

DANIELA GAVA CITADIN

**AVALIAÇÃO DOS BIOATIVOS EXISTENTES NA *DRIMYS*
ANGUSTIFOLIA MIERS E *CUNILA GALIODES* BENTH,
PLANTAS ORIUNDAS DA MATA ATLÂNTICA, FLORESTA
OMBRÓFILA MISTA.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Coorientadora: Dr^a. Alessandra Marangoni

Florianópolis
2018

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

Citadin, Daniela Gava

Avaliação dos Bioativos Existentes na *Drimys Angustifolia* Miers e *Cunila Galioides* Benth, Plantas Oriundas da Mata Atlântica, Floresta Ombrófila Mista / Daniela Gava Citadin ; Orientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientadora, Alessandra Marangoni.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. *Drimys angustifolia* Miers. 3. *Cunila galioides* Benth. 4. compostos bioativos. 5. extração supercrítica com CO₂. I. Bolzan, Ariovaldo. II. Marangoni, Alessandra. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**AVALIAÇÃO DOS BIOATIVOS EXISTENTES NA *DRIMYS*
ANGUSTIFOLIA MIERS E *CUNILA GALIODES* BENTH,
PLANTAS ORIUNDAS DA MATA ATLÂNTICA, FLORESTA
OMBRÓFILA MISTA**

Por

Daniela Gava Citadin

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, na área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
orientador

Dr^a. Alessandra Marangoni
coorientadora

Prof^a. Dr^a. Cintia Soares
coordenadora

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cristiane da Costa Bresolin

Prof. Dr. André Wüst Zibetti

Dr^a. Betina Giehl Zanetti Ramos

Florianópolis, 29 de junho de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle e Processos Poliméricos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Centro Tecnológico - Universidade Federal de Santa Catarina.

Contou com a participação da Fundação Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras (CERTI) e Fundação Grupo Boticário e com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



Este trabalho é dedicado:

Aos meus pais Durci e
Salete, família e amigos
queridos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que tudo acontecesse e por estar sempre presente, me abençoando e guardando.

À minha família, em especial, aos meus pais Salete Gava Citadin e Durci Feltrin Citadin, irmãos Andrey e Murilo Gava Citadin, cunhadas Michele Biff Citadin e Júlia Damian Citadin e aos meus sobrinhos Rafael e Luiza Biff Citadin por todo amor, dedicação, ensinamentos e incentivos.

À minha grande amiga Alessandra Marangoni que desde o início me incentivou, ajudou e ensinou, compartilhando conhecimentos, amizade e carinho. Obrigada pelos conselhos e atenção despendidos a mim. Sem você não chegaria aqui, Valeu!

Ao meu orientador Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação e confiança.

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

Ao professor Júlio da UDESC/Lages pela disposição na coleta dos materiais vegetais.

À Mayra Arauco pelo conhecimento e apoio compartilhado que foi essencial no início deste trabalho.

Às meninas da supercrítica, Júlia, Deyse, Thuany, por toda ajuda, conselhos, conversas e conhecimentos compartilhados.

À André Zibetti pelas trocas, apoio, dedicação e amizade.

Às minhas amigas e amigos Dilma Maria Munari, Letícia da Costa Lacqua, Maria Magdalena Espínola, Elaine de Oliveira Menezes, Emerson da Silva, Rafael Dias e Tiago Peruzzo pela amizade e ajuda prestada durante este trabalho.

Aos Laboratórios LCP-EQA-UFSC, LATESC-EQA-UFSC, LABEC-QMC-UFSC, LPPN-FURB, LQF-CIF-UFSC e LFFPN-UNIVALI com seus colaboradores, por todo o suporte prestado durante a realização deste trabalho.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os amigos que, mesmo de longe, torceram para o sucesso deste trabalho.

“O êxito começa no momento exato em que o homem decide o que quer e começa a trabalhar para o conseguir. ”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

A Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou Floresta com Araucárias é um ecossistema do Bioma da Mata Atlântica, característico da região sul do Brasil. Embora este ecossistema possua grande importância cultural, ambiental e econômica, devido a agropecuária e a exploração de madeira, vem passando por uma grande degradação. Para recuperação e valorização deste bioma, foi elaborado em 2012, o projeto Araucária +, tendo como objetivo estruturar um ambiente de inovação para a conservação da FOM, com foco na valorização das cadeias produtivas do pinhão, da erva mate e de outras espécies ricas em compostos bioativos. Com base neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de extratos e compostos ativos das plantas *Drimys angustifolia* Miers, popular casca d'anta e da *Cunila galioides* Benth, popular poejo do campo, nativas do bioma FOM. Utilizando a extração supercrítica com CO₂, que é uma tecnologia de extração limpa e ambientalmente segura, avaliou-se os bioativos para uso cosmético e farmacêutico. Para avaliar a aplicação desses extratos foram analisadas as atividades de inibição da acetilcolinesterase e α -glicosidase, enzimas que estão relacionadas as doenças de Alzheimer e Diabetes, respectivamente, bactericida e fungicida. Para o extrato da *D. angustifolia* foram avaliadas, também, as ações inseticida e de repelência. Como comparação em relação a rendimento e seletividade foram realizadas extrações, utilizando os métodos de hidrodestilação e soxhlet. Os resultados demonstraram um maior rendimento para as extrações por soxhlet, seguido da supercrítica e hidrodestilação. Os compostos majoritários nos extratos supercríticos da *C. galioides* foram espatulenol e óxido de cariofileno, e no da *D. angustifolia* foi o poligodial. Em relação as atividades testadas para os dois extratos, a bactericida foi de moderada à inativa, a fungicida foi de fraca à inativa para a *C. galioides* e de boa a excelente para a *D. angustifolia*. Nas avaliações de inativação enzimática o poejo do campo apresentou-se inativo para a acetilcolinesterase e forte inibidor para a α -glicosidase, e a casca d'anta foi fraca inibidora para as duas enzimas. Nos testes de repelência e inseticida o extrato supercrítico da *D. angustifolia* mostrou boa repelência e ação inseticida contra o *Aedes aegypti*. Esses resultados revelam a *D. angustifolia* como potencial para uso cosmético como repelentes contra o *Aedes aegypti* e a *C. galioides* para fármacos controladores do Diabetes.

Palavras-chave: *Drimys angustifolia* Miers, *Cunila galioides* Benth, compostos bioativos, extração supercrítica com CO₂.

ABSTRACT

The Mixed Ombrophilous Forest (MOF) or Araucaria Forest is an ecosystem of the Atlantic Forest Biome, characteristic of southern Brazil. Although this ecosystem has great cultural, environmental and economic importance, due to agriculture and the exploitation of wood, it is undergoing great degradation. In order to recover and enhance this biome, the Araucaria + project was designed in order to structure an innovation environment for the conservation of the MOF, focusing on the valorization of the production chains of araucaria nuts, mate herb and other species, rich in bioactive compounds. Based on this context, the present work had the objective of obtaining extracts and active compounds from the *Drimys angustifolia* Miers, popularly known as casca d'anta and *Cunila galioides* Benth, known as poejo do campo, native to the MOF biome. Using supercritical CO₂ extraction, which is a clean and environmentally safe extraction technology, the bioactives were evaluating for cosmetic and pharmaceutical use. In order to assay the application of these extracts, the activities of inhibition of acetylcholinesterase and α -glycosidase, enzymes related to Alzheimer's and Diabetes diseases, respectively, bactericides and fungicides were analyzed. For the extract of *D. angustifolia*, insecticidal and repellent actions were also evaluating. As a comparison in relation to yield and selectivity, extractions were carrying out using the hydrodistillation and soxhlet methods. The results demonstrated a higher yield for soxhlet extractions, followed by supercritical and hydrodistillation. The major compounds in the supercritical extracts of *C. galioides* were spathulenol and caryophyllene oxide, and in *D. angustifolia*, it was the polygodial. In relation to the activities tested for the two extracts, the bactericide was moderate to inactive; the fungicide was weak to inactive for *C. galioides* and good to excellent for *D. angustifolia*. In the enzymatic inactivation evaluations, the poejo do campo was inactive for acetylcholinesterase and a strong inhibitor for α -glycosidase, and the casca d'anta was weak inhibitor for the two enzymes. In the tests of repellency and insecticide, the supercritical extract of *D. angustifolia* showed good repellency and insecticidal action against *Aedes aegypti*. These results reveal *D. angustifolia* as potential for cosmetic use as repellents against *Aedes aegypti* and *C. galioides* for diabetes controlling drugs.

Key words: *Drimys angustifolia* Miers, *Cunila galioides* Benth, bioactive compounds, supercritical extraction with CO₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Curva típica de extração com fluido em estado supercrítico.	44
Figura 4.1 - Diagrama de fluxo das atividades realizadas no presente estudo.	47
Figura 4.2 - Fotografias (A) <i>Drimys angustifolia</i> Miers e (B) <i>Cunila galioides</i> Benth, secas/moídas e antes da colheita.	48
Figura 4.3 - Aparatos da extração em Soxhlet.	51
Figura 4.4 - Aparelho tipo Clevenger.....	51
Figura 4.5 - Unidade de extração supercrítica do Laboratório de Controle de Processos Poliméricos: HPLC-SC.....	52
Figura 4.6 - Unidade de extração (HPLC - SC). B - bomba HPLC, E - extrator, BP - válvula back-pressure, H – aquecimento.	53
Figura 5.1 - Gráfico de Pareto - <i>Drimys angustifolia</i> Miers.....	76
Figura 5.2 - Gráfico da superfície de resposta para o rendimento global da <i>Drimys angustifolia</i> em função da pressão e a temperatura	77
Figura 5.3 - Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura para a <i>Drimys angustifolia</i>	78
Figura 5.4 - Gráfico de Pareto – <i>Cunila galioides</i> Benth.	79
Figura 5.5 - Gráfico da superfície de resposta para o rendimento global da <i>Cunila galioides</i> em função da pressão e a temperatura	79
Figura 5.6- Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura para a <i>Cunila galioides</i>	80
Figura 5.7 - Gráfico da tendência linear da relação entre rendimento e densidade do CO ₂ -SC para os extratos da <i>D. angustifolia</i>	82
Figura 5.8 - Gráfico da tendência linear da relação entre rendimento e densidade do CO ₂ -SC para os extratos da <i>C. galioides</i>	82
Figura 5.9 - Gráfico do efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico da <i>D. angustifolia</i>	83
Figura 5.10 - Gráfico do efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico da <i>C. galioides</i>	83

Figura 5.11 - Gráfico do efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da <i>D. angustifolia</i>	84
Figura 5.12 - Gráfico do efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da <i>C. galioides</i>	84
Figura 5.13 - Gráfico das curvas dinâmicas do processo de extração da <i>D. angustifolia</i> , à 182 bar e 35 °C.....	85
Figura 5.14 - Gráfico das curvas dinâmicas do processo de extração da <i>C. galioides</i> , à 200 bar e 40°C.....	86
Figura 5.15 – Foto da análise de cromatografia em camada delgada do extrato da <i>Drimys angustifolia</i>	88
Figura 5.16 - Espectro de RMN ¹ H do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> (300MHz).....	89
Figura 5.17 - Espectro de RMN ¹³ C do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> (125 MHz).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Propriedades críticas dos solventes utilizados nos processos de extração supercrítica.....	41
Tabela 4.1 - Codificação das variáveis para o planejamento Composto Central (DCC).....	54
Tabela 4.2 - Matriz do planejamento DCC, com valores reais, codificados e as respectivas densidades.....	55
Tabela 5.1 - Parâmetros do leito fixo.....	65
Tabela 5.2 - Rendimentos mássicos da extração da <i>Drimys angustifolia</i> com hexano, via soxhlet.....	66
Tabela 5.3 - Rendimentos mássicos da extração da <i>Drimys angustifolia</i> com etanol, via soxhlet.....	67
Tabela 5.4 - Rendimentos mássicos da extração da <i>Cunila galioides</i> com hexano, via soxhlet.....	67
Tabela 5.5 - Rendimentos mássicos da extração da <i>Cunila galioides</i> com etanol, via soxhlet.....	67
Tabela 5.6 - Composição química do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> obtido por soxhlet com hexano.....	68
Tabela 5.7 - Composição química do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> obtido por soxhlet com etanol.....	69
Tabela 5.8 - Composição química do extrato da <i>Cunila galioides</i>	70
Tabela 5.9 - Composição química do extrato da <i>Cunila galioides</i>	70
Tabela 5.10 - Rendimentos mássicos e volumétricos das extrações por hidrodestilação da <i>Drimys angustifolia</i>	71
Tabela 5.11 - Rendimentos mássicos e volumétricos das extrações por hidrodestilação da <i>Cunila galioides</i>	71
Tabela 5.12 - Composição química do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> obtido por hidrodestilação.....	72
Tabela 5.13 - Composição química do extrato da <i>Cunila galioides</i>	73
Tabela 5.14 - Resultados do planejamento DCC para a ESC da <i>Drimys angustifolia</i>	74

Tabela 5.15 - Resultados do planejamento DCC para a ESC da <i>Cunila galioides</i>	75
Tabela 5.16 - Estimativas dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta para a <i>Drimys angustifolia</i>	76
Tabela 5.17 - Estimativas dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta para a <i>Cunila galioides</i>	78
Tabela 5.18 - Composição química dos extratos supercríticos da <i>Drimys angustifolia</i> (% área) por GC-MS e os totais de compostos identificados e não identificados.	87
Tabela 5.19 - Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C para o composto poligodial, no estudo de Rodriguez et al., (2005) e no extrato <i>Drimys angustifolia</i>	90
Tabela 5.20 - Composição química dos extratos supercríticos da <i>Cunila galioides</i> (% área) por GC-MS e os totais de compostos identificados e não identificados.	91
Tabela 5.21 - Rendimentos globais das extrações de <i>D. angustifolia</i> obtidos por diferentes métodos.	92
Tabela 5.22 - Rendimentos globais das extrações de <i>C. galioides</i> obtidos por diferentes métodos.	92
Tabela 5.23 - Comparação dos compostos obtidos com as quatro técnicas de extração da <i>Drimys angustifolia</i>	94
Tabela 5.24 - Comparação dos compostos obtidos com as quatro técnicas extração da <i>Cunila galioides</i>	96
Tabela 5.25 - Concentração inibitória mínima (CIM), dos extratos supercríticos da <i>Drimys angustifolia</i> e da <i>Cunila galioides</i> frente as bactérias.	97
Tabela 5.26 - Concentração inibitória mínima (CIM), dos extratos supercríticos da <i>Drimys angustifolia</i> e da <i>Cunila galioides</i> frente aos fungos.....	98
Tabela 5.27 - Porcentagem de inibição das enzimas acetilcolinesterase e α-glicosidase, pelos extratos supercríticos da <i>Drimys angustifolia</i> e <i>Cunila galioides</i> , juntamente com os padrões.....	100
Tabela 5.28 - Distribuição dos insetos no interior do aparato do teste de repelência de contato.....	100

