de Patchouli Pogostmon cablin (blanco) benth utilizando dióxido de carbono supercrítico**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

ECKEL, R. H. Clinical practice: Nonsurgical management of obesity in adults. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1941-1950, 2008.

ELVASSORE, N.; PARTON, T.; BERTUCCO, A.; DI NOTO, V. Kinetics of particle formation in the GAS antisolvent precipitation process. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 49, p. 859-868, 2003.

ESTEVES, I. SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

ESTEVES, I.; LIMA, L. M.; SILVA, M. L.; SANTOS, L.S.; RODRIGUES, M.; SILVA, J.M. S.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. *Casearia sylvestris* Sw. essential oil activity in inflammation in rats induced by *Bothrops alternatus* venom, **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 7 (2), 2011.

EVANS, C. A. R.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds, **Trends in Plant Science**, v. 2, p.152-159, 1996.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J-J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219-226, 2004.

FALK, R.; RANDOLPH, T. W.; MEYER, J. D.; KELLY, R. M.; MANNING, M. C. Controlled release of ionic compounds from poly(L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. **Journal of Controlled Released**, v. 44, p. 77-85, 1997.

FELIPE, K. B. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*** Florianópolis: UFSC, 2010. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós- Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

FERNANDES, I. A. **Oxidação de valenceno presente na fase oleosa concentrada de laranja utilizando complexos biomiméticos.** Erechim: URI, 2009. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2009.

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do Potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.** Fortaleza: UFC, 2006. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A.

J.;BOLZANI, V. S.; ANDRÉ G. SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83 (4), p.1373-1384, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, S. R. S. **Extração com dióxido de carbono líquido subcrítico de óleo essencial de pimenta-do reino**. Campinas: UNICAMP, 1991. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1991.

FERREIRA, S. R. S. **Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino**. Campinas: UNICAMP, 1996. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-45, 1999.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-9, 2002.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Zuleika Rotschild (Trad.), Adolfo Max Rotschild, et al. (Org.). São Paulo: EDUSP, 2003.

FORNARI, R. E.; ALESSI, P.; KIKIC, I., High pressure fluid phase equilibria: Experimental methods and systems investigated. **Fluid Phase Equilibria**, v. 57, p. 1978-1987, 1990.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M. H.; TRES, M. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. O. Phase behavior and process parameters effects on the

characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 8-20, 2008a.

FRANCESCHI, E. DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.259-269, 2008b.

FRANCESCHI, E. **Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica**. Florianópolis: UFSC, 2009. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009.

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A.M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656-663, 2009.

FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 459, p. 340-342, 2009.

GIEHL, E. L. H. Flora digital do Rio Grande do Sul: *Casearia sylvestris* (2008). 2008. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=281>. Acesso em: 27 jul. 2013.

GIUGLIANO, D.; MARFELLA, R.; COPPOLA, L.; VERRAZZO, G.; ACAMPORA, R.; GIUNTA, R.; NAPPO, F.; LUCARELLI, C.; D'ONOFRIO, F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. **Circulation**, v. 95, p. 1783-1790, 1997.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Catalogação na Publicação Câmara Brasileira do Livro, v.1. 1983.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T.; Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 26, p. 401-407, 1993.

GOTTO, A. M. Introduction. **The American Journal of Cardiology**, v. 71, p. B1-B2, 1993.

GÜNTZEL, A. R. C. **Avaliação das atividades farmacológicas de extratos de *Casearia sylvestris* Sw.** Lajeado: UNIVATES, 2008. Dissertação (Mestrado). Programa De Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, 2008.

HACK, C.; LONGHI, S. J.; BOLIGON, A. A.; MURARI, A. B.; PAULESKI, D. T. Análise fitossociológica de um fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. **Ciência Rural**, v. 35, p.1083-1091, 2005.

HALLIWELL, B.; WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**, v. 313, p. 17-29, 1996.

HE, W. Z.; SUO, Q. L.; HONG, H. L.; LI, G. M.; ZHAO, X. H.; LI, C. P.; SHAN, A. Supercritical antisolvent micronization of natural carotene by the seds process through prefilming atomization. **Industrial Engineering and Chemical Research**, v. 45, p. 2108-2115, 2006.

HECK, M. C.; VIANA, L. A.; VICENTINI, V. E. P. Importância do óleo de *Copaifera* sp. (Copaíba). **Revista Saúde e Biologia**, v.7, p.82-90, 2012.

HENEZKA, M.; BALDYGA, J.; SHEKUNOV, B. Y. Particle formation by turbulent mixing with supercritical antisolvent. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 2193-2201, 2005.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417-423, 2005.

HIERRO, M. T.; SANTA-MARIA, G. Extracción con fluidos supercríticos: Aplicación a los alimentos. **Cromatografía y Tecnicas Afines**, v. 12, p. 62-8, 1991.

HO, T. L.; CHEIN, R. J. Total Synthesis of (+)- β -Himachalene. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, p. 231-239, 2006.

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **Journal of Chromatography**, v. 776, p. 233-243, 1997.

HU, Q.; HU, Y.; XU, J. Free radical-scavenging activity of Aloe Vera (*Aloe barbadensis Miller*) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 91, p. 85-90, 2005.

HUANG, J. W.; CHEN, W. J.; LIAO, S. K.; YANG, C. Y.; SONG-SHU LIN, S. S.; WU, C. C. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in a carrier system of Pluronic F127 and interpore. **Chang Gung Medical Journal**, v. 29, p. 363-372, 2006.

HUNTER, M. S.; CORLEY, D. G.; CARRON, C. P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B. F.; DURLEY, R. C.; *Journal of Natural Products*, v. 60 (9), p.894-899, 1997.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. Antitumor principles from *C. sylvestris* Sw (Flarcotinaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36 (4), p. 1585-1588, 1988.

JABER, N. N.; WAHID, A. T. A.; JASIM, A. S. Antimicrobial efficacy of oregano extracts. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v.11, p. 23-31,2012.

JACQUES, R. S. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JARMER, D. J.; LENGSELD, C. S.; RANDOLPH, T. W. Manipulation of particle size distribution of poly(L-lactic acid) nanoparticles with a jet-swirl nozzle during precipitation with a compressed antisolvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, p. 317-336, 2003.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p.179-219, 2001.

- KAKARLA, L.; ALLU, P. R.; RAMA, C.; BOTLAGUNTA, M. A review on biological and chemical properties of *Cyperus* species. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, p. 1142-1155, 2014.
- KALOGIANNIS, C. G.; MICHAILOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of amoxicillin in poly(L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial Engineering and Chemical Research**, v. 45, p. 8738-8743, 2006.
- KALT, W.; RYAN, D. A. J.; DUY, J. C.; PRIOR, R. L.; EHLENFELDT, M. K.; VANDER KLOET, S. P. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity among genotypes of high bush and low bush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p. 4761-4767, 2001.
- KANG, H. J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M. W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 614-620, 2006.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36(7), p. 703-725, 2001.
- KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. **Phytochemistry**, v.29 (11), p. 3591-3595, 1990.
- KHATTAK, S. F.; BHATIA, S. R.; ROBERTS, S. C. Pluronic F127 as a cell encapsulation material: utilization of membrane-stabilizing agents. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 974-983, 2005.
- KING, M. B. **Phase equilibria in mixtures**. Pergamon Press, 1969.
- KIRAN, E.; LIU, K.; RAMSDELL, K. Morphological changes in poly([epsilon]-caprolactone) in dense carbon dioxide. **Polymer**, v. 49, p. 1853-1859, 2008.
- KITZBERGER, C. S. G. **Obtenção de extrato de cogulemo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a alta pressão**. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35-43, 2009.

KNOWLES, D. E.; RICHTER, B. E.; WYGANT, M. B.; NIXON, L.; ANDERSEN, M. R. Supercritical fluid chromatography: A new technique for Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). **Journal AOAC**, v. 71(3), p.451-7, 1988.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LANZA, M. **Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão**. Erechim: URI, 2004. Dissertação (Mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2004.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, p. 731-8, 2004.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, p.115.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92(2), p. 201-8, 2004.

LUNA, B.; FEINGLOS, M. N. Drug-induced hyperglycemia. **The Journal of American Medical Association**, v. 286, p. 1945-1948, 2001.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22(1), p. 41-7, 2003.

LUTERMANN, C.; WILLEMS, E.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Effects on various binary and ternary supercritical phases on the extraction of

polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Journal of Chromatography A**, v. 816, p. 201-211, 1998.

LUZ, S. F. B.; SATO, M. E. O.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. Parâmetros para o controle da qualidade de folhas de *Casearia sylvestris* SW.- Guaçatonga. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1-11, 1998.

MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of *Sastsuma mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5682-90, 2008.

MACHADO ,R. R. P.; VALENTE JÚNIOR, W.; LESCHE, B.; COIMBRA, E. S.; SOUZA, N. B.; ABRAMO, C.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p.1011-1017, 2012.

MARKON, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496, 2007.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 339-350, 2008.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Campinas: UNICAMP, 2005. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-63, 2003.

MATSUOKA, K.; NAKAZAWA, T.; NAKAMURA, A.; HONDA, C.; ENDO, K.; TSUKADA, M. Study of thermodynamic parameters for

solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 154, p. 87-93, 2008.

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

MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J. S.; COLLE, T. D.; PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 1-6, 2007.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos, situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2(11), p.42-6, 1999.

McGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.S59-S63, 2010.

McHUGH, M.; PAULAITIS, M. E. Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 25, p. 326-329, 1980.

McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. **Supercritical Fluid Extraction :Principles and Practice**. Butterworth-Heinemann, 2. ed.,1994.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MENDES, S. A. C.; MANSOOR, T. A.; RODRIGUES, A.; ARMAS, J. B.; FERREIRA, M. J. U. Anti-inflammatory guaiane-type sesquiterpenes from the fruits of *Pittosporum undulatum*. **Phytochemistry**, v. 95, p. 308-314, 2013.

MENEZES, P. R.; SCHWARZ, E. A.; SANTOS, C. A. M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. Screening of Brazilian plant

extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPÍNDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 783-787, 2005.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J.; VIANO, J. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, v. 101, p. 682-685, 2007.

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêssego: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala**. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. Florianópolis: UFSC, 2012. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 10-6, 2009.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v.101(14), p. 5622-5632, 2010.

MEZZOMO, N.; PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, Á.; MARIA JOSÉ COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 342-349, 2012.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of sodium ibuprofen, in: I. Mejía, E. Sánchez, C. Pardo, J. A. García (Eds.), **Proceedings of III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids**, 01-05 April, 2013, Cartagena de Indias (Colombia), Applied Thermodynamics and Supercritical Fluids Group, School of Chemical Engineering, Universidad del Valle Cali, 2013.

MICHIELIN, E. M. Z. **Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de Cavalinha (*Equisetum arvense*)**. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. Florianópolis: UFSC, 2009. Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-138, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MIGUEL, A.; ANDRADE, J. B.; Rapid quantification of ten polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, p. 35-41, 1989.

MIGUEL, F.; MARTÍN, Á.; GAMSE, T.; COCERO, M. J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 225-235, 2006.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M. J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 1594-1602, 2008.

MIRA, B.; BLASCO, M.; BERNA, A.; SUBIRATS, S. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p. 95-104, 1999.

MIYAZAWA, N.. Antimutagenic activity of (+)β-eudesmol and Paenol from *Dioscorea japonica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.1647-1650, 1996.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6. ed. USA: John Wiley and Sons, Inc., 2005. 643p.