Tabela 5.29 - Número de insetos tombados no interior do aparato do teste de repelência de contato.	101
Tabela 5.30 - Número de insetos vivos e mortos, após 24 horas de exposição dos insetos à solução teste.	101
Tabela 5.31 - Distribuição dos insetos no interior do aparato do teste de repelência em ambientes (rota de fuga).....	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	31
3.2	MATRIZES VEGETAIS.....	32
3.2.1	<i>Drimys angustifolia</i> Miers (Casca d'anta).....	32
3.2.2	<i>Cunila galioides</i> Benth (Poejo do campo).....	33
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATOS NATURAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS.....	34
3.3.1	Atividades dos extratos e óleos essenciais.....	35
3.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	37
3.4.1	Extração por Hidrodestilação	38
3.4.2	Extração com Soxhlet.....	38
3.4.3	Extração com Fluidos Supercríticos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	MATÉRIAS-PRIMAS	48
4.1.1	Caracterização do leito de partículas	49
4.1.2	Distribuição granulométrica	49
4.1.3	Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade dos leitos (ϵ).	49
4.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	50
4.2.1	Extração com solventes (SOXHLET)	50
4.2.2	Extração por Hidrodestilação	51
4.2.3	Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico	52

4.2.4	Comparação entre as técnicas de extração	58
4.2.5	Avaliação das atividades dos extratos supercríticos.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS E DOS LEITOS.....	65
5.1.1	Determinação das densidades reais das partículas (ρ_r), densidades aparentes (ρ_a) e das porosidades dos leitos (ϵ)	65
5.1.2	Distribuições granulométricas.....	66
5.2	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	66
5.2.1	Extração com solventes (SOXHLET)	66
5.2.2	Extração por Hidrodestilação	70
5.2.3	Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico	74
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO ..	92
5.3.1	Comparação em relação aos rendimentos	92
5.3.2	Comparação em relação aos compostos presentes	93
5.4	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS	97
5.4.1	Atividade bactericida.....	97
5.4.2	Atividade fungicida.....	98
5.4.3	Atividades de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e α -glicosidase.....	99
5.4.4	Ação repelente e inseticida do extrato da <i>Drimys angustifolia</i> Miers frente o <i>Aedes aegypti</i>	100
6	CONCLUSÕES	103
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1 INTRODUÇÃO

É crescente o interesse do mercado consumidor por produtos sob o rótulo de “naturais”, ecologicamente corretos e que associem qualidade e preservação do meio ambiente. A obtenção de compostos naturais ativos provenientes de folhas, caules, sementes, frutos e outros é o foco de muitas pesquisas de desenvolvimento tecnológico em empresas farmacêuticas, alimentícias e cosméticas. O interesse das indústrias em encontrar antioxidantes, antimicrobianos, corantes, antitumorais, flavonoides, entre outros, vem aumentando significativamente. É crescente a procura de insumos naturais para a produção de alimentos, cosméticos e fármacos devido à quantidade de substâncias químicas sintéticas que vem sendo utilizadas pelas indústrias e principalmente pelo fato delas serem suspeitas de promover efeitos negativos à saúde (PEREIRA; MEIRELES, 2010; RAMÍREZ et al., 2007).

As pesquisas para o desenvolvimento tecnológico emergem como parcerias entre empresas, universidades e produtores rurais. Dentre estas parcerias, foi elaborado em 2012, o projeto Araucária + que surgiu da associação da Fundação Grupo Boticário e da Fundação CERTI (Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras). Este projeto utiliza o conceito de ecossistema de Inovação Verde, no qual todos os atores da cadeia produtiva são articulados em prol da produção sustentável de produtos nativos da Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou Floresta com Araucárias.

O objetivo geral do Projeto Araucária + é o de estruturar um ambiente de inovação para a conservação da FOM, com foco na valorização das cadeias produtivas do pinhão e da erva mate, por meio da incubação de uma equipe de profissionais que atuará como articulador/facilitador de um sistema integrado de produtores sustentáveis, mercado diferenciado, rede de Ciência & Tecnologia & Inovação, Políticas Públicas e investidores, resultando em geração de renda na base da pirâmide e externalidades positivas para o ecossistema natural.

O Brasil é o detentor da maior biodiversidade genética vegetal do mundo. Estima-se que o número de espécies existentes no Brasil seja de aproximadamente 1,8 milhão. Entretanto, o número de espécies conhecidas está em torno de 170 – 210 mil, indicando que apenas 11 % da biodiversidade brasileira já foi catalogada (SIBBR, 2015). Na busca por compostos bioativos, apenas 8 % da flora nacional foi estudada e 1.100 espécies vegetais avaliadas quanto as suas propriedades medicinais (SIMÕES, 2003). O Brasil importa 85 % dos princípios ativos para a

fabricação de medicamentos (CRF-PR, 2015). Assim, faz-se necessária a busca por alternativas que superem a dependência externa, tanto em termos de medicamentos, como de cosméticos e alimentos.

O Bioma Mata Atlântica ocupa a quinta posição no cenário mundial em termos de diversidade e endemismo de plantas vasculares (SIMÕES, 2003). Nesse bioma está a FOM, esta floresta apresenta alta diversidade, tanto em espécies, como em comunidades vegetais. Embora este ecossistema possua grande importância cultural, ambiental e econômica, devido a agropecuária e a exploração de madeira, ele vem passando por uma grande degradação. Dentre as espécies existentes neste bioma, com base nos conhecimentos populares, disponibilidades destas plantas, estudos publicados e a viabilidade de extraí-las, foram escolhidas para este trabalho as seguintes: *Drimys angustifolia* Miers, popular casca d'anta e a *Cunila galioides* Benth, popular poejo do campo. Ambas espécies possuem potencial medicinal, com grande quantidade de compostos ativos. Porém, ainda pouco estudados. Devido ao amplo espectro de utilização, geralmente extrativista, estas e outras espécies estão sendo reduzidas na natureza. (MARTINS-RAMOS et al., 2010)

Embora se tenha conhecimento da presença desses compostos ativos, eles são encontrados na forma de misturas complexas nos extratos das plantas e a sua separação e purificação é uma tarefa difícil e onerosa. Os processos de separação e purificação constituem um problema tecnológico importante, pois vários compostos naturais são degradados ou se transformam em substâncias indesejáveis quando expostos a temperaturas relativamente elevadas, impossibilitando a utilização de métodos de separação tradicionais, como a destilação. Separar esses compostos químicos naturais presentes em misturas de alta complexidade é um desafio, além de haver alto custo na implantação de um processo de separação. Paralelamente, métodos convencionais de extração com solventes orgânicos apresentam, também, graves inconvenientes, pois mesmo pequenas quantidades residuais destes solventes no material final podem ser incompatíveis com sua utilização para consumo humano (REVERCHON e DE MARCO, 2006; ZIBETTI, 2012).

A eficiência na separação de compostos naturais ativos é possível quando se utiliza extração supercrítica. Esta é uma técnica de separação que geralmente utiliza como solvente o dióxido de carbono em estado supercrítico, o qual possui parâmetros de aproximadamente 31 °C e 74 bar, nas vizinhanças do seu ponto crítico. Esse solvente é inerte, não tóxico e não inflamável. Este processo vem sendo largamente utilizado, devido suas baixas temperaturas de extração e facilidade de separação do extrato/solvente. A maior desvantagem que apresenta o CO₂ supercrítico

é a de possuir baixa polaridade, o que é ruim para a extração de compostos com alta polaridade. Para essa limitação, utilizam-se co-solventes, que em poucas quantidades podem melhorar a solubilidade do CO₂ supercrítico (GENENA, 2005; REVERCHON e DE MARCO, 2006). Além disso, a adição do co-solvente promove o aumento na seletividade devido à maior dependência do poder de dissolução com a temperatura e pressão (BRUNNER, 1994).

O caráter inédito deste trabalho está na obtenção do extrato e compostos ativos da *D. angustifolia*, utilizando a técnica de extração supercrítica. Na literatura não são encontrados dados sobre esse tipo de extração para esta planta. Os extratos da *Drimys angustifolia* e *Cunila galioides* são avaliados quanto as atividades bactericida, fungicida e de inativação enzimática da acetilcolinesterase e da α -glicosidase, enzimas que estão relacionadas as doenças de Alzheimer e Diabetes, respectivamente. Muitos compostos naturais são capazes de inibir estas enzimas. O extrato supercrítico da *Drimys angustifolia* também é avaliado quanto sua ação repelente e inseticida. Para análise e comparação dos resultados em relação aos rendimentos e seletividades, são utilizadas as técnicas de extração por hidrodestilação e soxhlet.

Para facilitar a apresentação, este trabalho encontra-se estruturado em capítulos. O capítulo 2 apresenta o objetivo geral e os específicos do estudo. O capítulo 3 faz uma revisão bibliográfica dos métodos de extração utilizados e das plantas casca d'anta e poejo do campo. No capítulo 4 são descritos os materiais e métodos utilizados na parte experimental do trabalho. No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos. Nos capítulos 6, 7 e 8 são apresentadas as conclusões, as sugestões para trabalhos futuros e as referências bibliográficas utilizadas nesta pesquisa, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos e compostos ativos das plantas *Drimys angustifolia* Miers, popular casca d'anta e da *Cunila galioides* Benth, popular poejo do campo, nativas do bioma FOM, utilizando a extração supercrítica com CO₂, que é uma tecnologia de extração limpa e ambientalmente segura e avaliar estes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar a técnica de alta pressão, extração com CO₂ supercrítico para a obtenção dos extratos da *D. angustifolia* e da *C. galioides*;
2. Determinar os melhores parâmetros operacionais (temperatura, pressão, rendimento e composição) de extração com CO₂ em estado supercrítico, que permitam a retirada de compostos ativos das matrizes vegetais;
3. Identificar os compostos majoritários nas matrizes vegetais;
4. Aplicar a técnica de hidrodestilação para a obtenção dos óleos essenciais da *D. angustifolia* e da *C. galioides*;
5. Empregar a técnica de baixa pressão, soxhlet, valendo-se do n-hexano e do etanol como solventes, para a obtenção dos extratos da *D. angustifolia* e da *C. galioides*;
6. Comparar as metodologias aplicadas, de acordo com a composição química do óleo essencial e dos extratos obtidos;
7. Avaliar as atividades bactericida, fungicida e inibição enzimática da acetilcolinesterase e α -glicosidase pelos extratos supercríticos *D. angustifolia* e da *C. galioides*;
8. Avaliar a ação repelente e inseticida do extrato supercrítico da *D. angustifolia*.

A seguir apresenta-se uma revisão bibliográfica relacionados às plantas medicinais, principalmente as utilizadas como objetos deste trabalho, aspectos sobre os óleos essenciais, extratos naturais e os métodos para a obtenção dos mesmos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo é apresentada uma revisão dos principais conceitos e temas abordados nesta pesquisa. Primeiramente são revisados aspectos relacionados às plantas medicinais, bem como as matrizes vegetais *D. angustifolia* Miers e *C. galioides* Benth. Também, fez-se uma revisão dos aspectos relacionados aos óleos essenciais e extratos naturais.

Na sequência são apresentados os métodos de extração de óleos essenciais utilizados neste estudo. E, por fim, é apresentado uma revisão sobre a extração supercrítica, abordando as principais características deste processo.

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por diversas culturas desde os primórdios da humanidade. Em sua composição possuem princípios ativos utilizados em diversos tratamentos, servindo de base para medicamentos fitoterápicos. Além disso, são aplicadas na elaboração de novos produtos na área de cosméticos, farmacêuticos, alimentos e perfumaria (MOURÃO MIGUEL, 2011). Segundo a OMS - Organização Mundial da Saúde (1998), planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos.

A aplicabilidade das plantas é atribuída a determinadas substâncias ou classes de substância presentes em seus extratos. Com os avanços tecnológicos nas áreas de cromatografia e espectrometria de massa, tem-se observado um grande aumento na identificação e separação de compostos, visando uma melhor aplicabilidade, direcionamento e consequentemente uma maior viabilidade econômica para estas plantas. Uma única planta pode conter substâncias como anti-inflamatórios que reduzem inchaço e dor, compostos fenólicos que podem agir como antioxidantes e venotônicos, substâncias diuréticas que melhoram a eliminação de resíduos e toxinas, taninos que agem como antibióticos naturais, e alcaloides que melhoram o humor e proporcionam sentimento de bem-estar (GURIB-FAKIM, 2006).

A biodiversidade brasileira é um estímulo natural ao uso de plantas medicinais e seus derivados sendo, portanto, de grande valor incentivar a pesquisa no setor de plantas medicinais e fitoterápicos.

3.2 MATRIZES VEGETAIS

3.2.1 *Drimys angustifolia* Miers (Casca d'anta)

O gênero *Drimys*, pertencente à família Winteraceae, é nativo da Mata Atlântica e composto por aproximadamente 120 espécies. Estas espécies encontram-se no Continente Americano, do México até o Sul da Argentina. No Brasil, este gênero ocorre ao longo da Mata Atlântica, da Bahia até o Rio Grande do Sul. As espécies *D. brasiliensis* Miers e *D. angustifolia* Miers apresentam-se em maior número dentro deste bioma (LORENZI, 1992).

A espécie *Drimys angustifolia* Miers, popularmente conhecida como casca de anta ou casca d'anta, é uma árvore grande, de copa pequena e aberta, com aproximadamente de 3 a 8 metros de altura. Ela é encontrada especificamente no Sul do Brasil, dentro da Floresta Ombrófila Mista. Esta floresta apresenta alta diversidade tanto em espécies como em comunidades vegetais.

Na medicina popular a casca da *Drimys angustifolia* Miers é usada como estomáquica, antiescorbútica, antidiarreica, sudorífica e tônica (SIMÕES, et al., 1986). Muitas famílias da região do planalto Catarinense utilizam a casca em pó, como condimento para carnes, substituindo a pimenta-do-reino. Na utilização farmacêutica é comercializada sob as formas de tintura e elixir, indicados em distúrbios do trato digestivo e como antifebril. O uso tradicional é baseado na decocção de 10 g de caules ou folhas secas e pulverizadas em 200 ml de água (TRINTA e SANTOS, 1997).

Estudos realizados “*In vivo*” e “*In vitro*” relatam atividades biológicas dos extratos das cascas e folhas da *Drimys angustifolia* Miers como atividade antiviral (GOMES et al., 2013), bactericida (SANTOS et al., 2013) e antiúlcera e antioxidante (WITAICENIS et al., 2007).

Sobre o gênero *Drimys*, alguns estudos farmacológicos foram relatados, dentre estes, a atividade antitumoral (CRUZ e SILVA, 1973), para a espécie *Drimys winteri*; ações analgésica, anti-inflamatória (MALHEIROS et al., 2005), anticonceptiva (CONCEIÇÃO et al., 2007) e atividade larvicida (RIBEIRO et al., 2008), para a *Drimys brasiliensis*. O gênero *Drimys* possui alto potencial medicinal e com grande quantidade de compostos ativos (MARTINS, 2009).

3.2.2 *Cunila galioides* Benth (Poejo do campo)

O gênero *Cunila*, pertencente à família Lamiaceae, totaliza 22 espécies, com dois centros de distribuição. Um centro de distribuição no México, com 10 espécies, e outro no sul da América do Sul, com 12 espécies autóctones, encontradas nas regiões altas do sul do Brasil. Estas espécies, são utilizadas na medicina popular como estimulantes, aromáticos, antipasmódicos, emenagogos e antitérmicos, no tratamento de tosse crônicas e infecções respiratórias (SIMÕES et al., 1998) e ainda como aromatizante da bebida tradicional do Rio Grande do Sul, o chimarrão (BORDIGNON et al., 1997). Além disso, os óleos essenciais do gênero *Cunila* apresentam atividades bactericida, inseticida e fungicida (LUZ et al., 2006). Esses são testados tanto em microrganismos utilizados em alimentos como no controle de insetos e bactérias patogênicas (SANDRI et al., 2007; APEL et al., 2009).

Dentre as espécies nativas do sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina está a *Cunila galioides* Benth, popularmente conhecida como poejo do campo. Essa espécie vive em ambientes úmidos dos campos de altitude e serras do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Botanicamente é uma planta herbácea, perene, muito ramificada desde a base. As folhas são opostas, simples, inteiras, oblongas, medindo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento e 0,15 a 0,20 de largura. As flores são de coloração violáceas, dispostas em espigas, em verticilos densos, na região terminal dos ramos. A planta floresce no outono entre março e abril.

Estudos realizados com a *Cunila galioides* Benth, utilizando a parte aérea, ou seja, flores e talos, demonstraram a existência de diferentes compostos majoritários para uma mesma espécie. Dentre os compostos foram identificados três quimiotipos, o primeiro apresentou alta concentração de citral, com duas formas isoméricas: neral e geranial, o segundo alta concentração de ocimeno e o último alta concentração de derivados de mentona. Esta variação pode estar relacionada com a localização geográfica das populações (ECHEVERRIGARAY et al., 2003).

O gênero *Cunila* apresenta uma grande variação nas composições dos óleos. No óleo da *Cunila incisa* o composto majoritário é o 1,8-cineol (BORDIGNON et al., 1996), enquanto que nos óleos da *Cunila fasciculata* e *Cunila microcephala* é o menthofurano (BORDIGNON et al., 1997). Já para a *Cunila angustifolia* os principais constituintes do óleo são sabineno, γ terpineno e limoneno (BORDIGNON et al., 1999). No estudo conduzido por Agostini (2008), o óleo essencial obtido de *Cunila*

incana apresentou baixa concentração de monoterpenos (20,66%), alta de sesquiterpenos (59,94%) e apenas um terpeno oxigenado (palustrol).

Os dados apresentados mostram a grande variabilidade existente quanto à composição dos óleos essenciais dentro das espécies do gênero *Cunila*, bem como da espécie *Cunila galioides* e o potencial delas como plantas aromáticas e medicinais.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATOS NATURAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS

O metabolismo das plantas está dividido em primário e secundário. O metabolismo primário produz substâncias essenciais para a sobrevivência das plantas, tais como: carboidratos, lipídeos, aminoácidos, acetilcoenzima A, nucleotídeos e outros (PERES, 2004). No metabolismo secundário são sintetizadas e acumuladas substâncias responsáveis pela adaptação das plantas ao meio em que vivem como: defesa contra patógenos e predadores, adaptações a mudanças climáticas bruscas, inibição de germinação e outros. Do metabolismo secundário originam-se substâncias naturais, que podem ser utilizadas por diferentes indústrias, como por exemplo farmacêutica (fármacos: taxol, efedrina), alimentícia (aromatizantes e corantes naturais), cosmética (cânfora, linalol), química entre outras (AGOSTINI G, 2008).

Dentre os metabólitos secundários, um dos grupos mais importantes de matérias-primas são os óleos essenciais. Segundo a ISO - International Standard Organization os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor de água, como também os obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

A composição e a qualidade dos óleos essenciais variam de acordo com a sua localização na estrutura vegetal, época da colheita, localização geográfica, características genéticas da planta, tipo de extração e outros (ECHEVERRIGARAY et al., 2003; AGOSTINI G, 2008; PEREIRA e MEIRELES, 2010).

Os óleos essenciais, geralmente consistem de misturas complexas de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, como também podem conter diterpenos. Outros compostos que podem estar presentes em extratos vegetais são ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, esteróis e flavonoides (REVERCHON, 1997). Segundo Brusotti et al., (2014) o aroma característico dos óleos essenciais e sua atividade biológica são oriundas

de substâncias lipofílicas, ou seja, monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados .

3.3.1 Atividades dos extratos e óleos essenciais

O conhecimento das diferentes atividades dos extratos e óleos essenciais é de suma importância para posteriores aplicações. A maioria das atividades conhecidas são de compostos isolados, entretanto, em misturas de compostos como por exemplo nos extratos, estas atividades muitas vezes são desconhecidas.

Na área farmacêutica existem muitos fármacos sintéticos que são utilizados na cura, retardo, ou mesmo manutenção de muitas doenças. Estes compostos sintéticos muitas vezes podem ser substituídos por extratos naturais, compostos bioativos, exigindo, portanto, pesquisas nestas áreas. Uma das estratégias que podem ser adotadas para o tratamento de doenças é a inibição de enzimas que possuem papel chave no processo fisiopatológico. Exemplos disso são as enzimas acetilcolinesterase (AChE), relacionado à doença de Alzheimer (REITZ e MAYEUX, 2014) e α -glicosidase, relacionado ao Diabetes mellitus (GALTIER, 2010).

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva, que se caracteriza, pela diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh), neurotransmissor importante para a memória. O tratamento mais utilizado para inibir os déficits cognitivos consiste no uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) - enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, baixando ainda mais seu nível no cérebro. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo mensagens de um neurônio a outro. Portanto, a inibição desta enzima possibilitará a permanência da acetilcolina, conduzindo a um acréscimo da comunicação entre as células nervosas, o que por sua vez, pode temporariamente, melhorar ou estabilizar os sintomas da demência. Muitos compostos de origem natural são capazes de inibir esta enzima (SIEBERT et al., 2016).

O Diabetes mellitus consiste em uma síndrome metabólica caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea (hiperglicemia), causados pela resistência à ação ou deficiência na secreção do hormônio insulina, ou ainda pela ocorrência concomitante destas condições clínicas. A enzima α -glicosidase, tem a função de fracionar a sacarose, o amido e a maltose, aumentando o açúcar no sangue. Portanto, a inibição desta enzima, faz retardar a digestão destes carboidratos, reduzindo o aumento

pós-prandial da glicemia (ALVES DA CONCEIÇÃO et al., 2017; GALTIER, 2010).

Existem na literatura várias pesquisas sobre extratos naturais com ou sem potenciais de inibição enzimática. Souza (2011) não encontrou dentro dos 37 extratos, entre eles, hexânicos, etanólicos e aquosos, de 14 espécies do cerrado, algum que inibisse a ação da enzima acetilcolinesterase. Já para a enzima α -glicosidase, os extratos do gênero *Pouteria*, *S. adstringens* e *E. dysenterica*, apresentaram elevado potencial de inibição. Mota et al. (2012) avaliaram a atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) de extratos aquosos e etanólicos de oito plantas utilizadas na medicina popular da região Nordeste do Brasil. Como resultado eles obtiveram o extrato aquoso de *Vitex agnus-castus* L. como o mais eficaz quanto a inibição da AChE, cerca de 74% de inibição.

Em diversas áreas, em especial, farmacêutica e cosmética, a utilização de produtos bactericidas e fungicidas é de suma importância, entretanto a maioria utilizada é de origem sintética, fazendo-se necessário aumentar as pesquisas em busca de produtos naturais com estas características (FENNER et al., 2006; YUNES, R. A. et al., 2001). Fenner et al. em 2006, realizaram um levantamento bibliográfico etnobotânico sobre plantas utilizadas pela população brasileira no tratamento as infecções fúngicas. Foram citadas 409 espécies, distribuídas em 98 famílias, com maior concentração em *Fabaceae* e *Asteraceae*. Porém, entre as 10 espécies com maior número de citações, a maioria não pertence a estas famílias. Considerando a necessidade premente de novos antifúngicos eficazes e que, reconhecidamente, o estudo da utilização popular de plantas medicinais é uma ferramenta importante no descobrimento de novos fármacos.

Há uma grande tendência que vem aumentando nos últimos anos que é a utilização de repelentes naturais, com bioativos de extratos e óleos essenciais, por apresentarem baixa toxicidade e não agredirem o meio ambiente. Em especial pesquisas com repelentes para o mosquito *Aedes aegypti*, visto que existe um grande número de morte provocadas por este mosquito (TAVARES et al., 2018). Existem muitos artigos publicados na literatura a respeito de atividade larvicida dos óleos essenciais e alguns com avaliação de repelência. O óleo essencial da *Lippia organoides* Kunth foi avaliado contra três pragas comumente encontradas em países subtropicais: *Tetranychus urticae* Koch (ácaros), *Cerataphis lataniae* Bois (pulgões) e *Aedes aegypti* Linn (larvas). Os resultados demonstraram que a *Lippia* apresenta atividades acaricidas e inseticidas contra os *Tetranychus urticae* Koch e *Cerataphis lataniae* Bois. (MAR et al., 2018). Baskar et al. (2018) avaliaram a atividade larvicida e repelente do

óleo essencial da *Atalantia monophylla* contra três espécies de mosquitos, *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. O óleo essencial de *A. monophylla* apresentou boa atividade repelente e larvicida contra as três espécies de mosquito testadas.

Chellappandian et al. (2018) compilaram os resultados de diversas pesquisas, em uma revisão, sobre a utilização de óleos essenciais com possíveis atividades inseticidas, larvicida e repelentes, neste trabalho os autores descreveram vários estudos com suas respectivas plantas, compostos bioativos principais e a espécie do mosquito testada, entretanto sobre o gênero *Drimys* não foram apresentados.

Os extratos e/ou óleos essenciais são produtos de grande interesse comercial, como observado anteriormente, devido a vasta aplicabilidade nas indústrias cosméticas, farmacêuticas, de perfumaria e alimentícias. A extração dos óleos essenciais pode ser realizada por diversos métodos como por exemplo, extração por hidrodestilação, arraste a vapor, destilação a seco e prensagem mecânica a seco (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Para a obtenção dos extratos um dos métodos utilizados é a extração com fluidos supercríticos, onde são retirados não só de compostos de baixo peso molecular, mas também compostos de alto peso molecular, fazendo-se necessário o fracionamento posterior para separar os compostos.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração de compostos bioativos de plantas pode ser realizada por métodos convencionais como por exemplo: hidrodestilação, soxhlet, destilação por arraste à vapor e maceração e não convencionais: extração supercrítica, extração com ultrassom, com microondas, com enzimas, entre outros. Segundo Azmir et al., (2013) não existe ainda um método considerado padrão para a extração destes compostos. A eficiência dos métodos de extração depende principalmente do conhecimento da matriz da planta, dos compostos bioativos a serem extraídos e da finalidade da extração: qualitativa ou quantitativa (BISCAIA, 2007). A viabilidade das tecnologias não convencionais normalmente é medida comparando-se os seus rendimentos e seletividades com os resultados obtidos com os métodos convencionais (AZMIR et al., 2013).

Neste trabalho optou-se pela extração de hidrodestilação, soxhlet e com fluido supercrítico com CO₂ puro.

3.4.1 Extração por Hidrodestilação

A hidrodestilação é um método tradicional de extração de compostos bioativos e óleos essenciais e considerado um dos mais antigos utilizados em escala laboratorial e industrial (JELEN e GRACKA, 2015). Neste tipo de extração não são utilizados solventes orgânicos e não é necessário a secagem do material vegetal. A desvantagem desta técnica é a utilização de temperaturas elevadas, que limita seu uso para extração de compostos termosensíveis (AZMIR et al., 2013; PEREIRA e MEIRELES, 2010) e pode acarretar na hidrólise de compostos sensíveis à água, alterando suas propriedades e ocasionando odores desagradáveis. Esta técnica extrai apenas óleos essenciais o que resulta em baixos rendimentos de extração (SOARES, 2017).

3.4.2 Extração com Soxhlet

A extração com soxhlet tem sido amplamente utilizada para a extração de compostos bioativos. A primeira utilização deste método foi proposta pelo químico alemão Franz Ritter Von Soxhlet em 1879, para a extração de lipídeos. A metodologia de utilização é bastante simples, o que facilita seu uso em testes laboratoriais. É muito empregado como modelo para a comparação com outras técnicas (AZMIR et al., 2013).

As principais vantagens da extração com soxhlet são: alto rendimento; matriz vegetal colocada em contato com o solvente, por meio da recirculação, durante todo o processo, facilitando a transferência de massa; não é necessário a filtração, ao final da extração; equipamento de fácil manuseio o que facilita seu uso e poucas perdas. Entretanto, as desvantagens principais são: baixa seletividade, o poder de dissolução é determinado pela natureza do solvente e temperatura de extração; altas temperaturas utilizadas e o longo tempo de processo podendo levar a decomposição de compostos e necessidade de eliminação do solvente após a extração (LUQUE DE CASTRO et al., 1998; LUQUE DE CASTRO et al., 2010; WANG et al., 2010).