MORAES, M. C. B.; PAREJA, M.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. The chemical volatiles (semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, p. 489-505, 2008.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *C. sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.39 (3), p. 693-697, 1991.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 7. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. 1510p.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOSADDIK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M.; Aplicação das técnicas de picnometria de gás e de porosimetria de mercúrio à caracterização da madeira de *E. globules*. **Silva Lusitana**, v. 10(2), p. 207-216, 2002.

MOURÃO, D. M.; SALES, N. S.; COELHO, S. B.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 529-539, 2005.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural extracts using supercritical carbon dioxide**. Flórida: CRC Press LLC, 2000. 339p.

NAIR, V. D. P.; KANFER, I.; HOOGMARTENS, J. Determination of stigmasterol β -Sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 731-7, 2006.

NETSCHER, T. Synthesis of Vitamin E. **Vitamins and Hormones**. v. 76, p. 155-202, 2007.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, 5.ed., 2003, Porto Alegre/Florianópolis, Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 29-43.

OBERLIES, N. H., BURGESS, J. P., NAVARRO, H. N., PINOS, R. E., FAIRCHILD, C. G. R., PETERSON, R. W., SOEJARTO, D. D., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, D., WANI, M. C., WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *C. sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p.95-99, 2002.

OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, A. G.; SANTOS, R. A.; CSIPAK, A. R.; OLIVATO, C.; SILVA, I. C.; FREITAS, M. B.; BASSI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; S. BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.; SOARES, C. P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v. 24(6), p. 501-506, 2009.

OLIVEIRA, D. E; PRATES, E. R. Utilização dos componentes da cera das plantas, em especial os n-alcanos, em estudos de nutrição de ruminantes. **Ciência Rural**, v. 30, p. 549-557, 2000.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A. S. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. **Talanta**, v. 64, p 491-495, 2004.

PELLERIN, P. Supercritical fluid extraction of natural raw material for the flavor and perfume industry. **Perfumer and Flavorist**, v.16, p. 37-9, 1991.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III - Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 73, p. 85- 86, 1992.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial development and economic issues. In: **Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering**, 2001, Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137-150, 2006.

PHENOMENEX. **HPLC Column protection guide - Version 0113**, 2013.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 57-63, 2006.

PONTES, W. J. T. **Efeito de extratos vegetais e óleos essenciais de espécies nativas de Pernambuco sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. Recife: UFRPE, 2006. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJMIRSADEGUI, S. H. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, v.1163, p. 2-24, 2007.

PRAUSNITZ, J.; LICHTENTHALER, R.; AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria**. 3rd ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1999, 864 p.

PRIAMO, W. L.; CESARO, A. M., FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 103-109, 2010.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

RANGEL, L. P.; ABREU, L. F.; ANDRADE, A. R.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G.; PEREIRA, A. F. Effect of different extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.30-36, 2008.

RAPISARDA, P., TOMAINO, A.; LO CASCIO R.; BONINA, F.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4718-4723, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; EVANS, C. R. antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26(9-10), p. 1231-1237, 1999.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. New York: McGraw-Hill, 1987, 688 p.

REVERCHON, E. Supercritical-assisted atomization to produce micro-and/or nanoparticles of controlled size and distribution. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 2405-2411, 2002.

REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G.; FALIVENE, M. G. Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p.239-248, 2000.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; CAPUTO, G.; DELLA PORTA, G. Pilot scale micronization of amoxicillin by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, p. 1-7, 2003.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I., Supercritical antisolvent micronization of Cefonicid: thermodynamic interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, p. 207-215, 2004.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-66, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 126-138, 2007.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G.; DE MARCO, I. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 70-84, 2008.

REVERCHON, E.; TORINO, E.; DOWY, S.; BRAEUER, A.; LEIPERTZ, A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 446-458, 2010.

RIZVI, S. S. H.; DANIELS, J. A.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, v. 40(7), p. 57-64, 1986.

RODRIGUES, A. M. S.; PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. F.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314-317, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

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

ROSSO, S. R. **Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: Caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos.** Florianópolis: UFSC, 2009. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

ROTHWELL, N. J.; SAVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of feeding a “cafeteria” diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rat. **Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1515-1524, 1982.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R. M.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and antiinflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p. 203-205,1991.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p.330-337, 2007.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO; A. J. Casearin x, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; CELESTE MARIA PATTO DE ABREU, C. M. P. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, p. 604-610, 2007.

SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.224-234, 2012.

SCALIA, S.; GIUFREDDA, L.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamolile flowers and its comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 549-58, 1999.

- SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19 (1), p.73-81, 1979.
- SCHOENFELDER, T., PICH, C. T.; GEREMIAS, R.; ÁVILA, S.; DAMINELLI, E. N.; PEDROSA, R. C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 465-467, 2008.
- SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*, v.20, p. 292-300, 2010.
- SENEVIRATHNE, M.; JEON, Y.; HA, J.; KIM, S. Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity. **Journal of Food Engineering**, v.92, p. 157-63, 2009.
- SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Measurements and modeling of the phase behavior of ternary systems of interest for the GAS process: I. The system carbon dioxide + 1-propanol + salicylic acids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 195-208, 2002
- SIDDIQUI, S. A.; ISLAM, R.; ISLAM, R.; JAMAL, A. H. M.; PARVIN, T.; RAHMAN, A. Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and various extracts of *Mikania scandens* (L.) Willd. **Arabian Journal of Chemistry**, *In press*, 2013.
- SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less)**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- SILVA, F. P. T.; LIBERAL, E. M.; PESSOA, F. L. P. Uso do fluido supercrítico na extração de produtos naturais. **SBCTA**, v.31, p.48-61, 1997.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.
- SILVA, J. G. Flora digital do Rio Grande do Sul: *Casearia sylvestris* (2009) Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1824>. Acesso em: 27 jul. 2013.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 281-286, 2007.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38(1), p. 107-112, 2008a.

SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *C. sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicion**, v. 52, p. 655-666, 2008b.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *C. sylvestris* (Flarcortinaceae). **European Journal of Pharmacology**, v. 608 (1-3), p. 76-83, 2009.

SINGH, B. K.; MEHTA, J. L. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 17, p. 503-511, 2002.

SINGH, D.; MATHELA, C. S.; PANDE, V.; PANWAR, A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Grangea maderaspatana* (L.) Poir. Extract. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 1, p. 46-52, 2013.

SMITH, D., Characterization of lactose by helium pycnometer. In Stephens, K. (ed.), **The microreport: News and ideas for decision makers**, 2 nd. Quarter, v. 7 (2), Micro-meritics Instrument Corporation, USA, 1996.

SOMMERFIELD, A. J.; DEARY, I. J.; FRIER, B. M. Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2335-2340, 2004.

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

SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: II. Extraction of grape oil. **Chemical Engineering Science**. v. 49(3), p.415-20, 1994.

STRAPPE, P. M.; HAMPTON, D. W.; CACHON-GONZALEZ, B.; FAWCETT, J. W.; LEVER, A.. Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 126-133, 2005.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Revista UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SUN, Q. L.; HUA, S.; YE, J. H.; ZHENG, X. Q.; YUE-RONG LIANG, Y. R. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* ramat flower from Tongxiang County in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 3817-3821, 2010.

SZÖKE, É.; EMOKE MÁDAY, E.; GERSHENZON, J.; ALLEN, J. L.; LEMBERKOVICS, É. β -eudesmol, a new sesquiterpene component in intact and organized root of chamomile (*Chamomilla recutita*). **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, p. 229-233, 2004

TALAPATRA, S. K.; CANGULY, N. C.; GOSWAMI, S.; TALAPRA, B. **Chemical Journal of Natural products**, v. 46 (3), p.401-408, 1983.

TAVARES, W. L. F.; APOLÔNIO, A. C. M.; GOMES, R. T.; TEIXEIRA, K. I. R.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, V. R. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29 (3), p. 257-260, 2008.

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the Rainforest: Technical data report for guaçatonga**. Sage Press: Austin, TX, 2002, p. 1-4.

TOMAS-BARBERAN, F.; ESPIN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography. B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

TSUNEKI, H.; MA, E. L.; KOBAYASHI, S.; SEKIZAKI, N.; MAEKAWA, K.; SASAOKA, T.; WANG, M. W.; KIMURA, I.

Antiangiogenic activity of β -eudesmol in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 105-115, 2005.

VALE, M. G. R. **Extração de hidrocarbonetos em carvão mineral usando SFE, US e Soxhlet**. Porto Alegre: UFRGS, 1997. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Formulation of lavender essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, p.273-86, 2002.

VELICKOVIC, D. T.; NIKOLOVA, M. T.; IVANCHEVA, S. V.; STOJANOVIC, J. B.; VELIKOVIC, V. B.; Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinallis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72(1), p. 73-80, 2007.

VERDI, M. Flora digital do Rio Grande do Sul: *Casearia sylvestris* (2010). Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/flores/open_sp.php?img=4614>. Acesso em: 27 jul. 2013.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-13, 2001.

VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P. I.; LAZURCA, D.; MASON, T. J. The ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.4, p. 135-9, 1997.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Clerodane and ent-kaurane diterpene glycosyl and glycoside derivatives from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Helvetica Chimica Acta**, v.92, p. 1829-1839, 2009a.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X. C.; SMILLIE, T. A.; GUO, D. A.; KHAN, I. A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 404-407, 2009b.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Neolignans from the leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Helvetica Chimica Acta**, v.93, p. 139-146, 2010.

WANG, Y.; DAVE, R. N.; PFEFFER, R. Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 85-99, 2004.

WANG, Y.; XU-XIAO, Y., LIESHOUT, M. V., WEST, C., LUGTENBURG, J., VERHOEVEN, M. A., CREEMERS, A. F. L.; VAN-BREEMEN. M. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of betacarotene to retinol in humans. **Analytical Chemistry**. v. 72, p. 4999-5003, 2000.

WATERS, 2013. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/Supercritical-Fluid-Extraction-%28SFE%29-Systems/nav.htm?cid=10146521&locale=pt_BR>. Acesso em: 10 set. 2013.

WERLE, A. L. B.; ZANETTI, G. D.; CERON, C. S.; MANFRON, M. P. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, v. 19 (2A), p.400-402, 2009.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 206-209, 2007.

WOO, M. N.; BOK, S. H.; LEE, M. K.; KIM, H. J.; JEON, S. M.; DO, G. M.; SHIN, S. K.; HA, T. Y.; CHOI, S. Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (**S&S PWH**) in rats fed high-fat diets. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 169-178, 2008.

YAO, Y. Q.; DING, X.; JIA, Y. C.; HUANG, C. X.; WANG, Y. Z.; XU, Y. H. Anti-tumor effect of beta-elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. **Cancer Letters**, v. 264, p. 127-34, 2008.

YEO, S. D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 287-308, 2005.

YOKOTA, J.; TAKUMA, D.; HAMADA, A.; ONAGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Scavenging of reactive oxygen species by *Eribotrya japonica* seed extract. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 467-71, 2006.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE units for University education and comparative research. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, v. 1, p. 577, 2003.

ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. **Compilation of batch SFE-Models for natural products**. In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA). Foz do Iguaçu, Paraná, Caderno de Resumos do PROSCIBA, 2007.

ZHANG, C. J.; LI, H. Y.; YUN, T.; FU, Y. H.; LIU, C. M.; GONG, B.; NENG, B. J. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of Tibetan herbal medicine *Dracocephalum heterophyllum* Benth. **Natural Product Research**, v. 22, p.1-11, 2008.

ZHANG, C. J.; LIU, C. M.; YUN, T.; LI, H. Y. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Aconitum tanguticum*. **Journal of Chinese and Pharmaceutical Sciences**, v.18, p. 240-244, 2009.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-70, 2001.