Atualmente, a limitação deste método convencional está atrelada às restrições legais com respeito a resíduos de solventes orgânicos, tanto por questões ambientais como de saúde humana, impossibilitando sua aplicação em cosméticos, fármacos, alimentos, entre outros, restringindo o uso apenas para caracterização de matérias-primas e como parâmetro para comparação com novas tecnologias de extração (KNEZ et al., 2014).

3.4.3 Extração com Fluidos Supercríticos

O interesse por processos tecnológicos alternativos, com baixo impacto ambiental vem crescendo nos últimos anos. Estas novas tecnologias, visam além de produtos finais com melhor qualidade e segurança, redução do consumo de energia, geração de resíduos menos tóxicos e melhor utilização dos subprodutos (KNEZ et al., 2014; REVERCHON, 1997). A extração com fluido supercrítico (ESC) é um exemplo destas tecnologias com baixo impacto ambiental.

Os processos que utilizam fluidos supercríticos, apresentam como uma das principais aplicabilidade a obtenção e descoberta de princípios ativos a partir de fontes naturais como plantas, algas, microalgas, fungos entre outros (SOARES, 2017). Como vantagens, estes processos apresentam a utilização de temperaturas relativamente baixas, preservando a qualidade de compostos termosensíveis, obtenção de produtos livres de solventes e com alto valor agregado e também a separação do solvente, por simples expansão do gás, com fácil recuperação e reutilização, sem a necessidade de uma purificação. Outra vantagem é a facilidade em ajustar as propriedades termofísicas dos fluidos, ou seja, viscosidade, difusividade, densidade ou a constante dielétrica com a uma simples alteração do binômio pressão-temperatura (KNEZ et al., 2014; MARANGONI, 2011).

A tecnologia da ESC utiliza como solvente substâncias em seu estado supercrítico, ou seja, sob condições de temperatura e pressão acima ou próximas do seu ponto crítico (T_c e P_c). Ela pode ser aplicada para matrizes sólidas, semisólidas ou líquidas. O processo da extração ocorre em duas etapas, a primeira, onde acontece a extração propriamente dita, o fluido supercrítico escoar através de um leito fixo de partículas dissolvendo os componentes extraíveis. Na segunda etapa, a mistura dos componentes extraídos juntamente com o solvente é encaminhada ao separador. Nesta etapa a mistura passa por uma válvula de depressurização, onde a pressão é reduzida à pressão atmosférica, ocasionado a vaporização do solvente e a precipitação do extrato. Os componentes extraídos são então coletados e posteriormente analisados (ARAUCO M., 2014; REVERCHON e DE MARCO, 2006; BRUNNER, 1994).

A técnica da ESC vem sendo desenvolvida nos últimos anos em diversos países, motivada pela possibilidade de aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, além de outras aplicações minoritárias (SOARES, 2017).

3.4.3.1 Fluidos Supercríticos

A aplicação de um fluido supercrítico para fins de extração foi descoberta por Hannay e Hogarth em 1879, mas foi Zosel em 1964, que apresentou uma patente para a descafeinar o café, usando fluido supercrítico (AZMIR et al., 2013).

Uma substância para ser considerada supercrítica, sua temperatura e pressão precisam estar acima do seu ponto crítico. O ponto crítico é definido como o ponto onde acima desta temperatura (T_c) e a pressão (P_c) não há distinção entre as fases líquida e gasosa. No estado supercrítico, as propriedades específicas dos gases e/ou líquidos desaparecem, o que significa que o fluido supercrítico não pode ser liquefeito com o aumento da pressão e os gases não podem ser formados com o aumento da temperatura. A temperatura crítica é a temperatura mais alta na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. E a pressão crítica é a pressão mais alta na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura (AZMIR et al., 2013; BRUNNER, 1994).

Um fluido supercrítico apresenta boas propriedades físicas de transporte de massa que realçam sua utilização como solvente para extração. Estas propriedades decorrem da densidade e poder de solvatação serem próximas as do líquido e da viscosidade e difusividade serem próximas ao seu estado gasoso. A densidade do fluido supercrítico está diretamente ligada ao seu poder de solvatação, ou seja, quanto maior a densidade, maior a massa de fluido por unidade de volume, ocasionando uma maior interação soluto-fluido (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A densidade e a viscosidade diminuem com o aumento da temperatura, enquanto que a difusividade aumenta, para uma determinada pressão. Já para uma dada temperatura, aumentando-se a pressão, a difusividade, viscosidade e densidade, se aproximam às do estado líquido. A tensão superficial de um fluido supercrítico é praticamente nula, permitindo melhor penetração na matriz da amostra, aumentando-se a eficiência da extração (SALGIN et al., 2006; VEGGI et al., 2011).

As propriedades termofísicas podem ser ajustadas modificando-se temperatura e pressão do fluido, as variações destas propriedades são mais pronunciadas em regiões próximas ao ponto crítico (SALGIN et al., 2006). Para fluidos ligeiramente acima de sua temperatura crítica, densidades próximas a do líquido são rapidamente alcançadas com pequenas elevações da pressão; já para temperaturas muito superiores à temperatura crítica, grandes aumentos na pressão são necessários para se chegar a essas mesmas densidades (TAYLOR, 1996).

A seleção dos parâmetros operacionais para uma extração supercrítica é uma etapa muito importante e exige também, o conhecimento das famílias dos compostos presentes da matéria-prima. Muitas substâncias podem ser utilizadas com solvente em uma extração supercrítica. Porém, o que irá determinar o solvente mais adequado serão as propriedades críticas, a toxicidade, o custo, polaridade e o poder de solvatação. Na tabela 3.1 pode-se observar alguns tipos de solventes e suas propriedades críticas.

Tabela 3.1 - Propriedades críticas dos solventes utilizados nos processos de extração supercrítica.

<i>Solvente</i>	<i>Temperatura crítica (°C)</i>	<i>Pressão crítica (bar)</i>	<i>Volume crítico (cm³/mol)</i>
Amônia	132,2	113,5	72,5
CO ₂	31,1	73,8	94,1
Éter dimetil	127,0	52,7	171,0
Etanol	32,2	48,7	145,5
Etileno	9,2	50,4	131,0
Metanol	239,4	80,9	118,0
n-Hexano	234,4	30,2	368,0
Propano	96,6	42,5	200,0
Água	374,0	220,6	55,9
Xenon	17,0	58,0	118,0

Fonte: Pereira e Meireles (2010).

A água em alta pressão tem sido utilizada em matrizes como: solo, madeira e alimentos, as propriedades de mudanças físico-químicas da água são estudadas, para extrair os solutos desejáveis. O etanol vem sendo investigado devido à proximidade da sua temperatura crítica com a do dióxido de carbono (CO₂) e sua boa aplicabilidade em produtos alimentícios termosensíveis. O éter dimetílico e o propano, propano, vêm sendo estudados como solventes alternativos. Ambos têm pressões mais baixas que a pressão crítica do CO₂. (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

O CO₂ é o solvente mais utilizado na extração supercrítica, aproximadamente 90 % da extrações realizadas (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007). Isto deve-se porque além de ser atóxico, não inflamável e apresentar condições críticas amenas (aproximadamente 31,1 °C e 73,8 bar) possui um custo relativamente baixo e pode ser encontrado em abundância com alta pureza (REVERCHON e DE MARCO, 2006; TAYLOR, 1996). Além disso, o CO₂ apresenta alta volatilidade (o que facilita sua separação do extrato), alta difusividade

(proporcionando maior penetração na matriz sólida), baixa viscosidade e pequena entalpia de vaporização (BRUNNER, 1994).

Embora o CO₂ atue de forma satisfatória na extração de compostos ativos presentes em produtos naturais, o fato de o mesmo ser uma substância apolar o torna um solvente não muito eficiente na extração de compostos polares. Os hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos com polaridade relativamente baixa, como por exemplo, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e latonas são extraídos facilmente com CO₂ supercrítico a baixas pressões, em torno de 75 e 100 bar, onde substâncias moderadamente polares, como derivados de benzeno com um grupo carboxílico e dois grupos hidroxilas, são moderadamente solúveis. Compostos altamente polares, com um grupo carboxílico e três ou mais grupos hidroxilas são pouco solúveis. Para a extração de certa classe de compostos, faz-se necessário o uso de co-solvente junto ao CO₂ supercrítico para aumentar a polaridade e o poder de solvatação do solvente. Etanol, acetato de etila e água são os co-solventes mais utilizados na obtenção de produtos alimentícios (ARAUCO M., 2014; REVERCHON e DE MARCO, 2006; TAYLOR, 1996).

3.4.3.2 Parâmetros importantes de uma extração supercrítica

A pressão e a temperatura são consideradas os parâmetros mais relevantes do processo de extração supercrítica, sendo que as mesmas podem ser utilizadas para modular a seletividade do fluido supercrítico. Como regra geral, quanto maior a pressão, maior o poder do solvente e menor a seletividade de extração (BRUNNER, 1994). Pressões mais amenas de 90 a 120 bar, aproximadamente, são necessárias para a extração dos componentes dos óleos essenciais da matriz vegetal, enquanto pressões acima de 120 bar são empregadas para se obter, não só óleos essenciais mas também compostos ativos presentes na planta (SOARES, 2017).

A influência da temperatura sobre a solubilidade de uma substância em um solvente supercrítico é mais difícil de prever do que a da pressão. O aumento da temperatura acarreta dois efeitos contrários em relação a solubilidade. Em um primeiro momento, o aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂-SC a uma pressão constante, reduzindo assim o poder solvente do fluido. Em um segundo momento o aumento da temperatura aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, aumentando a solubilidade.

Quando se tem padrões de pressão elevados, o efeito que predomina é o aumento da solubilidade, e em pressões pouco acima do

ponto crítico predomina a redução da solubilidade (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Alguns pesquisadores sugerem intervalos de temperatura para a extração supercrítica. Segundo Reverchon e de Marco (2006) deve-se utilizar entre 35 e 60 °C, já para Fornari et al. (2012) a sugestão é de uma faixa um pouco menor, de 35 a 50 °C, ou seja bem próximo ao ponto crítico, preservando assim os compostos termosensíveis presentes nos óleos essenciais.

Outros fatores também podem influenciar nos resultados das extrações supercríticas, são eles, tamanho da partícula, forma, superfície, porosidade, umidade, nível de solutos extraíveis e a natureza da matriz vegetal.

A estrutura física da matriz é um fator importante, visto que a eficiência da extração vai depender de como o fluido difundir-se-á dentro desta matriz. Por isto, que as condições de extração de um mesmo composto irão variar de uma matriz para outra. Geralmente, diminuindo-se o tamanho das partículas do leito tem-se uma maior área de contato do solvente com o soluto e uma extração mais eficiente. Entretanto, moagem excessiva pode prejudicar o processo devido à reabsorção dos compostos de interesse dentro da superfície da matriz, e que pode ocasionar queda de pressão dentro do extrator, devido à formação de caminhos preferenciais no interior do leito e parte do solvente flui pelos canais formados sem ter contato com o soluto. A formação dos caminhos preferenciais pode ocorrer em leitos muito compactados, especialmente quando o tamanho de partícula for menor do que 0,4 mm e/ou quando o diâmetro do extrator é grande; esse fato leva a uma redução drástica no desempenho do processo (SOVOVÁ, 2012). Para produtos naturais, o tamanho de partícula utilizado nos leitos de extração supercrítica varia de 0,25 a 1,80 mm (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

3.4.3.3 Curvas de extração

Os processos de extração com fluido supercrítico podem ser representados por curvas típicas de extração. Estas curvas expressam a taxa de extração, ou seja, no eixo das ordenadas é plotado o rendimento de extração e no eixo das abscissas o tempo ou massa de solvente ou ainda a razão mássica de solvente/matéria-prima. Os dados experimentais são obtidos da dinâmica do processo. Estas curvas são úteis no caso de uma ampliação de escala do processo. Entretanto, Del Valle (2015) evidenciou que nem sempre as curvas coincidem para as escalas laboratoriais, pilotos e industriais, a relação entre rendimento e o tempo de extração depende

de variáveis específicas de cada escala, como tamanho do leito, número de extratores para plantas industriais entre outros.

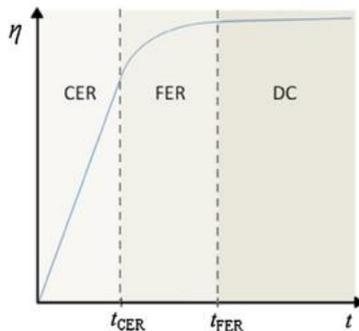
Com uma curva de extração pode-se compreender melhor os mecanismos que controlam a transferência de massa (TM) em diferentes estágios da extração. No início da extração, o mecanismo que controla o processo é convecção, visto que o soluto fica disponível na superfície das partículas. Quando este soluto se esgota, o mecanismo que passa a controlar o sistema é a difusão, uma vez que os compostos a serem extraídos agora estão no interior das partículas (SOARES, 2017).

Na etapa de extração a matriz vegetal absorve o fluido supercrítico, inchando sua estrutura celular, membranas e dilatando os canais intercelulares, conduzindo a uma redução na resistência à transferência de massa, simultaneamente o extrato dissolve-se e ocorre a transferência de massa, devido ao gradiente de concentração, do interior da matriz vegetal para sua superfície e desta para o solvente/fluido supercrítico (BRUNNER, 1994).

Diversas informações fornecidas pelas curvas e extração permitem a comparação entre diferentes experimentos, com uma mesma matriz vegetal e no mesmo equipamento, bem como a determinação do volume do extrator e a vazão do solvente (SOARES, 2017).

As curvas de extração globais são caracterizadas por muitos pesquisadores, em três etapas, cada uma caracterizada pelo domínio de uma massa específica ou combinada à mecanismos de transferência. Na figura 3.1 está representada esta curva.

Figura 3.1 - Curva típica de extração com fluido em estado supercrítico.



Fonte: De Melo et al., (2017).

CER - *Constant Extraction Rate* ou Período de taxa de extração constante: o soluto está presente em grandes quantidades na superfície das partículas da matriz. A inclinação da curva é dada pela solubilidade do soluto no solvente. Nesta etapa o mecanismo predominante de transferência de massa é a convecção, onde o processo é controlado pelo fluxo do solvente.

FER - *Falling Extraction Rate* ou Período de taxa de extração decrescente: a camada de soluto facilmente acessível sobre a superfície das partículas começa a se esgotar, nesta etapa algumas partículas já não possuem mais soluto na superfície, o que faz a transferência de massa diminuir. Neste período inicia-se o mecanismo de difusão, que atuará juntamente com o de convecção.

DC - *Diffusion-Controlled* ou Período de baixa taxa de extração: o soluto não está mais facilmente acessível na superfície da partícula. O mecanismo que controla a taxa de extração é principalmente a difusão do soluto no interior das partículas sólidas, seguido pela dispersão da mistura soluto/solvente na superfície das partículas.

Para muitos processos, o tempo de extração é definido como o fim da etapa CER, visto que neste período, de 50 a 90% da quantidade total de extrato é obtida, exceto em extrações onde o composto requerido não seja muito solúvel no fluido supercrítico ou esteja localizado em estruturas celulares de difícil acesso (PEREIRA e MEIRELES, 2010). Segundo estes pesquisadores, as melhores condições operacionais de uma extração, são aquelas onde obtêm-se os maiores rendimentos de óleo em um tempo relativamente curto, ou seja, no período CER.

A seguir serão apresentados os materiais utilizados e métodos empregados na parte experimental desta pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas todas as etapas realizadas no presente trabalho. Desde insumos, equipamentos e procedimentos utilizados para a obtenção, caracterização e avaliação dos extratos da *Cunila galioides* Benth e *Drimys angustifolia* Miers. A figura 4.1 apresenta os passos realizados neste estudo.

Figura 4.1 - Diagrama de fluxo das atividades realizadas no presente estudo.



Fonte: Autora

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As plantas utilizadas neste trabalho foram coletadas na área rural do município de Urupema/SC (latitude 27° 54' S e longitude 49° 47' W), entre os meses de fevereiro e abril de 2016. A própria autora, juntamente com o dono da propriedade, Professor Júlio César Pires Santos realizaram as coletas e o transporte do material para o Laboratório de Controle e Processos Poliméricos - LCP, do Departamento da Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - EQA, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Para a planta *C. galioides* Benth, as partes utilizadas no trabalho foram flores e talos. Para a *D. angustifolia* Miers foram utilizadas apenas as folhas.

As matérias-primas recebidas foram submetidas à secagem em estufa a 35°C por aproximadamente 72 h. Em seguida moídas em moinho de facas (MA580, Marconi, Brasil). O material particulado foi peneirado (Mesh Tyler 35 [0,500 mm], Mesh Tyler 45 [0,355 mm], Mesh Tyler 60 [0,250 mm], Mesh Tyler 70 [0,212 mm] e Mesh Tyler 80 [0,180 mm]). Logo após suas frações foram separadas, pesadas em balança analítica para análise granulométrica, colocadas em embalagens de polietileno e estocada em refrigerador doméstico (Brastemp, Modelo Frostfree, Brasil) sob temperaturas de aproximadamente 5 °C. Antes de cada extração, o material foi colocado em estufa à 35 °C, por 30 minutos, para retirada da umidade. Este procedimento foi validado anteriormente, verificando-se o teor de umidade das plantas e mantendo o mesmo padrão de umidade.

Na figura 4.2 pode-se observar as fotografias das plantas (A) *Drimys angustifolia* Miers e (B) *Cunila galioides* Benth, secas/moídas e antes da colheita.

Figura 4.2 - Fotografias (A) *Drimys angustifolia* Miers e (B) *Cunila galioides* Benth, secas/moídas e antes da colheita.



(A) *Drimys angustifolia* Miers

(B) *Cunila galioides* Benth

Fonte: Autora

4.1.1 Caracterização do leito de partículas

A caracterização do leito de partículas é necessária para avaliação das propriedades de transportes. Esta caracterização é obtida pela determinação características físicas e morfológicas do leito, como massa específica dos sólidos e porosidade do leito.

4.1.2 Distribuição granulométrica

As matérias-primas moídas foram classificadas em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, SP) para determinação da distribuição do tamanho de partículas. Foram utilizadas peneiras com Mesh 35, 45, 60, 70, 80 e fundo. As massas retidas sobre as peneiras foram pesadas para posterior cálculo do diâmetro médio de partícula. Foram desprezadas as de 35 Mesh e as do fundo.

4.1.3 Determinação da densidade real das partículas (ρ_r), densidade aparente (ρ_a) e da porosidade dos leitos (ϵ).

As densidades reais (ρ_r) ou absolutas das matrizes vegetais secas foram determinadas no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), pelo método de picnometria de gás hélio.

Neste método, o gás hélio penetra nos menores poros do material sólido e nos espaços vazios entre as partículas, garantindo maior precisão.

A densidade aparente (ρ_a) do leito de partículas de cada planta, foi calculada por meio da medida de massa da *D. angustifolia* e da *C. galioides* suficientes para ocupar um recipiente de volume conhecido, no caso, o extrator utilizado nos experimentos em meio supercrítico, com volume igual a 10 cm³. Essas medidas são expressas em g/cm³.

As porosidades totais dos leitos (ε) das partículas de *D. angustifolia* e de *C. galioides* foram calculadas utilizando a massa específica real das partículas e a massa específica aparente do leito, conforme a equação 4.1.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad \text{Equação 4.1}$$

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

As técnicas de extração utilizadas neste trabalho foram de alta e baixa pressão. As extrações com alta pressão foram as extrações com dióxido de carbono no estado supercrítico puro. Os métodos com baixa pressão foram em soxhlet e hidrodestilação.

4.2.1 Extração com solventes (SOXHLET)

A extração por Soxhlet foi realizada no LATESC-EQA-UFSC, segundo o método do IAL - Instituto Adolfo Lutz, (2008) para quantificar o extrato da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* utilizando n-hexano PA (ρ 20 °C = 0,659 g/cm³ e T_{ebulição} = 68,7 °C) e etanol PA (ρ 20 °C = 0,789 g/cm³ e T_{ebulição} = 78,4 °C) como solventes.

O aparato para a extração, consiste de um condensador Allihn, conectado a um extrator tipo Soxhlet (com sifão para saída do solvente contendo o extrato) e este a um balão de vidro de 250 mL de volume, com 150 mL de solvente (figura 4.3). Na câmara do extrator, foram introduzidos os cartuchos de papel-filtro contendo as amostras das plantas (cerca de 5 g). Antes das extrações, os cartuchos foram submetidos à secagem em estufa a 35 °C por 24 h para que não houvesse imprecisões nas pesagens devido à umidade das amostras e do papel-filtro. A pesagem foi realizada imediatamente após a retirada da estufa e antes da sua introdução no extrator.

O sistema foi acoplado a uma manta de aquecimento, para a ebulição do solvente. O balão foi coberto com papel alumínio para evitar a dissipação de energia e manter um maior controle da temperatura de aquecimento. As extrações com cada um dos solventes, foram realizadas em triplicata, por 5 horas cada. Das três amostras de cada solvente, foram escolhidas aleatoriamente duas para as retiradas de alíquotas de 30 mL cada. Estas foram acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas à -4 °C, em freezer doméstico, para posteriores análises. Os restantes dos extratos presentes nos dois balões e no terceiro, para cada solvente, foram

rotaevaporados em rotaevaporador (BUCHI R-100) para eliminação do solvente e posterior cálculo do rendimento do óleo obtido.

Figura 4.3 - Aparatos da extração em Soxhlet.



Fonte: Autora

4.2.2 Extração por Hidrodestilação

As extrações por hidrodestilação foram realizadas utilizando-se um aparelho tipo Clevenger, figura 4.4. O método utilizado foi proposto por Santos et al. (2004), com algumas adaptações. Foram pesados aproximadamente 30 g de cada planta seca e moída, em balança analítica e dispostas separadamente em balão de fundo redondo com capacidade para 1000 mL, contendo 500 mL água destilada utilizada como solvente e algumas pequenas esferas de vidro. Cada balão foi conectado a um aparelho Clevenger e este acoplado a sua respectiva manta de aquecimento para elevar à temperatura de ebulição do solvente (100 °C).

O sistema operou em circuito fechado por 6 horas, tempo necessário para que o volume de óleo em cada tubo graduado do equipamento permanecesse constante. As esferas de vidro serviram para quebrar o borbulhamento intenso, evitando que os conteúdos líquidos dos balões atingissem os aparatos Clevenger.

Figura 4.4 - Aparelho tipo Clevenger



Fonte: Autora

Ao final do processo, a leitura dos volumes dos óleos obtidos foi realizada diretamente na coluna graduada de cada aparelho. As válvulas dos aparelhos Clevenger então foram abertas, permitindo o escoamento da água e as coletas dos óleos obtidos em frascos âmbar de 10 mL com tampa e batoque, previamente pesados. O experimento para cada planta *D. angustifolia* e *C. galioides* foi realizado em triplicata.

4.2.3 Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico

As extrações com dióxido de carbono em estado supercrítico foram realizadas no LCP, no EQA-UFSC. O equipamento utilizado foi um HPLC-SC da Jasco Inc, com opção de extração e cromatografia supercrítica, o qual está apresentado na figura 4.5.

Figura 4.5 - Unidade de extração supercrítica do Laboratório de Controle de Processos Poliméricos: HPLC-SC.

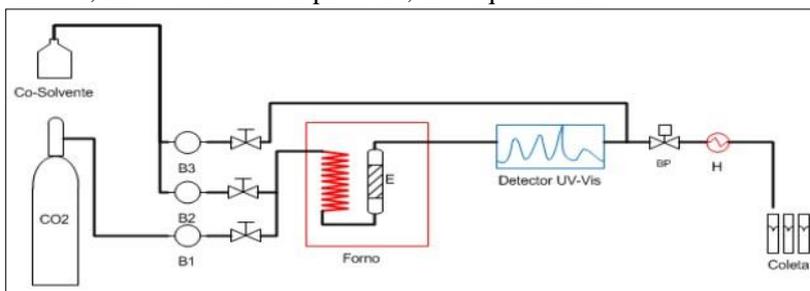


Fonte: Autora.

O diagrama da unidade de extração supercrítica pode ser observado na figura 4.6. Esta unidade é constituída por três bombas de alta pressão, bomba de CO₂ (B1), bomba de cossolvente (B2) e bomba de eluente (B3); forno de aquecimento, trocador de calor, transdutores de pressão, detector UV-vis em linha, válvula *back-pressure* automatizada (BP), sistema de aquecimento (H), responsável por controlar o efeito do resfriamento provocado pela expansão do CO₂. Utilizou-se o vaso de extração (E), com volume interno de 0,010 L ($1,0 \times 10^{-6} \text{ m}^3$), com filtro

de 10 μm na saída do extrator, evitando uma contaminação na linha com particulados sólidos. O equipamento possui uma interface de comunicação LC-net II (Jasco Inc.) com um computador, onde é possível controlar as variáveis operacionais, por meio do *software* ChromNAV, como temperatura, vazão de solvente, cossolvente e eluente, além da pressão mediante a *back-pressure* automatizada.

Figura 4.6 - Unidade de extração (HPLC - SC). B - bomba HPLC, E - extrator, BP - válvula back-pressure, H - aquecimento.



Fonte: Zibetti (2012).

A extração supercrítica foi empregada utilizando apenas CO_2 , sem adição de co-solvente. Os extratos obtidos da *D. angustifolia* e *C. galioides* foram avaliados quanto aos rendimentos globais, aos teores de cera, composição e outras atividades já citadas.

No processo de extração supercrítica foram utilizados os métodos dinâmico, que consistem na passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida.

A determinação dos tempos de extração para a casca d'anta e para o poejo do campo foi realizada por meio de testes preliminares com CO_2 supercrítico aplicando-se uma pressão de 140 bar, temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ e uma vazão de 3ml/min, parâmetros já utilizados pelo mesmo grupo de pesquisa, em outros estudos. O tempo de extração do teste foi de 180 minutos, porém a partir de 90 minutos foi observado que a extração se aproximara de uma etapa de taxa nula de extração. Portanto, foi fixado para as duas matérias-primas o tempo de extração de 90 minutos.

4.2.3.1 Planejamento Experimental

As determinações dos rendimentos globais das extrações da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* e a qualidade dos seus extratos, foram conduzidas seguindo o planejamento experimental do tipo composto central (DCC), com as codificações das variáveis, sendo apresentadas na tabela 4.1. Estas condições de pressão e temperatura foram definidas observando-se diversos estudos sobre extração supercrítica de extratos de plantas publicados na literatura e alguns apresentados na seção 3.4.3. O α adotado foi de $\sqrt{2}$ e a vazão foi de 3 mL/min para todas as condições.

Tabela 4.1 - Codificação das variáveis para o planejamento Composto Central (DCC).

Níveis (xi)	Pressão [bar] (x1)	Temperatura [°C] (x2)
$-\alpha$	80	33
-1	98	35
0	140	40
+1	182	45
$+\alpha$	200	47

Fonte: Autora

A matriz do planejamento DCC apresentada na tabela 4.2 foi gerada pelo software *Statistica 13*. O ponto central foi repetido cinco vezes, gerando assim treze ensaios.

O valor da densidade do CO₂ supercrítico, para cada condição operacional utilizada, foi determinado pelo diagrama densidade por pressão obtidos na NIST (*Standard Reference Database Number*, sendo o intervalo de densidades de 277,90 a 849,93 kg/m³.

Os experimentos foram realizados utilizando, aproximadamente, 4,0 gramas de cada planta, casca d'anta e poejo do campo, separadamente.

Após cada ensaio de extração, os extratos foram pesados em balança analítica e armazenados em frascos de vidro, na geladeira, à aproximadamente 5 °C.

Tabela 4.2 - Matriz do planejamento DCC, com valores reais, codificados e as respectivas densidades.

<i>Ensaio</i>	<i>P (bar)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>x1</i>	<i>x2</i>	<i>ρf (kg/m³)</i>
1	98	35	-1	-1	704,94
2	182	35	1	-1	849,93
3	98	45	-1	1	466,43
4	182	45	1	1	791,8
5	140	40	0	0	763,27
6	140	40	0	0	763,27
7	140	40	0	0	763,27
8	140	40	0	0	763,27
9	140	40	0	0	763,27
10	80	40	-1,414	0	277,90
11	140	47	0	1,414	701,84
12	200	40	1,414	0	839,81
13	140	33	0	-1,414	815,57

Fonte: Autora

Os rendimentos globais das extrações (Y) foram calculados pela razão entre a massa de extrato obtida (M_{Extrato}) e massa de cada planta (M_{Planta}) utilizada para formar o leite, de acordo com a equação 4.2.

$$Y (\%) = \frac{M_{\text{Extrato}}}{M_{\text{Planta}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Todas as análises estatísticas dos resultados obtidos com os dois extratos foram realizadas utilizando o software *Statistica 13*.