ZHONG, M.; BUXING, HAN A. B.; YAN, H.; PENG, D. Effect of ethanol and n-octane on the solubility of stearic acid in the supercritical CO₂. **Fluid Phase Equilibria**, v. 134, p.175-183, 1997.

ZHU, T.; XU, Y.; DONG, B.; ZHANG, J.; WEI, Z.; XU, Y.; YAO, Y. 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, p. 405-413, 2011.

ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 25, p. 3017-3032, 2002.

CAPÍTULO 11: ANEXOS

ANEXO I: Certificado de ensaio - Determinação de nitrogênio total

ANEXO II: Certificado de ensaio - Determinação de fibra dietética total

ANEXO I: CERTIFICADO DE ENSAIO - DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 15102 / 2013 Data de Entrada: 14/10/2013

Nome do Produto: **FOLHAS DE ERVA DE BUGRE** Data de Vencimento: 05/10/2014
Data de Fabricação: 05/10/2013 Marca: NA Nº do Lote: NA
Data e Hora da Coleta: NA Nº do Lacre: NA
N. Amostras: 1 Nº. Unid. Amostras: 1 Peso/Volume: 0300 gramas
Amostrado e Coletado por: Cliente Embalagem: plástica

Fabricante: PATRÍCIA BENELLI
Solicitante: PATRÍCIA BENELLI
Responsável: PATRÍCIA BENELLI
Av./Rua: Alves de Brito, 198
Complemento: Apto: 902

CEP: 88015440
UF: SC

CNPJ/CPF: 951.622.830-53 Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Responsável pela coleta: Patrícia Benelli.
RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 18/10/2013 DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 20/10/2013

FÍSICO-QUÍMICA Analista: Patrícia Taha - CRF/SC - 1763

Protelina 13,83 g/100g (N total X 6,25) (Método: AOAC nº 991.20)*

Metodologia(s):

*ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 31 de Outubro de 2013

Signatário Autorizado
Gisele Olivo
CRF/SC 8027
Físico-Química - LABCAL

- Laboratório Credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Portaria nº 143 do 06/11/2008

Documento Nº: GA-FOR 01 e 1	Revisão 01	Data Emissão 20/08/2013	Página 1
--------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

ANEXO II: CERTIFICADO DE ENSAIO - DETERMINAÇÃO DE FIBRA DIETÉTICA TOTAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 15103/2013 Data de Entrada: 14/10/2013

Nome do Produto: **FOLHAS DE ERVA DE BUGRE**

Data de Fabricação: 05/10/2013

Data de Vencimento: 05/10/2014

Marca: NA

Nº do Lote: NA

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1

Nº Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 0300 gramas

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: plástica

Fabricante: PATRÍCIA BENELLI

Solicitante: PATRÍCIA BENELLI

Responsável: PATRÍCIA BENELLI

Av./Rua: Alves de Brito, 198

Complemento: Apto: 902

Bairro: Centro

CEP: 88015440

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 951.622.630-53

Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Responsável pela coleta: Patricia Benelli.

RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 28/10/2013

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 06/11/2013

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES

Analista: Alicia de Francisco -

Fibra Alimentar - Solúvel, Insolúvel

Fibra Insolúvel: 40,7 g/100g (AOAC 991.43)

Fibra Solúvel: 1,9 g/100g (AOAC 991.43)*

Metodologia(s):

*ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S) ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 6 de Novembro de 2013

Alicia de Francisco

Signatário Autorizado

Signatário Autorizado

Documento N° GA-FOR 01 6 1	Revisão 01	Data Emissão 20/09/2013	Página 1
-------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

CAPÍTULO 12: APÊNDICES

APÊNDICE I: Dados experimentais da curva de extração

APÊNDICE II: Curva padrão de ácido gálico

APÊNDICE III: Curva padrão de Trolox

APÊNDICE IV: Cromatogramas e compostos identificados dos extratos de *Casearia sylvestris*

APÊNDICE V: Artigo publicado no *Journal of Supercritical Fluids*

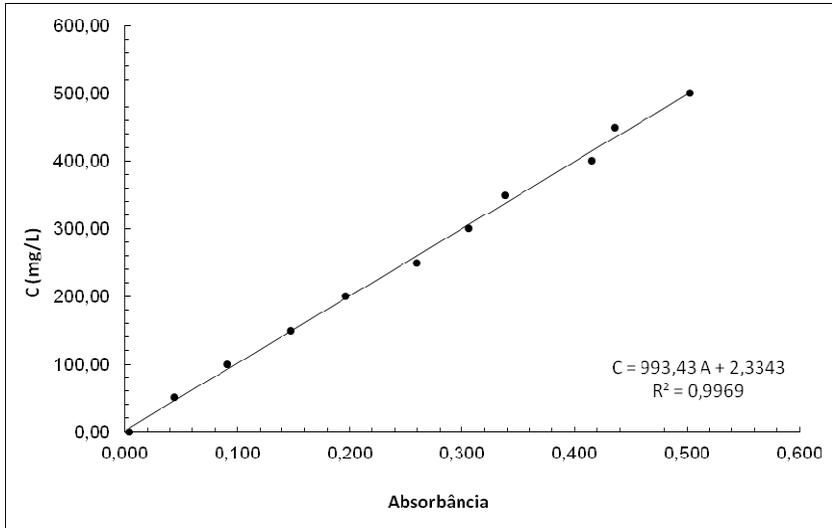
APÊNDICE I: DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

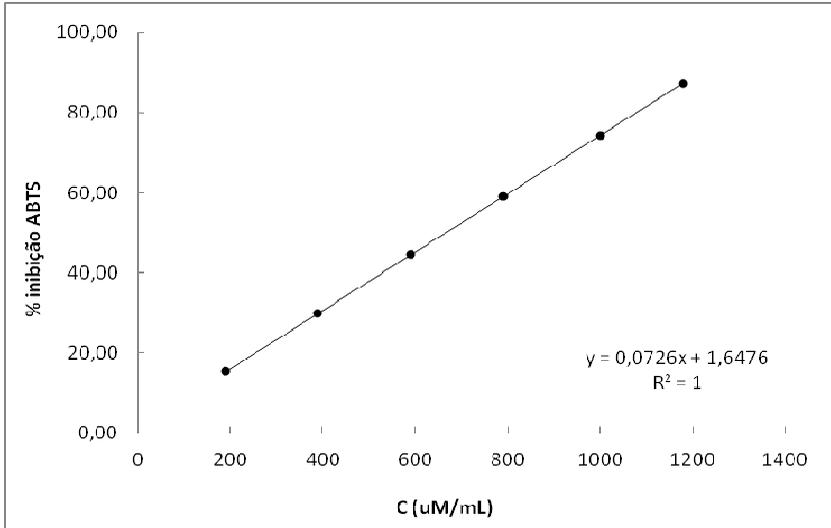
Tabela 12.1 - Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos (X_0) de extração da *C. sylvestris* do experimento cinético a 200 bar, 40 °C e 8 ± 2 g CO₂/min.

Tempo (min)	Massa (g)	Massa acumulada (g)	X₀ (%)
0	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0894	0,0894	16,2960
10	0,1055	0,1949	19,2308
15	0,0298	0,2247	5,4320
20	0,0212	0,2459	3,8644
25	0,0275	0,2734	5,0128
30	0,0161	0,2895	2,9347
40	0,0158	0,3053	2,8801
50	0,0270	0,3323	4,9216
60	0,0339	0,3662	6,1794
80	0,0205	0,3867	3,7368
100	0,0209	0,4076	3,8097
120	0,0113	0,4189	2,0598
150	0,0220	0,4409	4,0102
180	0,0242	0,4651	4,4112
210	0,0216	0,4867	3,9373
240	0,0163	0,5030	2,9712
270	0,0111	0,5141	2,0233
300	0,0072	0,5213	1,3124
330	0,0135	0,5348	2,4608
360	0,0138	0,5486	2,5155

APÊNDICE II: CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Figura 12.1 - Curva padrão de ácido gálico utilizada na determinação do teor de fenólicos total (TFT), a 765 nm.



APÊNDICE III: CURVA PADRÃO DE TROLOX**Figura 12.2** - Curva padrão de Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS, a 754 nm.

APÊNDICE IV: CROMATOGRAMAS E COMPOSTOS IDENTIFICADOS DOS EXTRATOS DE *CASEARIA SYLVESTRIS*

A1. CG-EM ESC 100 bar/40 °C

Figura A1 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 40 °C.

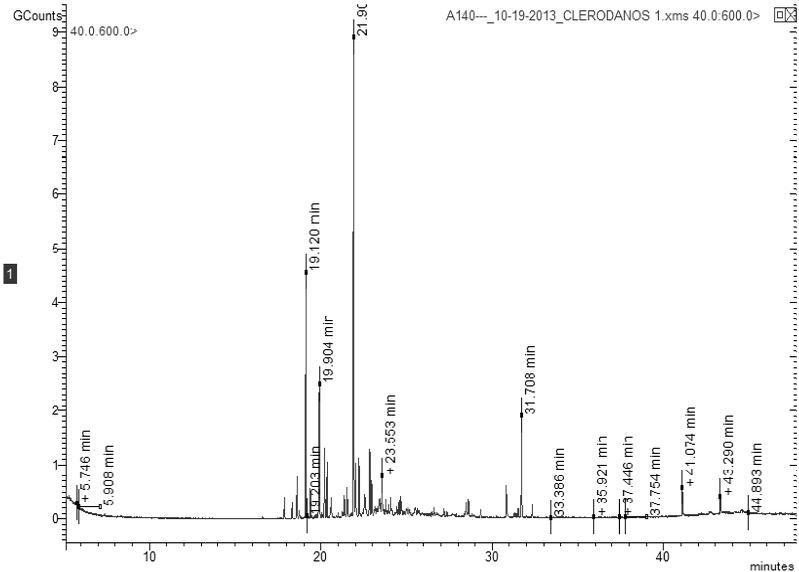


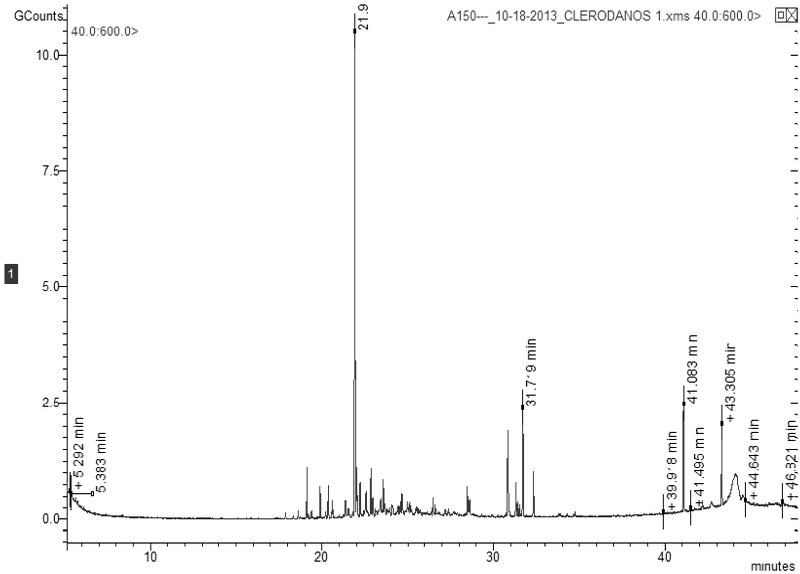
Tabela A1 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 40 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
β -Elemeno	33880-83-0	17,882	0,988
α -Gurjuneno	489-40-7	18,326	0,801
β -Cariofileno	87-44-5	18,621	2,015
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,128	11,177
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,384	1,499
β -Cubebeno	13744-15-5	19,902	8,734
Biciclogermacreno	67650-90-2	20,204	3,581
Valenceno	4630-07-3	20,364	2,956
Cubanol	21284-22-0	20,604	1,136

Apêndice IV

<i>cis</i> -Nerolidol	142-50-7	21,357	1,258
γ -Elemeno	339154-91-5	21,526	1,653
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,896 - 22,837 - 22,953	33,443
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,011	3,446
1(5)-Guaieno-11-ol	13822-35-0	22,215	2,858
Bulnesol	22451-73-6	23,539	1,739
Fitol	150-86-7	30,820 - 32,323	2,407
2,3-Oxidosqualeno	7200-26-2	31,710	5,480
Outros	-	-	14,829

A2. CG-EM ESC 100 bar/50 °C

Figura A2 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 50 °C.Tabela A2 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 50 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
β -Elemeno	33880-83-0	17,889	0,998
β -Cariofileno	87-44-5	18,627	0,495
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,124	2,568
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,387	0,458
Valenceno	4630-07-3	20,373	1,982
<i>cis</i> -Nerolidol	142-50-7	21,367	1,049
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,919	29,982
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,023	3,658
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,224	2,013
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,560	2,187
β -Eudesmol	473-15-4	23,418	1,144
Bulnesol	22451-73-6	23,560	2,015
Hexahidrofarnesil acetona	502-69-2	26,490	1,079
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,493	1,814

Apêndice IV

Fitol	150-86-7	30,837	6,521
Octacosano	630-02-4	41,083	6,362
Tetratetracontano	7098-22-8	43,294	5,366
Outros	-	-	30,309

A3. CG-EM ESC 100 bar/60 °C

Figura A3 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 60 °C.