4.2.3.2 Caracterização dos extratos - Rendimento

O rendimento global (Y) de cada extração para cada planta também foi calculado conforme a equação 4,2. Os resultados foram expressos como porcentagem em massa.

4.2.3.3 Caracterização dos extratos - Teor de Cera

As ceras estão presentes nas superfícies das folhas, impermeabilizando-as e evitando a perda excessiva pela transpiração. Por não possuir afinidade com outras partes da folha, as ceras são extraídas praticamente sem resistências à transferência de massa, enquanto o óleo essencial, mesmo que apresente maior solubilidade, tem que superar

grandes resistências à transferência de massa na difusão interna (REVERCHON, 1997).

Como as ceras são facilmente coextraídas com hidrocarbonetos terpênicos, é importante conhecer a quantidade de cera extraída juntamente com o óleo das plantas em estudo, visto que, os compostos de interesse neste estudo não estão presentes nas ceras.

Os teores de cera presentes nos extratos supercríticos da *D. angustifolia* e da *C. galioides* foram estimados para as condições testadas no planejamento composto central. Os tubos de ensaio onde estavam contidos os extratos obtidos em cada extração foram diluídos em etanol na mesma proporção em massa e colocados no ultrassom para total diluição e posteriormente deixados em repouso por 24 horas em refrigerador para a precipitação das ceras. Após este período os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 30 min para separar os sólidos contidos nas amostras. O sobrenadante contendo a fração oleosa foi transferido para outro tubo de ensaio, para posterior análise cromatográfica. Os tubos contendo as ceras foram submetidos a secagem em estufa a 40 °C por 24 horas para eliminar os resquícios de etanol e/ou umidade e, assim, foi determinado a massa de cera presente na amostra por gravimetria.

4.2.3.4 Curvas de Extração

As curvas de extração das plantas *D. angustifolia* e *C. galioides* foram obtidas com o rendimento acumulado dos extratos de cada planta em função do tempo de extração e também da massa de CO₂ utilizada. Para o experimento dinâmico, nos 90 minutos de extração, os extratos da *C. galioides* foram coletados em trinta e quatro tubos de ensaio e para a *D. angustifolia* dezoito, todos com tampa, previamente pesados em balança analítica e em tempos preestabelecidos. Esta diferença no número de tubos foi devido a testes realizados após a extração da *C. galioides*, e que foi visto que não faria diferença diminuindo-se este número. Após cada coleta os tubos foram pesados novamente para a obtenção da massa de extrato e posterior cálculo das massas acumuladas e em seguida dos rendimentos em cada ponto de coleta. As condições operacionais adotadas para os ensaios de dinâmica foram escolhidas baseadas nos resultados do DCC e das análises cromatográficas. Para o *D. angustifolia* foi escolhida pressão de 182 bar, temperatura de 35 °C e vazão de 3 ml/min. Para a *C. galioides* 200 bar, 33 °C e 3 ml/min.

Os experimentos dinâmicos, para cada planta, foram realizados em triplicatas.

4.2.3.5 Caracterização dos extratos - Análises cromatográficas e espectroscópica

A caracterização dos extratos obtidos, com o planejamento experimental, foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa - GC/MS, cromatografia em camada delgada e espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa - GC/MS foram realizadas na Central de Análise do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, em um equipamento Agilent GC 7890A acoplado a um detector MS Agilent 5975C. A coluna capilar, HP-5MS (Agilent) de sílica fundida (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme, composta de 5 % de fenilmetilpolisiloxano), foi conectada a um detector quadrupolo operando em modo EI a 70 eV. O gás hélio foi adotado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min. As temperaturas de injeção e interface foram de 250 °C e 250 °C, respectivamente, com uma relação de divisão de 1:50. O volume de injeção foi de 1 µL com o auto amostrador Agilent GC Sampler 80 e o programa de temperatura do forno consistiu em subir gradualmente de 40 °C durante 2 min, depois de 3 °C /min para 145 °C, depois de 10 °C/min para 250 °C durante 10 min. Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2011). Esta metodologia foi baseada em estudos de Bilia et al., (2002); Purushothaman e Ravi (2013) com algumas modificações.

A preparação das amostras para GC/MS consistiu em diluir os extratos em etanol (grau HPLC) a uma concentração de aproximadamente 5,0 mg/mL. Os extratos obtidos com as extrações por Soxhlet foram enviados para a análise no próprio solvente de extração (hexano e etanol).

Os extratos supercríticos foram enviados também ao Laboratório de Cromatografia da Universidade Regional de Blumenau – FURB, para confirmação dos resultados. A metodologia utilizada foi cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa - GC/MS em um equipamento GCMS-QP2010 Plus Shimadzu, com Rampa de 60 C (5 min) - 3 C/min - 240 C (5 min) e coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (fase estacionária 5 % diphenyl / 95 % dimethyl polysiloxane). O gás hélio foi adotado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min. As temperaturas de injeção, interface e fonte de íons foram de 250 °C, 280 °C e 250 °C, respectivamente, com uma relação de divisão de 1:20. O volume de

injeção foi de 1 µl. As amostras para as análises foram diluídas em éter etílico.

A cromatografia em camada delgada e a análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF), da Universidade Federal de Santa Catarina –UFSC. Apenas o extrato da *D.angustifolia* foi analisado, devido à baixa porcentagem de compostos identificados com a análise de GC-MS, sendo necessário outras técnicas para caracterização.

Para a análise de cromatografia em camada delgada, o extrato da *D.angustifolia* foi diluído em 1 mL de acetato de etila e aplicado 5 µL em uma placa cromatográfica de gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre base de alumínio, de marcas Merck e 27 Macherey-Nagel, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro e revelador Orcinol-sulfúrico. A fase móvel utilizada para a eluição da placa foi hexano:acetato de etila (9:1). Após a migração da placa, a mesma foi borrifada com anisaldeído sulfúrico e aquecida a 100°C (LHULLIER, 2009).

A análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H (hidrogênio com frequência de 300 MHz) e ¹³C (carbono 13 com frequência de 125 MHz), do extrato da *D.angustifolia* foi realizada em um equipamento Bruker Fourier 300 MHz. Os extratos foram dissolvidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃) contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e os deslocamentos químicos (em ppm) nas faixas de 0,6-7,4 ppm e 10-210 ppm, para as absorções observadas dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, respectivamente.

4.2.4 Comparação entre as técnicas de extração

A comparação entre as três técnicas de extração é de suma importância para que se possa melhor visualizar, avaliar e justificar suas utilizações. Foi realizada comparações em relação aos rendimentos e os compostos obtidos em cada tipo de extração e para cada matriz vegetal.

4.2.5 Avaliação das atividades dos extratos supercríticos

As atividades avaliadas dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* foram atividade bactericida, fungicida e de inibição enzimática da acetilcolinesterase e α-glicosidase. Para a casca d'anta também foram realizados os testes de ação repelente e inseticida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

4.2.5.1 Atividade bactericida

A avaliação da atividade bactericida dos extratos foi realizada no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Regional de Blumenau - FURB. Esta atividade foi avaliada contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e contra as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)(CLSI, 2012).

As amostras dos extratos supercríticos da *D. angustifolia* e *C. galoides* foram diluídas a 2 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %, e colocadas nos primeiros micropoços, em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais continham caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações variando de 1000 µg mL⁻¹ até 7,81 µg mL⁻¹. O inóculo bacteriano (5 µL), preparado em 0,5 da escala de McFarland, foi adicionado em cada poço, resultando em uma concentração de 5x10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) do microrganismo a ser testado. Alguns poços de cada microplaca, foram reservados para realização do controle negativo (MH + H₂O/DMSO 10 % + bactéria em estudo) e para controle de meio de cultura (MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, com concentrações variando de 40 a 0,31 µg mL⁻¹.

As microplacas foram incubadas aerobiamente a 37 °C ± 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 µL em cada micropoço de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (5 mg mL⁻¹), observando-se a presença do “botão” bacteriano avermelhado no fundo de cada micropoço. A CIM foi definida como a última concentração de amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano.

As faixas de valores de CIM utilizada para a avaliação dos resultados seguiram o proposto por Machado et al. (2005): CIM menores que 10 µg/mL foram considerados com atividade bactericida excelente; valores entre 10 e 100 µg/mL considerados com boa atividade; valores entre 100 e 500 µg/mL atividade moderada; valores entre 500 e 1000 µg/mL atividade fraca e para valores de CIM acima de 1000 µg/mL, as amostras foram consideradas inativas.

4.2.5.2 Atividade fungicida

A atividade fungicida foi realizada no Laboratório de Farmacognosia, Fitoterapia e Produtos Naturais da Universidade do Vale do Itajaí, SC - UNIVALI. Esta atividade foi avaliada contra os fungos dermatófitos: *Microsporium canis* (C112), *Microsporium gypseum* (C115), *Epidermophyton floccosum* (C114), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC9972) e *Trichophyton rubrum* (C137); fungos oportunistas: *Aspergillus fumigatus* (ATCC26934), *Aspergillus niger* (ATCC9092) e *Rhizopus* sp (C135); fungos leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC6258) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), que foram semeados em meio de cultura sólido Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) 4%. Após a incubação foi verificado a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo utilizado no ensaio, (Concentração Inibitória Mínima - CIM), conforme metodologia descrita por Espinel-Ingroff, A.; Pfaller (1995) com modificações.

Os extratos supercríticos da *D. angustifolia* e *C. galoides* foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % e adicionados em séries de diluição dupla ($1000 - 1,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, a cada frasco foi adicionado ágar SDA, seguido de imediata homogeneização da mistura. Após a solidificação do meio de cultura, os microrganismos, previamente ativados, foram inoculados com uma alçada calibrada de 1 μL para obter concentração final de aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células nas séries correspondentes (LLOP et al., 2000), sendo então, incubados à temperatura ambiente por um intervalo de 5 a 15 dias. Após o período de incubação, foram realizadas leituras da CIM através da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados foi considerada a mesma faixa da CIM utilizada para a atividade bactericida.

As cepas fúngicas fazem parte da micoteca do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Escola de Ciências da Saúde da UNIVALI, campus de Itajaí, SC, e foram adquiridas da coleção americana American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, U.S.A.) e cepas isoladas do Centro de Referência em Micologia (C) (CEREMIC, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina).

Durante os testes foram utilizados controles, com o meio de cultura e solvente utilizado na solubilização das substâncias, a fim de verificar seu efeito sobre os microrganismos. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2 %. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos

controles. O Cetoconazol (Sigma K-1003) foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.5.3 Atividades de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e α -glicosidase.

Um dos potenciais farmacêuticos que os extratos podem ter é a atividade de inibição enzimática frente as enzimas acetilcolinesterase e α -glicosidase. Estes testes foram realizados no Laboratório de Eletroforese Capilar do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. O método utilizado foi o de microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA). Para estas avaliações todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Um sistema Agilent® 7100 CE (Santa Clara, CA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e software ChemStation para controle, processamento e aquisição de dados foram utilizados para as análises. O capilar de sílica fundida usado possui revestimento externo de poliimida, diâmetro interno de 50 μm e diâmetro externo de 375 μm , comprimento total de 58,5 cm e efetivo de 50 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA). A temperatura de capilar foi ajustada em 37 °C e a tensão de separação foi de 30 kV. Para o método de AChE, o DAD foi ajustado em 230 nm, e para o método de α -glicosidase, a detecção foi realizada em 306 nm, 406 nm e 270 nm, devido à absorção máxima de substrato, produto de reação e padrão interno, respectivamente.

Os capilares novos foram condicionados por 30 minutos com NaOH 1 mol L⁻¹, 30 minutos com água deionizada Milli-Q e 15 min com tampão de corrida, todos à 1000 mbar. Para obter boa simetria de pico e tempos de migração reprodutiva, o capilar foi condicionado no início de cada dia com a seguinte sequência: 5 min com NaOH 1 mol L⁻¹; 5 min com água deionizada; e 5 minutos com BGE, todos à 1000 mbar. Entre cada corrida, o capilar foi condicionado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 30 s, água deionizada durante 30 s e tampão de corrida durante 1 min, tudo em 1000 mbar.

O capilar foi preenchido com o tampão de corrida, e as soluções de enzima e substrato (com ou sem inibidor) foram introduzidas no capilar em modo “sanduíche” hidrodinâmico na seguinte sequência: água deionizada (20 mbar, 5 s); solução enzimática (50 mbar, 5 s); solução de substrato (50 mbar, 5 s); solução enzimática (50 mbar, 5 s) e água deionizada (20 mbar, 5 s). Uma vez injetados, deixou-se em repouso por

um período de 2 min para que a reação ocorresse. Depois disso, aplicou-se uma tensão de 30 kV para promover o processo de separação.

A atividade da enzima foi determinada pela área de pico do produto da reação, e a percentagem de inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação 4.4:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{x}{\text{branco}} \times 100 \right) \quad \text{Equação 4.3}$$

Na equação, "x" representa a área do pico do produto determinado, a uma determinada concentração de inibidor/amostra, e "branco" é o pico do produto determinado sem a presença de inibidor/amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O método EMMA para avaliar a inibição da AChE foi baseado no trabalho de Martín-Blosca et al., (2009), com modificações. O tampão de corrida foi borato-fosfato 30 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e foi preparado dissolvendo quantidades apropriadas de ácido bórico e di-hidrogenofosfato de sódio em água Milli-Q e ajustando o pH com NaOH 1 mol L⁻¹. A solução enzimática foi preparada diluindo-se a AChE para 10 U mL⁻¹ com o tampão de corrida. As soluções de teste para estudos de inibição foram preparadas para conter neostigmina (10 mg L⁻¹) ou amostra (1000 mg L⁻¹), substrato (AThCh) a 2 mmol L⁻¹, 20 mmol L⁻¹ de MgSO₄ e o padrão interno (propranolol) a 25 mg L⁻¹ em tampão de corrida. As soluções estoque das amostras foram feitas dissolvendo-se 50 mg do extrato em 5 mL de iPrOH.