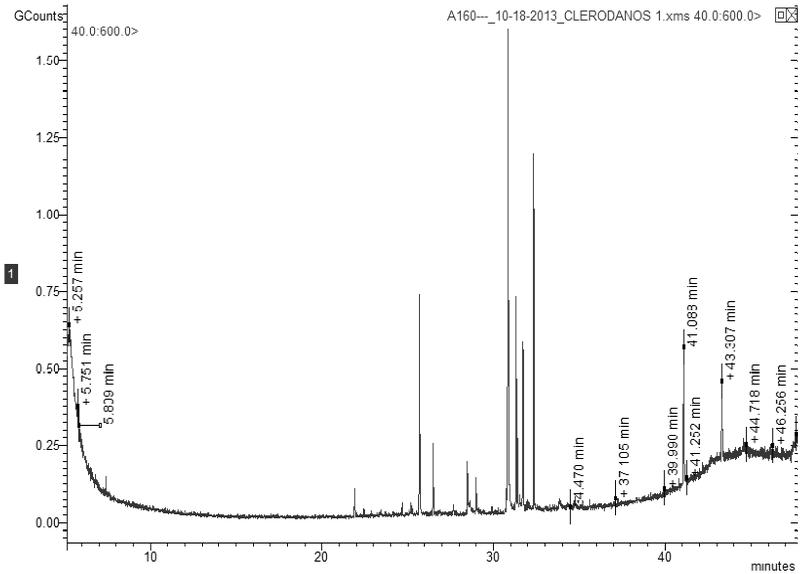


Tabela A3 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 100 bar e 60 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)-Espatulanol	77171-55-2	21,897	1,283
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,497	2,429
Etil hexadecanoato/Etil palmitato	628-97-7	28,995	1,488
Fitol	150-86-7	30,842	30,508
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	102608-53-7	32,347	15,164
Tetratetracontano	7098-22-8	41,082	7,222
Dotriacontano	544-85-4	43,301	4,664
Outros	-	-	37,242

A4. CG-EM ESC 200 bar/40 °C

Figura A4 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.

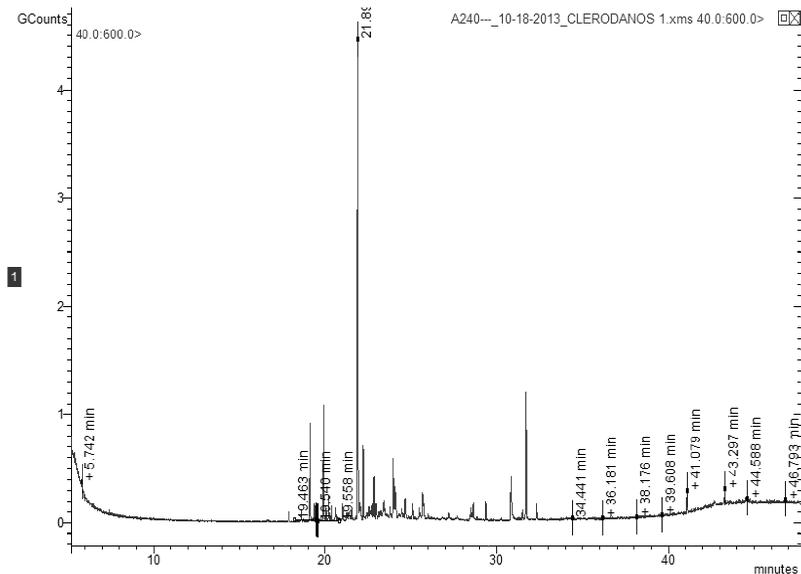


Tabela A4 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletetil)-ciclohe-xano	110823-68-2	17,884	0,618
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	18,619	0,612
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,124	5,368
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,381	1,020
D-Germacreno	23986-74-5	19,904	7,341
Cedreno	11028-42-5	20,055	0,610
γ -Elemeno	339154-91-5	20,215	1,558
γ -Gurjuneno	22567-17-5	20,365	0,907
(+)-Espatuleno	6750-60-3	21,892	31,588
1(5)-Guaiien-11-ol	13822-35-0	22,222	4,587
Fitol	150-86-7	30,846	3,441
Outros	-	-	42,35

A5. CG-EM ESC 200 bar/50 °C

Figura A5 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C.

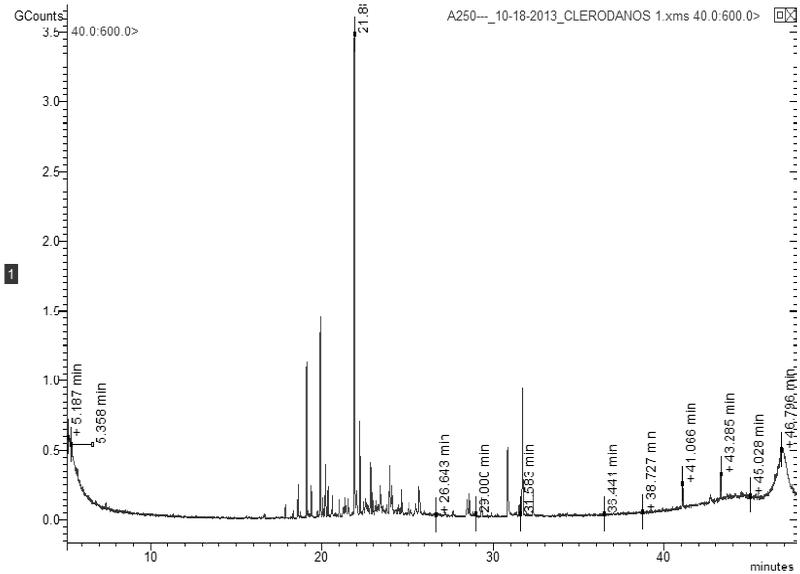


Tabela A5 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)- β -Elemeno	515-13-9	17,875	0,364
β -Cariofileno	87-44-5	18,610	0,722
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,113	3,359
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,379	0,812
D-Germacreno	23986-74-5	19,899	5,103
Aloaromadendreno	25246-27-9	20,042	0,523
γ -Elemeno	339154-91-5	20,203	1,504
τ -Cadinol	5937-11-1	20,606	0,470
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,886	13,230
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,208	2,412
Fitol	150-86-7	30,829 - 32,326	3,230
Outros	-	-	68,271

A6. CG-EM ESC 200 bar/60 °C

Figura A6 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 60 °C.

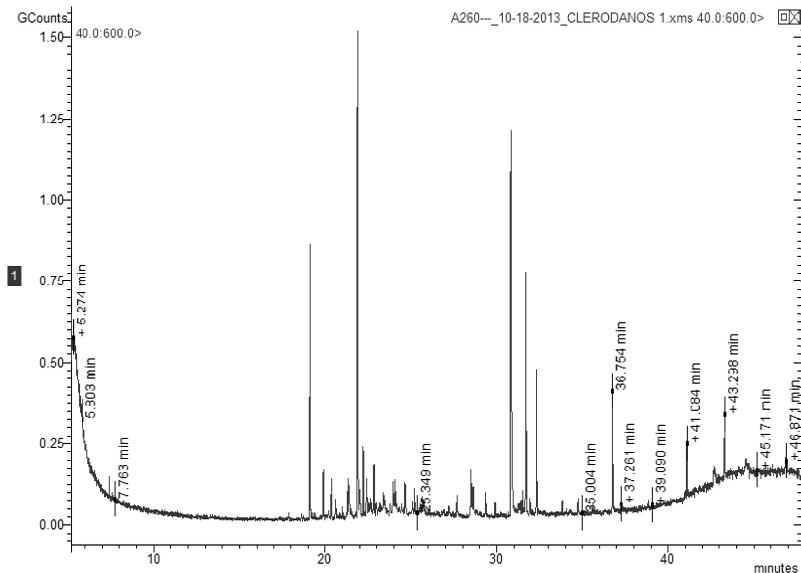


Tabela A6 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 60 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,120	8,903
1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-nafta-leno	483-75-0	19,909	2,487
(-)-Espatulenol	77171-55-2	21,887	19,752
1(5)-Guaieni-11-ol	13822-35-0	22,218	2,899
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,490	1,395
Fitol	150-86-7	30,835	21,408
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	102608-53-7	32,339	5,307
Outros	-	-	37,849

A7. CG-EM ESC 300 bar/40 °C

Figura A7 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 40 °C.