O método EMMA para avaliar a inibição da α-glicosidase foi realizado com base em um método descrito por Guo et al., (2010), com modificações. Foram utilizados dois tampões diferentes nos ensaios, um para a separação e outro para a reação enzimática. O tampão utilizado para promover a separação de substrato e produto foi composto de 20 mmol L⁻¹ TBS (pH 9.2) preparado em água Milli-Q. O tampão para a reação enzimática foi composto de 30 mmol L⁻¹ de di-hidrogenofosfato de sódio e 10 mmol de hidrogenofosfato de sódio L⁻¹ (pH 6,8) preparado em água Milli-Q. Para preparar a solução enzimática, α-glicosidase foi diluída para 10 U mL⁻¹ com tampão enzimático. As soluções de teste para estudos de inibição foram preparadas para conter acarbose (300 mg L⁻¹) ou amostra (1000 mg L⁻¹), substrato (p-NPG) na concentração de 0,2 mmol L⁻¹ e o padrão interno (ácido cinâmico) a 25 mg L⁻¹ em tampão de corrida. As soluções estoque das amostras foram feitas dissolvendo-se 50 mg do extrato em 5 mL de iPrOH.

A faixa de valores de inibição usada para avaliar os resultados foi baseada no trabalho de Vinutha B. et al. (2007), que em seu estudo de inibição da AChE com extratos de plantas medicinais indianas, propôs a classificação dos extratos analisados como: inibidores potentes - maiores que 50% de inibição, inibidores moderados - de 30 a 50% de inibição e inibidores fracos – menores que 30% de inibição).

4.2.5.4 Ação repelente e inseticida do extrato da *Drimys angustifolia* Miers frente o *Aedes aegypti*

Os testes de repelência e a ação inseticida do extrato supercrítico da *Drimys angustifolia* foram executados pelo Laboratório ASR – Analytical & Scientific Research, no município de Charqueada, São Paulo, contra o mosquito da espécie *Aedes aegypti*. A metodologia utilizada foi baseada no estudo de Schultz, Peterson e Coats (2006), com algumas modificações. Esta metodologia também é a utilizada por indústrias fabricantes de repelentes para confirmação da ação dos seus produtos antes dos testes em humanos, além dos testes de toxicidade.

Para este estudo foram realizados dois tipos de teste de repelência, a repelência de contato da solução testada e a repelência em ambientes com a solução (rota de fuga). O extrato supercrítico foi solubilizado em uma base para repelentes utilizada em produtos de mercado na proporção de 80/20, ou seja, 80 g do produto base para repelente e 20 g do extrato, concentração indicada por empresa do ramo. Para os dois testes de repelência foram utilizados mosquitos criados em insetário com condições ambientais controladas, temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

Teste de repelência de contato: O aparato empregado para a realização deste teste foi composto de um tubo de pvc transparente, medindo 60 cm de comprimento e 9 cm de diâmetro. A substância teste foi aplicada em papel filtro, dose média de 1,10 g, com auxílio de micropipeta. Após a secagem natural por cerca de 2 horas, o papel filtro tratado com a substância teste foi colocado em placa de Petri e a mesma foi posicionada em uma das extremidades para fecha-la. A outra extremidade foi fechada com o papel filtro não tratado, que recebeu apenas água da torneira até o ponto de umedecimento. Foram utilizados quinze mosquitos fêmeas, por repetição, os quais foram introduzidos no aparato por meio de um furo central fechado com algodão. Após 2 minutos da liberação dos insetos no interior do tubo, foi iniciada a avaliação da distribuição dos insetos e o número dos mesmos tombados nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Após o término das

avaliações, os mosquitos tombados foram recolhidos e incubados para a avaliação da mortalidade (ação inseticida), 24 horas após a exposição.

Teste de repelência em ambiente (rota de fuga): O aparato utilizado neste teste foi composto de duas gaiolas de nylon (40x40x40 cm) interligadas por um tubo plástico transparente de aproximadamente 30 cm com uma abertura no centro para introdução dos insetos. A solução teste foi aplicada com auxílio de uma micropipeta em papel filtro (8 cm de diâmetro), na dose média de 1 mL, sendo colocado no interior de uma placa de Petri. Após a secagem natural da solução teste, a placa de Petri foi pendurada no interior de uma das gaiolas. Após esta etapa, foram introduzidos 100 mosquitos fêmeas, através da abertura no tubo que interligava a gaiola tratada com a gaiola não tratada (controle). Nas avaliações de repelência foram contados o número de mosquitos em cada gaiola, nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos e as discussões realizadas para cada metodologia empregada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentadas e discutidas as caracterizações dos leitos de partículas (granulometrias, densidades reais, densidades aparentes e porosidades), resultados dos rendimentos e composição dos extratos para cada método de extração utilizado. Na sequência, as técnicas serão comparadas em relação a rendimentos e composição. Finalmente serão realizadas as atividades dos extratos e discutidas suas potencialidades farmacêuticas e cosméticas.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS E DOS LEITOS

5.1.1 Determinação das densidades reais das partículas (ρ_r), densidades aparentes (ρ_a) e das porosidades dos leitos (ϵ)

As densidades reais das partículas, as densidades aparentes e porosidades dos leitos das matrizes vegetais *D. angustifolia* e *C. galioides* estão apresentados a seguir na tabela 5.1. Estes parâmetros não estão disponíveis na literatura e podem ser importantes para futuras aplicações.

Tabela 5.1 - Parâmetros do leito fixo

Parâmetros	<i>D. angustifolia</i>	<i>C. galioides</i>
Densidade real ρ_r (g/cm ³)	1,3470 ± 0,0004	1,3957 ± 0,0017
Densidade aparente ρ_a (g/cm ³)	0,5289 ± 0,1890	0,4117 ± 0,1760
Porosidade do leito ϵ	0,607	0,705

Fonte: Autora

Os resultados das porosidades dos leitos da *D. angustifolia* e da *C. galioides*, mostram que os leitos são compostos de aproximadamente 60,7 % e 70,5 % respectivamente, de vazios, ou seja, espaços entre as partículas por onde o CO₂-SC flui.

5.1.2 Distribuições granulométricas

O diâmetro médio das partículas de Casca d'anta e Poejo do campo foi de 0,33 mm e 0,27 mm, respectivamente, correspondendo à peneiras de aproximadamente 57 mesh e 65 mesh. Estes resultados foram obtidos pela média ponderada dos diâmetros das malhas utilizadas.

Segundo Reverchon e De Marco (2006), o conhecimento do tamanho das partículas é de extrema importância para os processos de extração controlados pela resistência interna à transferência de massa, pois um menor tamanho médio de partículas reduz o caminho difusional do solvente. No entanto, se as partículas forem muito pequenas pode ocorrer a formação de caminhos preferenciais no leito de extração e, com isso, parte do solvente flui através desses canais formados, sem entrar em contato com o material a ser extraído, o que causa perda na eficiência do processo. De maneira geral, diâmetros médios de partículas entre 0,25 e 2,0 mm são os mais utilizados.

5.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

5.2.1 Extração com solventes (SOXHLET)

5.2.1.1 Rendimentos

As extrações da *D. angustifolia* por soxhlet com hexano e com etanol, resultaram em rendimentos mássicos médios de $10,69 \pm 1,37$ g/100 g e $25,29 \pm 0,68$ g/100 g, respectivamente. Os resultados estão apresentados a seguir nas tabelas 5.2 e 5.3.

Tabela 5.2 - Rendimentos mássicos da extração da *Drimys angustifolia* com hexano, via soxhlet.

<i>Drimys angustifolia</i>			
Extrações	Massa inicial de planta (g)	Massa de extrato (g)	Y (g/100g)
1	5,004	0,57	11,37
2	5,005	0,58	11,61
3	5,001	0,45	9,09

Fonte: Autora

Tabela 5.3 - Rendimentos mássicos da extração da *Drimys angustifolia* com etanol, via soxhlet.

<i>Drimys angustifolia</i>			
Extrações	Massa inicial de planta (g)	Massa de extrato (g)	Y (g/100g)
1	5,043	1,22	24,36
2	5,032	1,31	25,98
3	5,015	1,28	25,54

Fonte: Autora

As extrações da *C. galioides* por soxhlet com hexano e com etanol, resultaram em rendimentos mássicos médios de $5,34 \pm 0,17$ g/100 g e $13,67 \pm 0,16$ g/100 g, respectivamente. Os resultados estão apresentados a seguir nas tabelas 5.4 e 5.5.

Tabela 5.4 - Rendimentos mássicos da extração da *Cunila galioides* com hexano, via soxhlet.

<i>Cunila galioides</i>			
Extrações	Massa inicial de planta (g)	Massa de extrato (g)	Y (g/100g)
1	5,011	0,26	5,17
2	5,003	0,26	5,28
3	5,007	0,28	5,57

Fonte: Autora

Tabela 5.5 - Rendimentos mássicos da extração da *Cunila galioides* com etanol, via soxhlet.

<i>Cunila galioides</i>			
Extrações	Massa inicial de planta (g)	Massa de extrato (g)	Y (g/100g)
1	5,023	0,58	13,85
2	5,027	0,69	13,68
3	5,028	0,59	13,47

Fonte: Autora

Nas extrações com soxhlet, tanto para a *Drimys angustifolia* quanto para *Cunila galioides*, a com solvente n-hexano o rendimento foi menor que a com etanol. Provavelmente os compostos extraíveis predominantes da *Drimys* e da *Cunila* são mais polares, que apolares, visto que o n-hexano é apolar e o etanol polar. Esta variação também pode ser explicada pela atuação do etanol junto a superfície do material vegetal extraível, onde a presença de compostos hidrofóbicos que dificulta a extração é solubilizada pelo etanol, facilitando a extração e consequentemente aumentando o rendimento. Estes resultados corroboraram com os observados por Zhao e Zhang (2014), que na extração do óleo das folhas de Eucalipto com n-hexano obtiveram rendimento de 7,9 % e com etanol de 36,33 %.

5.2.1.2 Análises cromatográficas

Os compostos identificados nos extratos da *Drimys angustifolia* obtidos por soxhlet com hexano e com etanol estão apresentados nas tabelas 5.6 e 5.7 a seguir.

Tabela 5.6 - Composição química do extrato da *Drimys angustifolia* obtido por soxhlet com hexano.

<i>Drimys angustifolia</i>	
Composto	Área relativa %
Biciclogermacreno	4,49
D-Limoneno	3,25
Drimenol	2,53
Espatuleno	1,05
Miristicina	6,19
Poligodial	51,74
Rimuene	2,99
Safrol	1,06
α Curcumeno	3,12
α Kaurene	0,49
α Pineno	1,75
β Curcumeno	1,25
β Farneseno	0,69
γ Muuroleno	2,78
2,4-Heptadieno, 2,6-dimetil-	0,40

Fonte: Autora

Tabela 5.7 - Composição química do extrato da *Drimys angustifolia* obtido por soxhlet com etanol.

<i>Drimys angustifolia</i>	
Composto	Área relativa %
Ácido Linoleico	3,38
Ácido Linolênico	0,59
Ácido Palmítico	5,35
Aloaromadendreno	3,13
Biciclogermacreno	2,90
Drimenol	7,60
Espatulenol	2,54
Miristicina	9,39
Poligodial	20,61
Rimuene	4,50
Safrol	1,14
α Curcumeno	4,37
α Kaurene	1,04
α Pineno	3,81
β Curcumeno	1,26
γ Muuroleno	2,28
2,4-Heptadieno, 2,6-dimetil-	0,77

Fonte: Autora

Para o extrato hexânico da *Drimys angustifolia* a porcentagem de área relativa identificada foi de 83,78 % e para o etanólico 74,66 %. Nos dois extratos o composto majoritário foi o poligodial, com 51,74 % no extrato hexânico e 20,61 % no etanólico.

Os compostos identificados nos extratos da *Cunila galioides*, obtidos por soxhlet com hexano e com etanol estão apresentados nas tabelas 5.8 e 5.9 a seguir.

Para a *Cunila galioides*, a área relativa identificada foi de 93,41 % para o extrato hexânico e 86,89 % para o extrato etanólico. O composto majoritário para os dois extratos é o linalol. Não foram encontrados na literatura resultados de extrações por soxhlet da *Drimys angustifolia* e nem da *Cunila galioides* para comparações.

Tabela 5.8 - Composição química do extrato da *Cunila galioides* obtido por soxhlet com hexano.

<i>Cunila Galioides</i>	
Composto	Área relativa %
D-Limoneno	21,48
Espatulenol	6,27
Fitol	1,05
Linalol	49,41
Óxido de cariofileno	7,75
α Terpineol	5,88
β Ocimeno	1,56

Fonte: Autora

Tabela 5.9 - Composição química do extrato da *Cunila galioides* obtido por soxhlet com etanol.

<i>Cunila Galioides</i>	
Composto	Área relativa %
Espatulenol	12,42
Fitol	4,70
Linalol	48,68
Óxido de cariofileno	12,27
α Terpineol	8,82

Fonte: Autora

5.2.2 Extração por Hidrodestilação

5.2.2.1 Rendimento

A extração por hidrodestilação é a técnica mais comum ou tradicional utilizada para extrair óleos essenciais. As extrações dos óleos essenciais da *D. angustifolia* e da *C. galioides* resultaram em rendimentos médios de $1,33 \pm 0,00$ mL/100 g e $0,67 \pm 0,00$ mL/100 g, respectivamente. Os resultados estão apresentados a seguir nas tabelas 5.10 e 5.11.

Tabela 5.10 - Rendimentos mássicos e volumétricos das extrações por hidrodestilação da *Drimys angustifolia*.

<i>Drimys angustifolia</i>				
Extrações	Massa de óleo (g)	Volume de óleo (mL)	Y _m (g/100g)	Y _{vol} (mL/100g)
1	0,2154	0,4	0,72	1,33
2	0,2089	0,4	0,70	1,33
3	0,3133	0,4	0,72	1,33

Fonte: Autora

Tabela 5.11 - Rendimentos mássicos e volumétricos das extrações por hidrodestilação da *Cunila galioides*.

<i>Cunila galioides</i>				
Extrações	Massa de óleo (g)	Volume de óleo (mL)	Y _m (g/100g)	Y _{vol} (mL/100g)
1	0,0972	0,2	0,32	0,67
2	0,0985	0,2	0,32	0,67
3	0,0949	0,2	0,32	0,67

Fonte: Autora

Na grande maioria das extrações de óleos essenciais de materiais vegetais por hidrodestilação, em especial das folhas, os rendimentos são baixos.