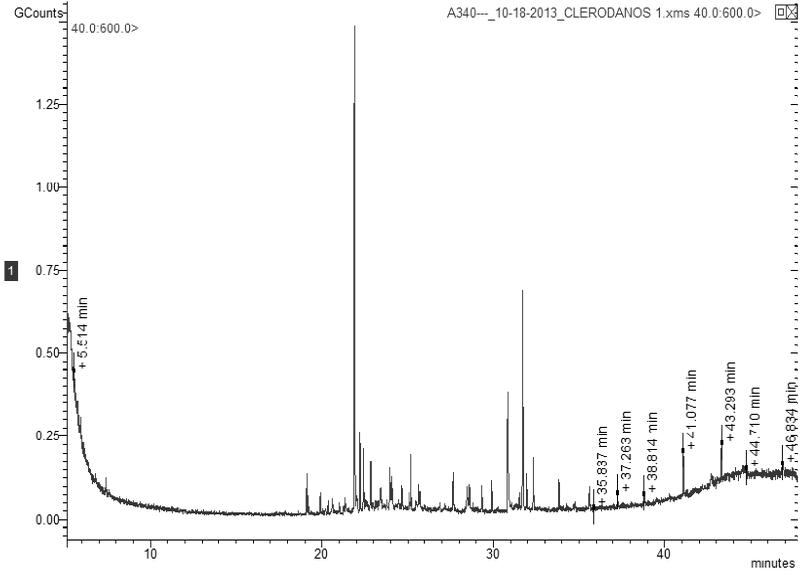
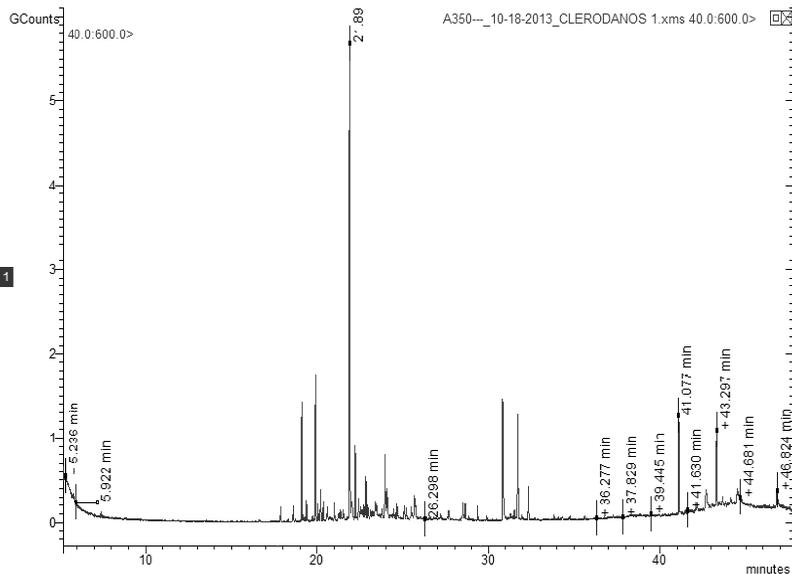


Tabela A7 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 40 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,119	1,885
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,884	25,857
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,218	4,013
Fitol	150-86-7	30,839	9,118
2,3-Oxidoesqualeno	7200-26-2	31,709	11,226
Outros	-	-	47,901

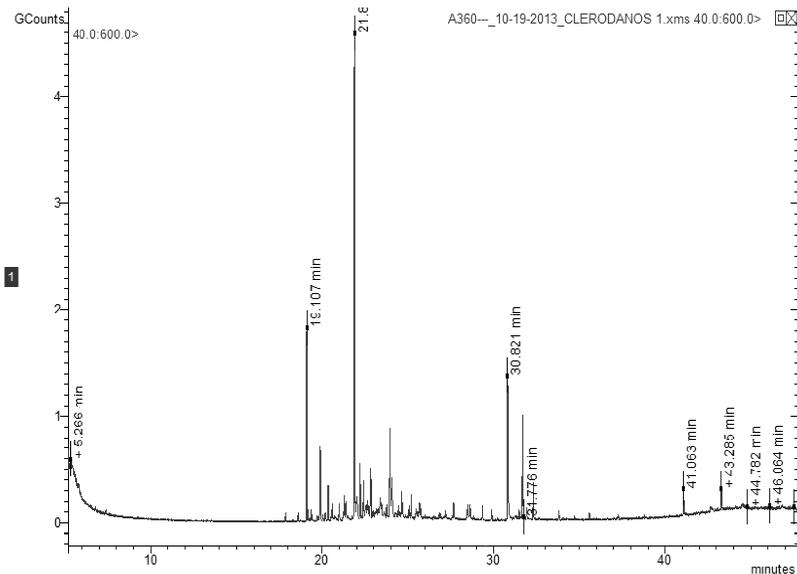
A8. CG-EM ESC 300 bar/50 °C

Figura A8 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C.Tabela A8 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletetil)-ciclohexano	110823-68-2	17,882	0,672
β -Cariofileno	87-44-5	18,620	0,658
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,115	4,775
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,377	1,106
β -Cubebeno	13744-15-5	19,909	7,265
Aromadendreno	489-39-4	20,050	0,851
γ -Elemeno	339154-91-5	20,208	1,583
Aloaromadendreno	25246-27-9	20,364	0,975
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,898	24,952
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,215	3,832
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	23,952	3,932
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,480	0,962
Fitol	150-86-7	30,837	7,384

Tetracosano	646-31-1	41,075	4,478
Hentriacontano	630-04-6	43,293	4,262
Outros	-	-	32,313

A9. CG-EM ESC 300 bar/60 °C

Figura A9 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 60 °C.Tabela A9 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 60 °C.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> -β-Farneseno	28973-97-9	19,110	9,103
D-Germacreno	23986-74-5	19,899	4,650
γ -Gurjuneno	22567-17-5	20,360	2,010
(-)-Espatulenol	77171-55-2	21,884	27,496
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,204	3,070
Fitol	150-86-7	30,820	9,043
Octacosano	630-02-4	41,069	1,388
Outros	-	-	43,24

A10. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 2 % ETOAC

Figura A10 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOAC.

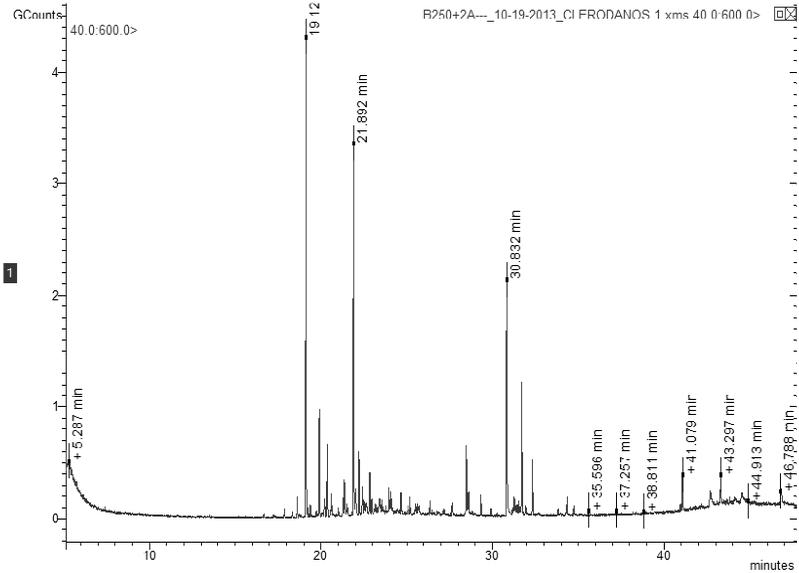


Tabela A10 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
cis- β -Farneseno	28973-97-9	18,628	0,920
trans- β -Farneseno	18794-84-8	19,134	18,223
D-Germacreno	23986-74-5	19,902	5,679
Valenceno	4630-07-3	20,371	3,108
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,889	16,784
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,217	2,632
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	24,654	1,139
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,486	3,217
Fitol	150-86-7	30,834	11,745
Dotriacontano	544-85-4	41,080	1,542
Outros	-	-	35,011

A11. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 5 % ETOAC

Figura A11 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.

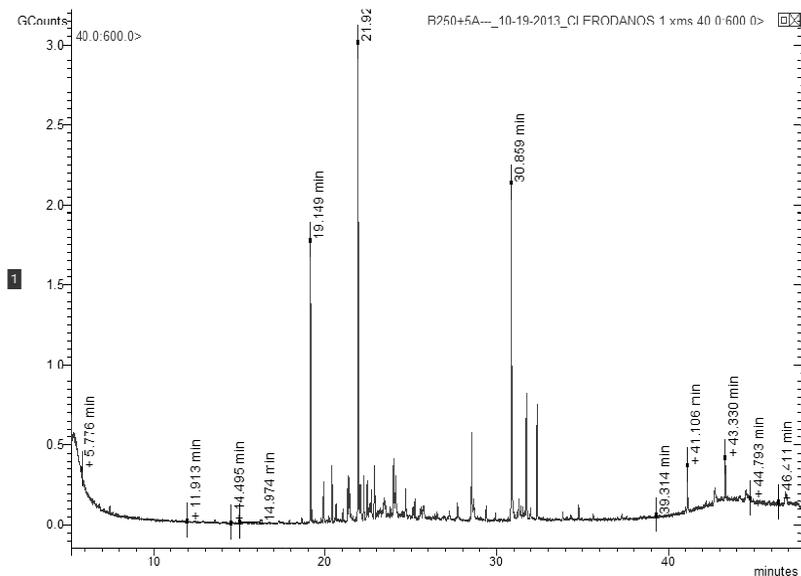


Tabela A11 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,154	10,171
α -Selineno	473-13-2	19,913	1,763
Aloaromadendreno	25246-27-9	20,396	2,271
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,923	21,314
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,039	2,356
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,245	1,870
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,520	3,884
Fitol	150-86-7	30,862	15,861
Outros	-	-	40,51

A12. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 8 % ETOAC

Figura A12 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOAC.

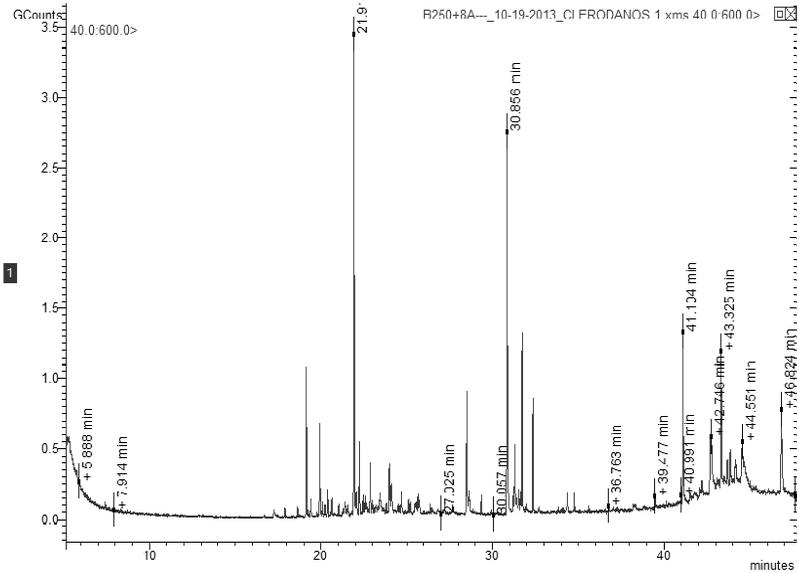


Tabela A12 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>trans</i> -β-Farneseno	18794-84-8	19,144	3,416
D-Germacreno	23986-74-5	19,926	2,835
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,916	14,571
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,242	1,968
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,519	3,601
Fitol	150-86-7	30,858	12,345
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicoso-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	-	31,736	5,237
Tetracosano	646-31-1	41,103	4,777
Hexatriacontano	630-06-8	43,336	5,016
Vitamina E	59-02-9	43,864	1,303

Apêndice IV

β -Sitosterol	83-46-5	46,820	4,914
Outros	-	-	40,017

A13. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 2 % ETOH

Figura A13 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOH.

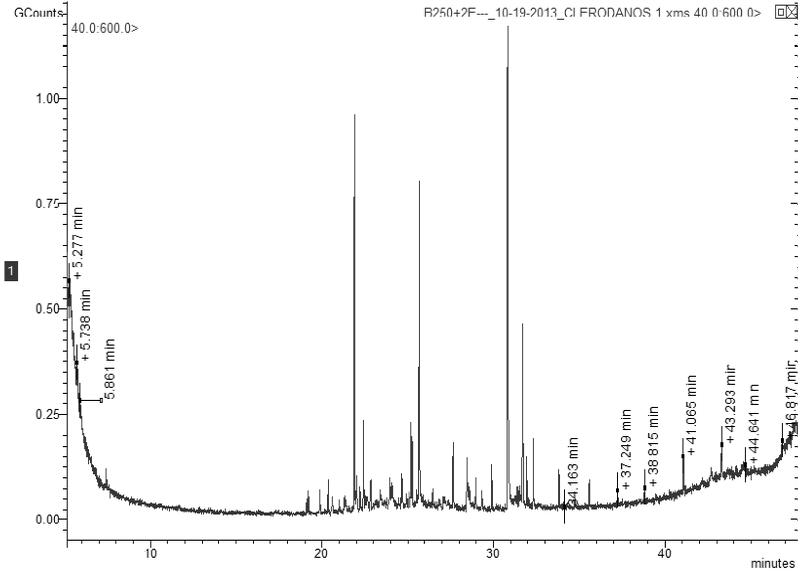


Tabela A13 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 2 % ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
Aloaromadendreno	25246-27-9	20,358	1,327
(-)-Espatulanol	77171-55-2	21,886	16,230
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,009	2,209
Fitol	150-86-7	30,824	27,677
Outros	-	-	52,558

A14. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 5 % ETOH

Figura A14 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOH.

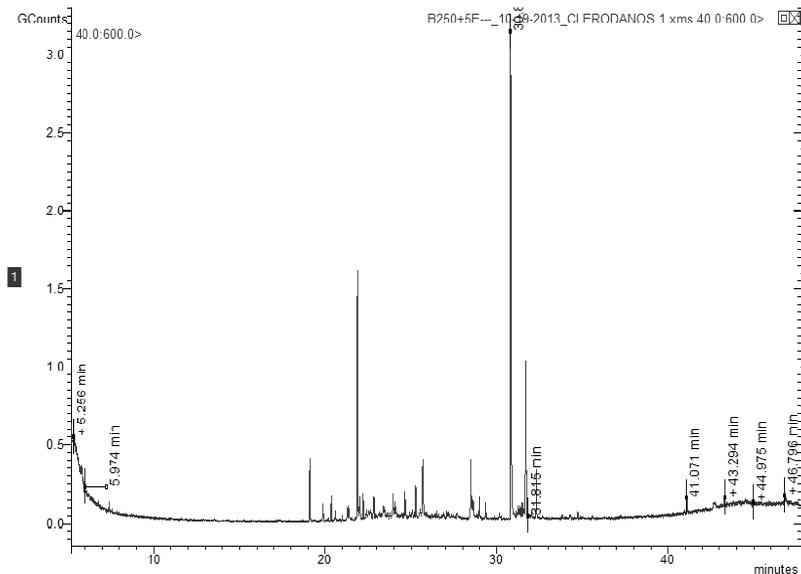


Tabela A14 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 5 % ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>trans</i> -β-Farneseno	18794-84-8	19,120	3,752
(-)-Espatulanol	77171-55-2	21,883	17,930
Óxido de β-Cariofileno	1139-30-6	22,015	2,173
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,482	3,292
Fitol	150-86-7	30,827	37,472
2,3-Oxidosqualeno	7200-26-2	31,709	11,408
Outros	-	-	23,972

A15. CG-EM ESC 200 bar/50 °C + 8 % ETOH

Figura A15 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOH.

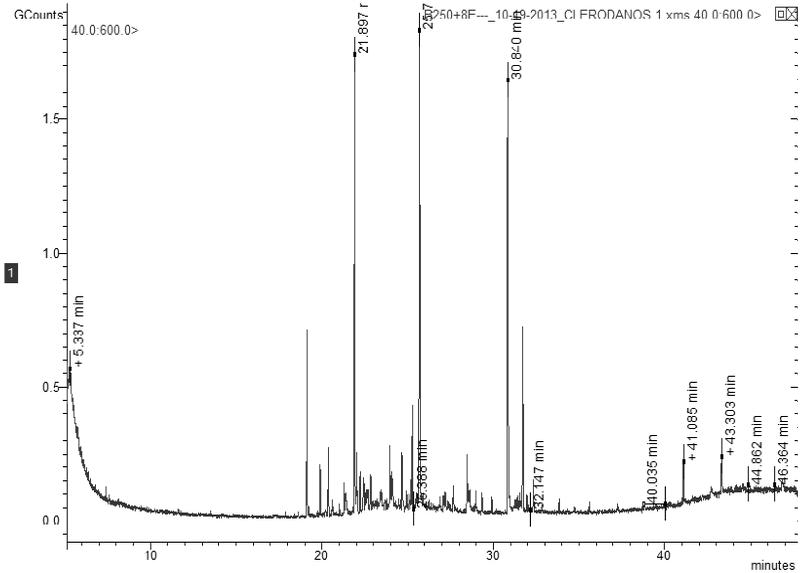
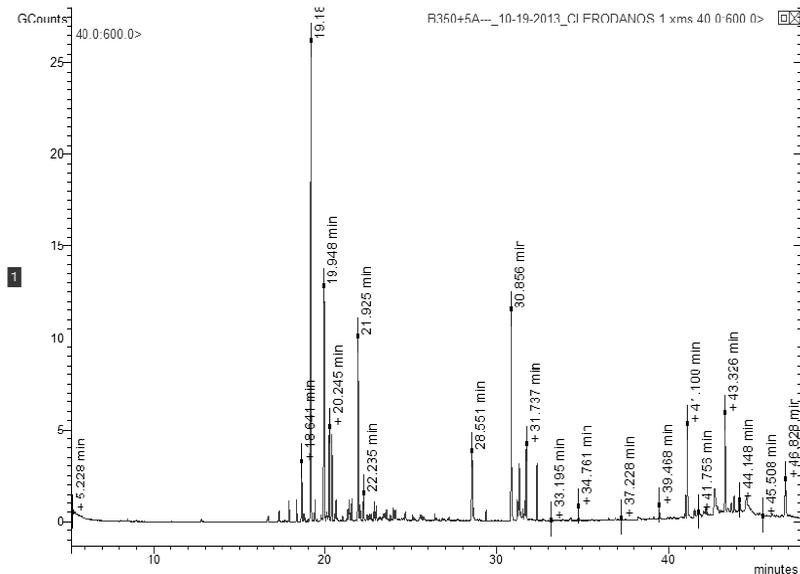


Tabela A15 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 200 bar e 50 °C + 8 % ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,128	6,269
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,892	20,267
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,022 - 24,650	6,073
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,222	1,680
Epóxido de isoaromadendreno	-	25,289	3,983
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,489	2,222
Fitol	150-86-7	30,845	21,822
<i>cis</i> -Nerolidol	142-50-7	31,722	8,050
Octacosano	630-02-4	41,075	1,822
Outros	-	-	27,812

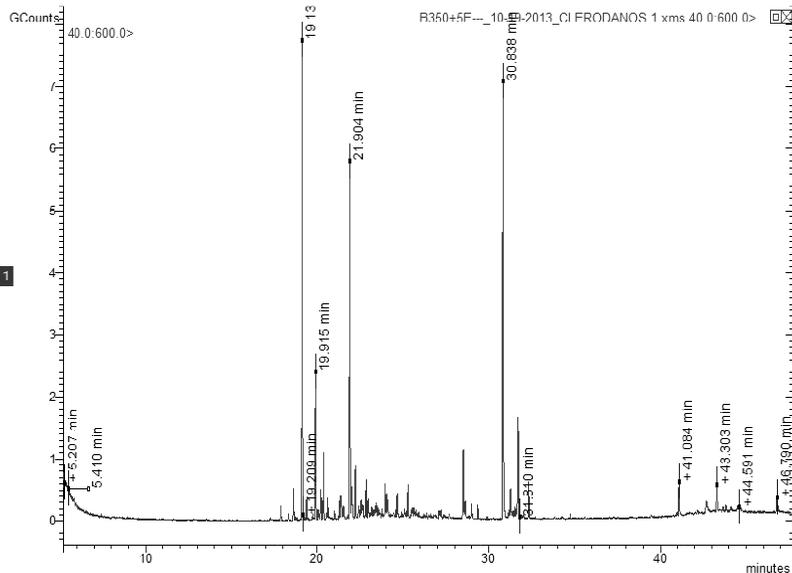
A16. CG-EM ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOAC

Figura A16 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.**Tabela A16** - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)- β -Elemeno	515-13-9	17,901	0,652
α -Gurjuneno	489-40-7	18,347	0,763
β -Cariofileno	87-44-5	18,640	2,107
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,175	21,873
D-Germacreno	23986-74-5	19,949	10,663
γ -Elemeno	339154-91-5	20,242 - 21,550	4,745
Valenceno	4630-07-3	20,393	3,211
δ -Cadineno	483-76-1	20,634	0,670
<i>cis</i> -Nerolidol	142-50-7	21,381	0,707
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,932	7,263
Guaiol	489-86-1	22,234	0,999
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,546	3,388

Fitol	150-86-7	30,861	8,429
Ácido linoleico	60-33-3	31,213	0,865
Ácido linolênico	463-40-1	31,327	2,720
Ácido esteárico	57-11-4	31,639	0,673
Hentriacontano	630-04-6	41,105 - 43,326	6,883
β -Sitosterol	83-46-5	46,824	2,604
Outros	-	-	20,785

A17. CG-EM ESC 300 bar/50 °C + 5 % ETOH

Figura A17 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOH.**Tabela A17** - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por ESC a 300 bar e 50 °C + 5 % ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
1-Etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletetil)-ciclohexano	110823-68-2	17,887	0,509
β -Cariofileno	87-44-5	18,627	1,088
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,136	16,543
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,388	0,883
D-Germacreno	23986-74-5	19,912	7,121
Biciclogermacreno	67650-90-2	20,218	1,349
α -Selineno	473-13-2	20,377	2,738
(-)-Espatulanol	77171-55-2	21,910	15,067
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,034	1,724

1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,220	1,990
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,497	2,645
Etil hexadecanoato/ Etil palmitato	628-97-7	28,985	0,469
Fitol	150-86-7	30,838	17,505
Eicosano	112-95-8	41,087	1,317
Tetratetracontano	7098-22-8	43,309	1,334
Vitamina E	59-02-9	43,835	0,335
β -Sitosterol	83-46-5	46,788	1,094
Outros	-	-	26,289

A18. CG-EM MAC-CLF

Figura A18 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por MAC-CLF.

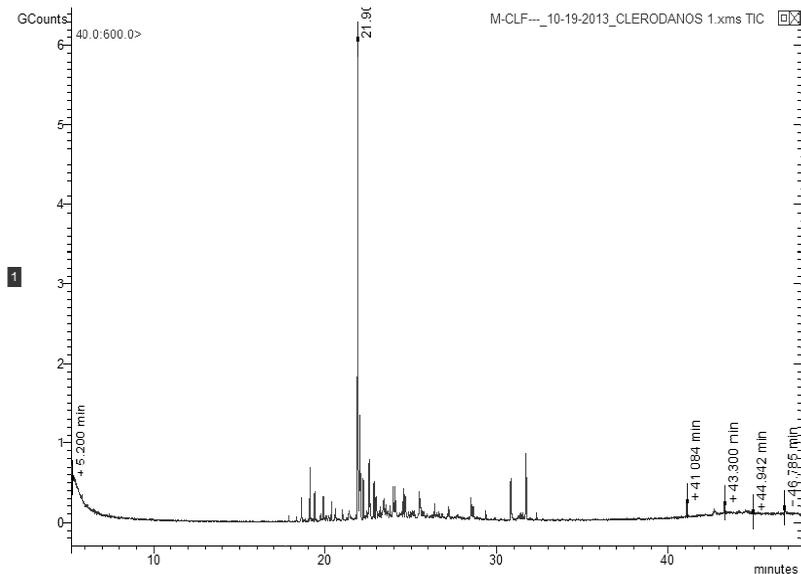
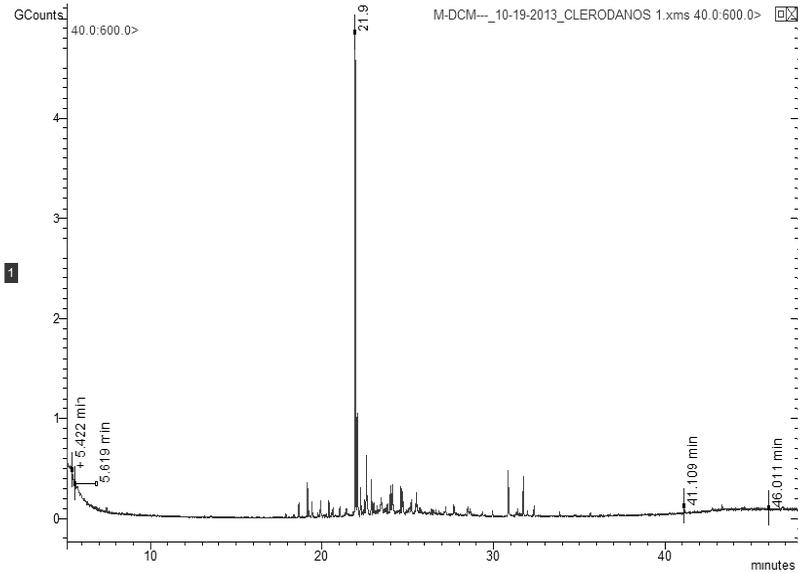


Tabela A18 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-CLF.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
γ -Cariofileno	118-65-0	18,624	1,746
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,122	3,338
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,393	2,097
1,2,4a,5,6,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	483-75-0	19,900	2,560
Aloaromadendreno	25246-27-9	20,371	1,382
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,911	37,136
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,025 - 24,656	10,283
Elemol	639-99-6	22,229	3,011
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,566	4,931
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,484	2,065
Fitol	150-86-7	30,832	3,458
2,3-Oxidosqualeno	7200-26-2	31,711	4,658
Outros	-	-	23,335

A19. CG-EM MAC-DCM

Figura A19 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por MAC-DCM.Tabela A19 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-DCM.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
β -Cariofileno	87-44-5	18,653	0,975
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,155	2,501
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,421	1,176
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,931	39,846
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,055 - 23,985	11,345
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,595	5,899
Fitol	150-86-7	30,854	4,151
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicosá-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	-	31,744	3,092
Outros	-	-	31,015

A20. CG-EM MAC-ETOAC

Figura A20 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOAC.

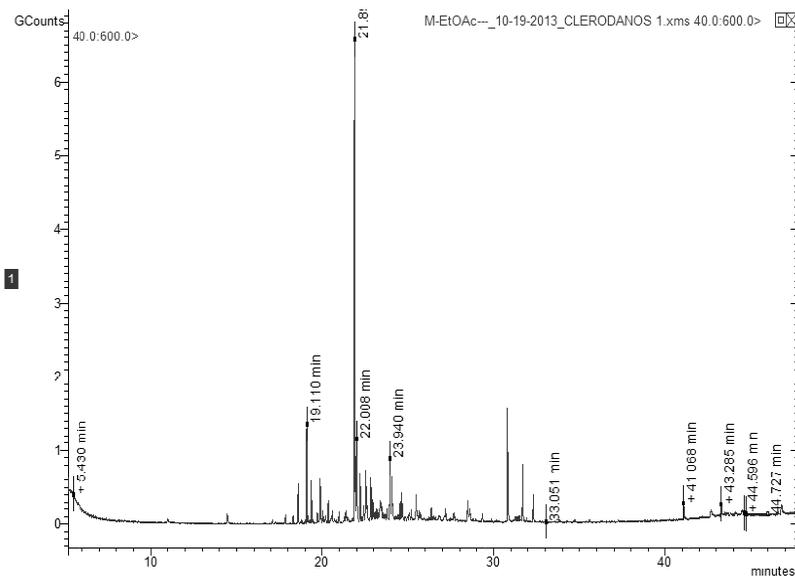


Tabela A20 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)- β -Elemeno	515-13-9	17,872	0,414
α -Gurjuneno	489-40-7	18,318	0,388
γ -Cariofileno	118-65-0	18,610	2,088
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,112	4,522
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,377	2,177
D-Germacreno	23986-74-5	19,897	3,062
α -Himachaleno	3853-83-6	20,355	1,130
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,895	28,717
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,010	5,952
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,204	2,625
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,548	3,285
Epóxido de <i>trans</i> -Z- α -Bisaboleno	-	23,946	3,460
<i>trans</i> -Longipinocarveol	-	24,062	2,966

Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,465	1,233
Fitol	150-86-7	30,818	6,318
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicosa-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	-	31,704	3,090
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	102608-53-7	32,315	1,294
Outros	-	-	27,279

A21. CG-EM MAC-ETOH

Figura A21 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOH.

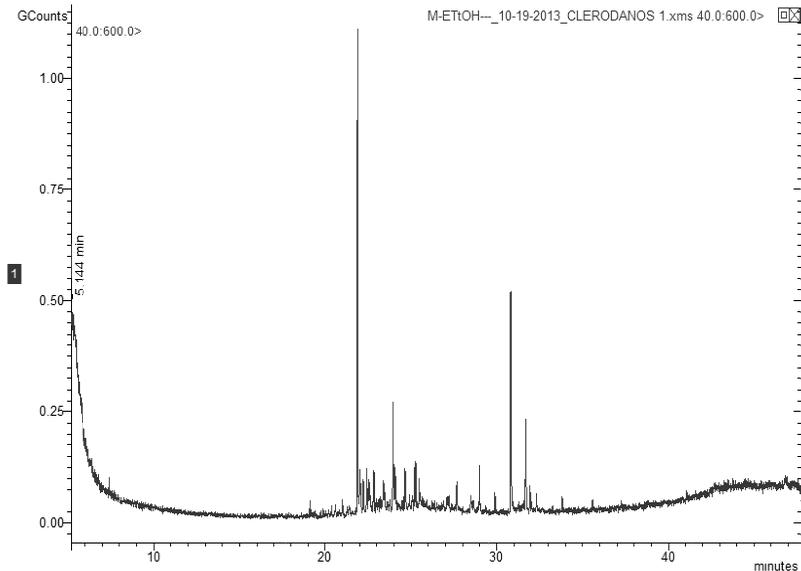
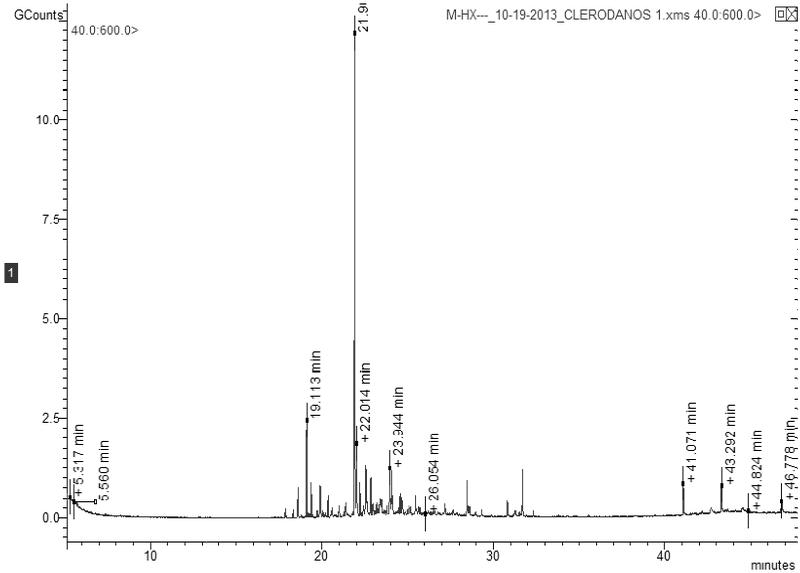


Tabela A21 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,881	30,542
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	23,947	8,107
Etil hexadecanoato/ Etil palmitato	628-97-7	28,984	2,709
Fitol	150-86-7	30,821	16,488
Outros	-	-	42,154

A22. CG-EM MAC-HX

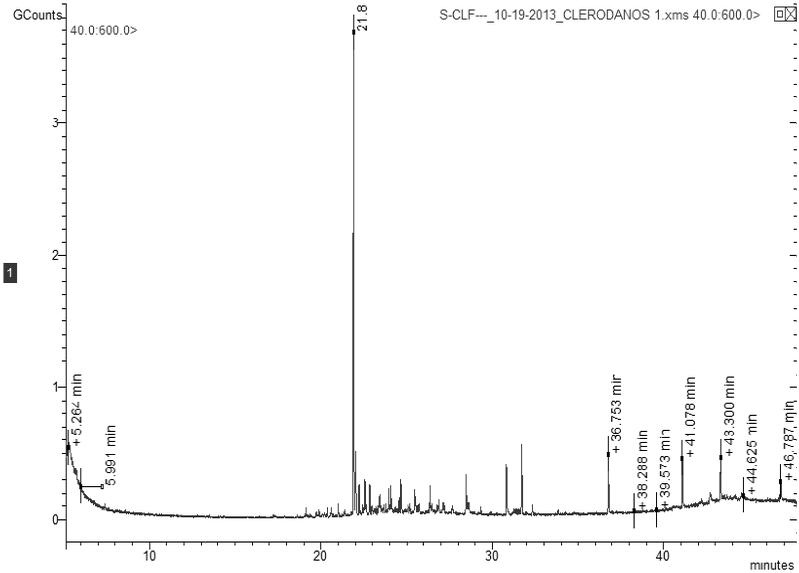
Figura A22 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por MAC-HX.Tabela A22 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por MAC-HX.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)- β -Elemeno	515-13-9	17,873	0,614
α -Gurjuneno	489-40-7	18,320	0,532
β -Cariofileno	87-44-5	18,611	1,970
<i>trans</i> - β -Farneseno	18794-84-8	19,122	5,624
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,378	2,428
D-Germacreno	23986-74-5	19,891	3,287
α -Selineno	473-13-2	20,361	1,551
Óxido de Ledeno II	-	21,007	0,975
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,907	37,057
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,013 - 23,948	10,379
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,208	2,319
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,554	4,072

Apêndice IV

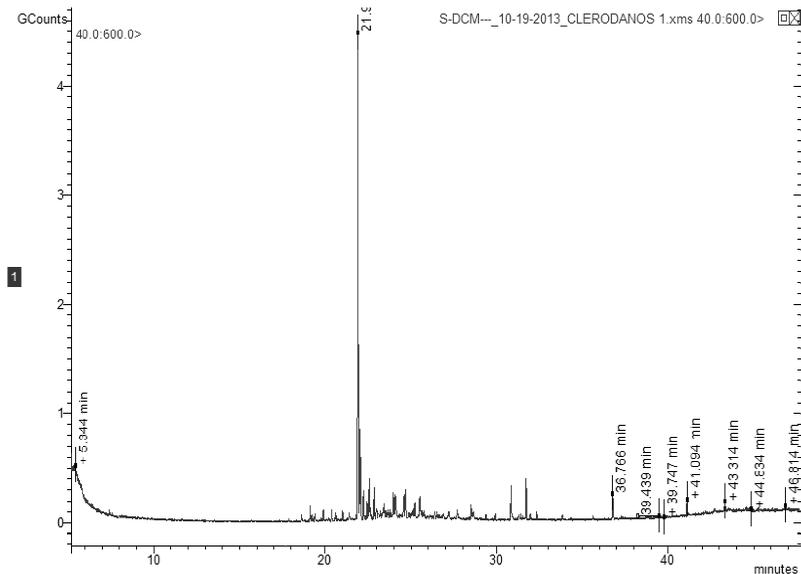
6-Isoprenil-4,8a-dimetil-1,2,3, 5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen- 2-ol	-	24,064	4,372
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,486	2,314
Fitol	150-86-7	30,822	1,167
2,3-Oxidosqualeno	7200-26-2	31,706	3,176
Nonadecano	629-92-5	41,066	2,429
Tetracosano	646-31-1	43,292	2,272
Outros	-	-	13,462

A23. CG-EM SOX-CLF

Figura A23 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por SOX-CLF.Tabela A23 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-CLF.

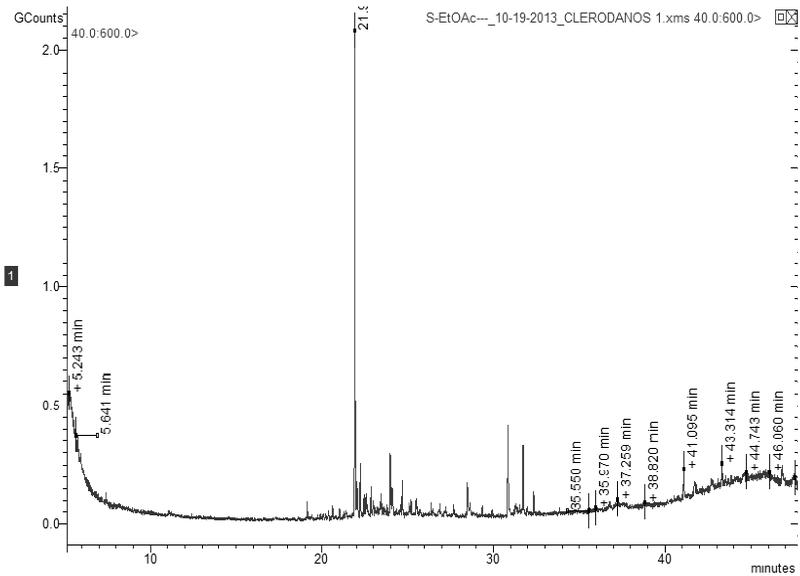
Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,903	41,082
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,017	6,418
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,212	2,515
6-Isoprenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	-	24,071	3,300
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,481	2,668
Fitol	150-86-7	30,828	4,580
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicoso-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxi-rano	-	31,708	5,902
Nonadecano	629-92-5	41,085	4,599
Tetacosano	646-31-1	43,297	3,858
Outros	-	-	25,078

A24. CG-EM SOX-DCM

Figura A24 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por SOX-DCM.Tabela A24 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-DCM.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	18,640	0,975
α -Cariofileno/ α -Humuleno	6753-98-6	19,402	1,209
α -Selineno	473-13-2	20,379	1,387
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,913	51,204
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,034	11,773
Fitol	150-86-7	30,847	3,609
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicosa-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	-	31,723	4,119
Outros	-	-	25,724

A25. CG-EM SOX-ETOAC

Figura A25 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOAC.Tabela A25 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOAC.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> - β -Farneseno	28973-97-9	19,133	1,103
(-)-Espatulanol	77171-55-2	21,904	35,610
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,232	3,697
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	23,967	4,586
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,498	1,881
Fitol	150-86-7	30,848 - 32,350	9,620
2,2-Dimetil-3-(3,7,16,20-tetrametil-heneicoso-3,7,11,15,19-pentaenil)-oxirano	-	31,726	5,210
Outros	-	-	38,293

A26. CG-EM SOX-ETOH

Figura A26 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOH.

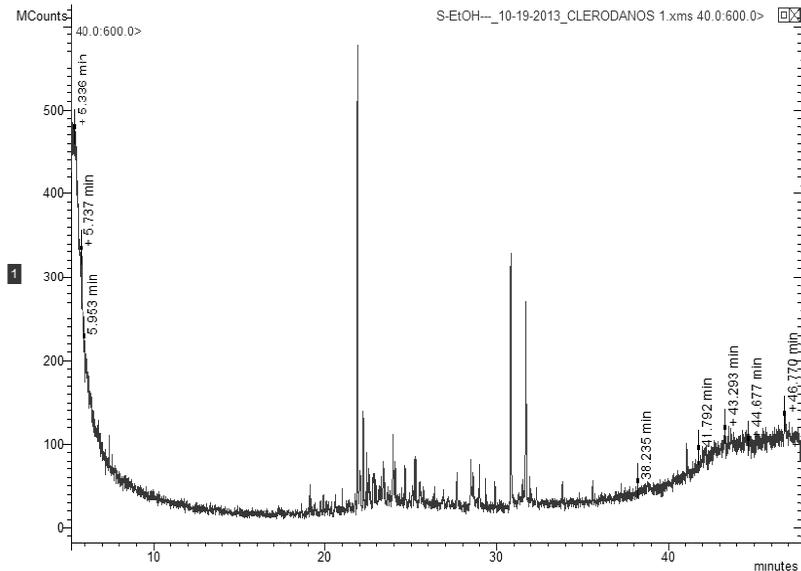
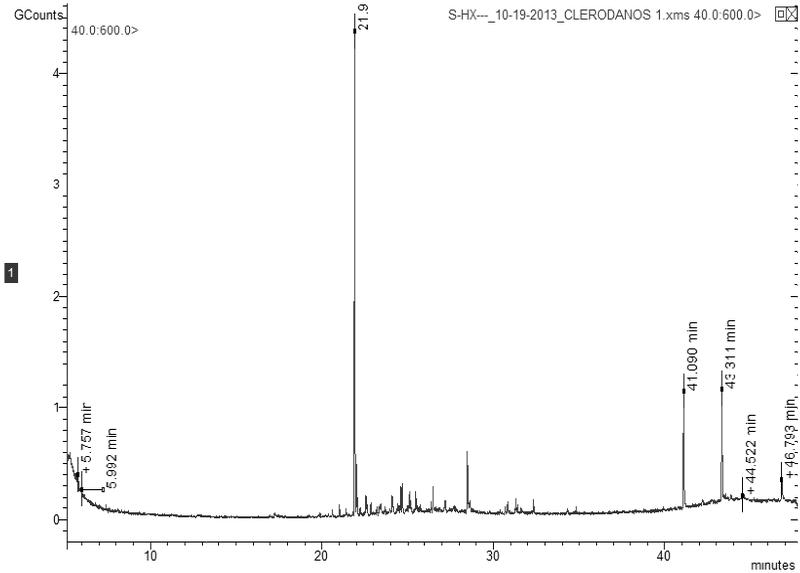


Tabela A26 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-ETOH.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
<i>cis</i> -β-Farneseno	28973-97-9	19,116	1,091
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,879	32,399
1(5)-Guaien-11-ol	13822-35-0	22,211	8,264
Fitol	150-86-7	30,825	20,190
Outros	-	-	38,056

A27. CG-EM SOX-HX

Figura A27 - CG-EM do extrato *C. sylvestris* obtido por SOX-HX.Tabela A27 - Principais compostos identificados, tempos de retenção e área percentual relativa do extrato de *C. sylvestris* obtido por SOX-HX.

Componente	Registro CAS	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
(-)-Espatuleno	77171-55-2	21,896	43,351
Óxido de β -Cariofileno	1139-30-6	22,020	5,630
Epóxido de α -Humuleno II	19888-34-7	22,567	1,395
Ácido n-Hexadecanóico	57-10-3	28,500	5,096
Fitol	150-86-7	30,843	1,126
Tetracosano	646-31-1	41,088	10,842
Tetratetracontano	7098-22-8	43,315	11,902
β -Sitosterol	83-46-5	46,788	3,401
Outros	-	-	17,257

APÊNDICE V: ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF SUPERCRITICAL FLUIDS

G Model
SUPFLU-2919; No. of Pages 9

ARTICLE IN PRESS

J. of Supercritical Fluids xxx (2014) xxx–xxxx



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



Phase equilibrium data of guaçatonga (*Casearia sylvestris*) extract + ethanol + CO₂ system and encapsulation using a supercritical anti-solvent process

Patrícia Benelli^a, Sibeles R. Rosso Comim^a, J. Vladimir Oliveira^a, Rozângela C. Pedrosa^b, Sandra R.S. Ferreira^{a,b,*}

^a EQA-CTC/UFSC, Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, C.P. 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil
^b DQA-CCB/UFSC, Biochemistry Department, Federal University of Santa Catarina, C.P. 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 July 2013
Received in revised form 15 January 2014
Accepted 3 February 2014

Keywords:
Phase behavior
Particle formation
SAS
Medicinal plant

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the phase equilibrium behavior of a system containing guaçatonga extract + ethanol + CO₂ in order to help define the adequate conditions of temperature and pressure for the co-precipitation process, performed by means of supercritical anti-solvent (SAS) technique. Guaçatonga (*Casearia sylvestris*) is a native medicinal plant from Brazil, rich in valuable components such as β-caryophyllene, α-humulene and bicyclogermacrene. Phase equilibrium data were obtained by the static method using guaçatonga extract dissolved in ethanol (1:100, wt/wt), at temperatures ranging from 35 to 75 °C and CO₂ mass content from 60 to 90 wt%. It was noticed that the system exhibited solid vapor liquid, solid liquid liquid and solid vapor liquid liquid transition types and a lower critical solution temperature behavior. Phase behavior study was considered for the definition of the SAS conditions applied for the encapsulation of guaçatonga extract in the biopolymer Pluronic F127. The conditions tested ranged from 80 to 140 bar at 45 °C. At 80 bar only segregated particles of extract and the biopolymer were detected, while at 110 and 140 bar an extract encapsulation was achieved.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Casearia sylvestris is a medicinal plant native from Brazil and popularly known as "guaçatonga", "cafézinho-do-mato", "café-silvestre" and "erva-de-bugre". In folk medicine its leaves are used for skin and oral wound healing. It is also applied as an anti-snake poison, topical anesthetic and antiseptic and anti-ulceration agent [1–3].

The major components present in guaçatonga extracts, mainly in the essential oil, are β-caryophyllene, α-humulene, bicyclogermacrene, germacrene B and D [4], which among other substances confer several biological potency such as antitumor, cytotoxic, antifungal and anti-inflammatory activities [5–7]. Phytochemical investigations revealed that some compounds isolated from guaçatonga exhibit both cytotoxic and antifungal activities [8,9], and these biological activities are attributed to the combined effect of the compounds present in the natural extract [10]. Due to the complexity of multicomponent systems usually found in

natural products, the synergetic effect of the components are still under investigation in order to provide a complete elucidation of the mechanisms involved in biological actions of complex extract [11].

The coating or encapsulation of a natural extract into a polymer, in a micrometer range, is interesting for food and pharmaceutical industries because it preserves the bioactive properties of natural extracts [12–14].

The phase behavior of complex systems formed by natural product extracts and solvent plays a crucial role to elucidate the precipitation mechanism involved in the particle formation (micronization) like nucleation, particle growth kinetics, and mass transfer. The phase behavior also aids the determination of the most satisfactory operating conditions for the precipitation and encapsulation processes [15,16].

The particle formation and encapsulation using traditional techniques such as spray-drying, coacervation, freeze-drying, interfacial polymerization, and others, may present some disadvantages such as reduced control of particle size and morphology, thermal degradation of sensitive substances, and low encapsulation efficiency [17].

The use of supercritical anti-solvent (SAS) for micronization and encapsulation processes have been proposed in order to obtain

* Corresponding author. Tel.: +55 48 37214069/+55 48 37212537; fax: +55 48 37219887.
E-mail address: sandra@enq.ufsc.br (S.R.S. Ferreira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.007>
0896-8446/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

“Pensar é o trabalho mais pesado que há, e, talvez, seja essa a razão para que tão poucas pessoas se dediquem a tal tarefa.”

- Henry Ford -