Limberger et al., (2007) e Gomes et al., (2013) obtiveram rendimentos para o óleo da *Drimys angustifolia* com hidrodestilação, porém de folhas frescas, de 0,4 mL/100 g e 0,5 mL/100 g, respectivamente. Já para Santos et al., (2013) o rendimento para as folhas secas da *Drimys angustifolia* foi de 1,53 mL/100 g, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

Para a espécie *Cunila*, Apel et al., (2009) obtiveram, por hidrodestilação, rendimentos para cinco espécies nativas do sul do Brasil, *C. angustifolia* (1,05 mL/100 g); *C. incana* (0,7 mL/100 g); *C. incisa* (1,72 mL/100 g); *C. spicata* (0,49 mL/100 g) e *C. microcephala* (0,36 mL/100g). Pauletti, (2005) avaliou três quimiotipos de *Cunila galioides* e obteve rendimentos variando de 0,62 mL/100 g até 0,16 mL/100 g. Santos et al., (2004) apresentaram rendimento de 0,43 g/100g para extração por hidrodestilação da *Cunila galioides*. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os observados na literatura.

5.2.2.2 Análises cromatográficas

A porcentagem de compostos identificados nos óleos essenciais da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* foram de 88,01 % e 98,78 %, respectivamente.

Todos os compostos identificados no óleo da *Drimys angustifolia* estão apresentados na tabela 5.12. Os compostos majoritários da *D. angustifolia* são miristicina 16,76 %, β -himacaleno 15,31 %, α -curcumeno 12,18 %, α -pineno 10,21 %, safrole 6,67 % e biciclogermacreno 6,12 %.

Tabela 5.12 - Composição química do extrato da *Drimys angustifolia* obtido por hidrodestilação.

<i>Drimys angustifolia</i>	
Composto	Área relativa %
Aloaromadendreno	0,38
Biciclogermacreno	6,12
D-Limonene	0,71
Drimenol	2,60
Espatulenol	0,53
Hidrato de cis-sesquisabineno	0,96
Miristicina	16,76
Moretenone	1,90
Rimuene	2,36
Safrol	6,67
α Bergamoteno	0,75
α Cubebeno	0,73
α Curcumeno	12,18
α Kaurene	0,18
α Pineno	10,21
β Cariofileno	0,74
β Curcumeno	3,58
β Guaiene	0,87
β Himacaleno	15,31
β Ocimeno	0,72
β Farneseno	2,65
β Pineno	1,10

Fonte: Autora

A grande maioria dos compostos majoritários também foi observada por Gomes et al. (2013), (2014); Limberger et al. (2007) e Santos et al. (2013), entretanto em porcentagens diferentes. O que pode estar associados às diferenças já mencionadas como clima, solo, sazonalidades, entre outros.

No óleo das folhas secas da *D. angustifolia* o que predomina são sesquiterpenos e monoterpênicos. Esta predominância também foi demonstrada por Gomes et al. (2014); Limberger et al. (2007); Santos et al. (2013). A presença de fenilpropanóides foi observada por estes autores, como também em outras espécies de *Drimys*, *D. winteri* (Barrero, et al., 2000), *D. brasiliense* (Lago et al., 2010).

Os compostos identificados no óleo da *Cunila galioides* estão apresentados na tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Composição química do extrato da *Cunila galioides* obtido por hidrodestilação.

<i>Cunila galioides</i>	
Composto	Área relativa %
Cicloocteno	2,54
D-Limoneno	0,92
Espatuleno	16,6
Linalol	44,08
Moretenona	6,34
1-Octen-3-ol	1,17
Óxido de cariofileno	19,42
α Terpineol	4,77
β cariofileno	2,15
γ Muuroleno	0,79

Fonte: Autora

Os compostos que se destacam são linalol 44,08 %, espatulenol 16,60 % e óxido de cariofileno 19,42 %. A composição do óleo de *C. galioides* se diferenciou das observadas na literatura. Echeverrigaray et al., (2003) e Sandri et al., (2007), observaram que plantas da mesma espécie *Cunila galioides*, possuem compostos diferente, ou seja, existem quimiotipos desta espécie. Os compostos mais relevantes observados por estes autores foram geranial, Neral, trans. β-ocimeno, 1,8-cineole e menta-trans-2,8-dienol, limoneno e 1,3,8 mentatrieno. Santos et al.

(2004) obtiveram em seus estudos o composto citral com 77 %, porém com aproximadamente 20 compostos não identificados.

Os compostos deste estudo variaram qualitativamente e quantitativamente, o que também pode ser explicado pelas condições climáticas, de localização, época de plantio, colheita e outros.

5.2.3 Extração com dióxido de carbono em estado supercrítico

5.2.3.1 Planejamento experimental

O planejamento composto central - DCC foi realizado com as pressões e temperaturas definidas conforme já mencionado. De posse destas condições, foram realizados os treze ensaios para cada matriz vegetal. Os resultados destes ensaios, referentes aos rendimentos, estão apresentados nas tabelas 5.14 e 5.15 a seguir.

Tabela 5.14 - Resultados do planejamento DCC para a ESC da *Drimys angustifolia*.

<i>Drimys angustifolia</i>						
Ensaio	P (bar)	T (°C)	x1	x2	ρ_{CO_2} (kg/m ³)	Y % (g/100g planta)
1	98	35	-1	-1	704,94	3,75
2	182	35	1	-1	849,93	4,18
3	98	45	-1	1	466,43	2,99
4	182	45	1	1	791,80	4,01
5	140	40	0	0	763,27	4,02
6	140	40	0	0	763,27	4,00
7	140	40	0	0	763,27	4,02
8	140	40	0	0	763,27	3,89
9	140	40	0	0	763,27	3,91
10	80	40	-1,414	0	277,90	2,16
11	140	47	0	1,414	701,84	3,68
12	200	40	1,414	0	839,81	4,15
13	140	33	0	-1,414	815,57	3,92

Fonte: Autora

Tabela 5.15 - Resultados do planejamento DCC para a ESC da *Cunila galioides*.

<i>Cunila galioides</i>						
Ensaio	P (bar)	T (°C)	x1	x2	ρCO_2 (kg/m ³)	Y % (g/100g planta)
1	98	35	-1	-1	704,94	0,71
2	182	35	1	-1	849,93	0,81
3	98	45	-1	1	466,43	0,66
4	182	45	1	1	791,80	0,75
5	140	40	0	0	763,27	0,72
6	140	40	0	0	763,27	0,75
7	140	40	0	0	763,27	0,73
8	140	40	0	0	763,27	0,75
9	140	40	0	0	763,27	0,77
10	80	40	-1,414	0	277,90	0,34
11	140	47	0	1,414	701,84	0,78
12	200	40	1,414	0	839,81	0,86
13	140	33	0	-1,414	815,57	0,70

Fonte: Autora

Com o planejamento foi possível observar que nas condições utilizadas para as duas plantas, com exceção dos ensaios 3 e 10, cujas as densidades eram as menores, os rendimentos apresentaram poucas variações. Para a *Drimys angustifolia* não foram observados na literatura rendimentos de extração supercrítica para comparação. Entretanto para a *Cunila galioides*, Santos, et al. (2004) obtiveram rendimento de 1 % em 90 min e 0,79 % para 30 min de extração, valores próximos dos encontrados neste estudo, considerando um material vegetal.

De posse dos resultados das tabelas 5.14 e 5.15 foi realizado para cada matriz vegetal, uma análise dos efeitos da interação entre os fatores pressão e temperatura, em relação ao rendimento de cada extração.

Os efeitos foram comparados com a estimativa do erro padrão da resposta e considerados estatisticamente significativos caso fossem maiores do que este erro padrão. (BARROS NETO et al., 2007). Os resultados foram avaliados ao nível de 5 % ($p < 0,05$).

Quando o efeito de uma variável depende do nível da outra, como nestes casos, as variações interagem e pode-se calcular o efeito da interação entre elas.

5.2.3.2 Análises estatísticas

Drimys angustifolia:

Os valores dos efeitos e os índices estatísticos obtidos com a análise estatística aplicada aos dados dos rendimentos das extrações da *Drimys angustifolia* podem ser observados na tabela 5.16 a seguir.

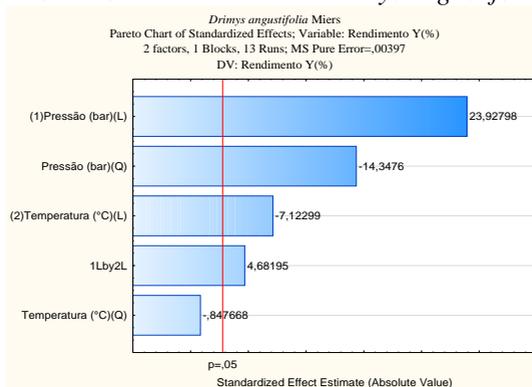
Tabela 5.16 - Estimativas dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta para a *Drimys angustifolia*.

<i>Drimys angustifolia</i>					
	Efeito	Erro padrão	Valor p	-95% Limite de confiança	+95% Limite de confiança
Média/Interações	3,968	0,028	0,000000	3,889	4,046
(1) Pressão (L)	1,066	0,044	0,000018	0,942	1,189
Pressão (Q)	-0,685	0,047	0,000137	-0,818	-0,552
(2) Temperatura (L)	-0,317	0,044	0,002053	-0,441	-0,193
Temperatura (Q)	-0,040	0,047	0,444366	-0,173	0,092
1L e 2L	0,295	0,063	0,009434	0,120	0,469

Fonte: Autora

Os termos lineares (L), tanto de pressão como de temperatura, apresentaram efeitos significativos no rendimento. Já no que se refere aos termos quadráticos (Q), somente a pressão obteve resultado estatisticamente significativo em nível p menor que 0,05. Isto pode ser observado também no gráfico de Pareto, (figura 5.1), onde os efeitos dos fatores que influenciaram no rendimento com a ampliação do seu valor, ultrapassaram a linha de corte (linha vermelha).

Figura 5.1 - Gráfico de Pareto - *Drimys angustifolia* Miers.

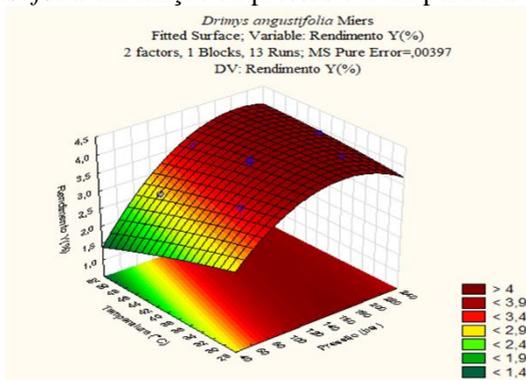


Fonte: Autora

Apenas a temperatura no termo quadrático que não interferiu significativamente no rendimento do processo de extração da *Drimys angustifolia*, em um nível de significância de 95 %,

A descrição gráfica do modelo ajustado, também conhecida como superfície de resposta, bem como a projeção de seus cortes sobre o plano dos fatores gerando as curvas de nível, estão apresentados nas figuras 5.2 e 5.3. A região mais escura dos gráficos representa a região de maior rendimento.

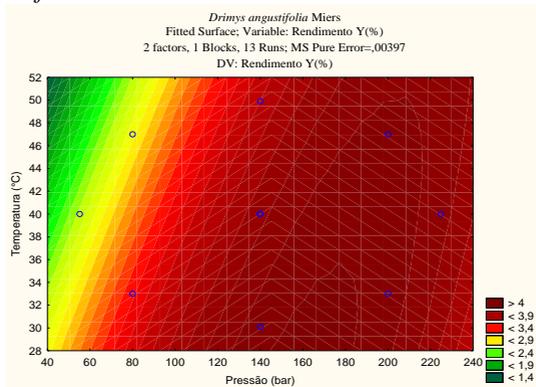
Figura 5.2 - Gráfico da superfície de resposta para o rendimento global da *Drimys angustifolia* em função da pressão e a temperatura



Fonte: Autora

Pelo gráfico da superfície de resposta, que descreve o comportamento dos dados em função da pressão e temperatura, pode-se observar que com o aumento da pressão e a diminuição da temperatura do processo, a densidade do fluido supercrítico aumenta e consequentemente, o rendimento da extração também aumenta.

Figura 5.3 - Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura para a *Drimys angustifolia*.



Fonte: Autora

Observando-se o gráfico das curvas de nível, a região que apresenta os maiores rendimentos estão entre 140 e 190 bar de pressão e 32 e 35 °C de temperatura, aproximadamente. De acordo com o modelo, a melhor condição de extração, em relação à rendimento, foi a 182 bar e 35 °C, correspondendo ao ponto máximo da superfície de resposta. Devido a esse resultado, esta foi a condição selecionada, na vazão de 3 mL/min de CO₂-SC, para os ensaios da dinâmica de extração.

Cunila galioides:

Os valores dos efeitos e os índices estatísticos obtidos com a análise estatística aplicada aos dados dos rendimentos das extrações da *Cunila galioides*, estão apresentados na tabela 5.17 a seguir.

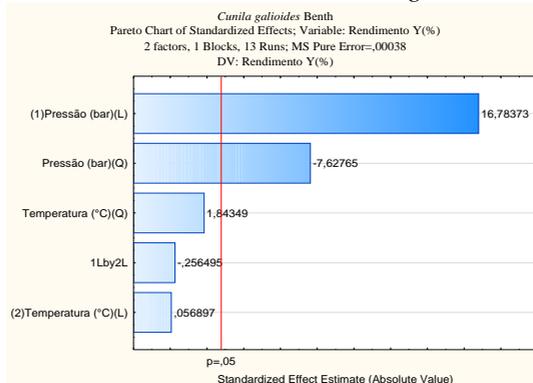
Tabela 5.17 - Estimativas dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta para a *Cunila galioides*.

<i>Cunila galioides</i>					
	<i>Efeito</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Valor p</i>	<i>-95% Limite de confiança</i>	<i>+95% Limite de confiança</i>
Média/Interações	0,744	0,009	0,000000	0,719769	0,768204
(1) Pressão (L)	0,231	0,014	0,000074	0,193077	0,269618
Pressão (Q)	-0,112	0,015	0,001586	-0,153791	-0,071709
(2) Temperatura (L)	0,001	0,014	0,957356	-0,037486	0,039055
Temperatura (Q)	0,027	0,015	0,139035	-0,013791	0,068291
1L e 2L	-0,005	0,019	0,810221	-0,059123	0,049123

Fonte: Autora

Observando-se a tabela 5.17, a temperatura para o termo linear e o termo quadrático, como também a interação entre os termos lineares da pressão e temperatura, não apresentaram efeitos significativos no rendimento. Isto também pode ser observado pelo gráfico de Pareto (figura 5.4). Os efeitos dos fatores que influenciaram no rendimento com a ampliação do seu valor, ultrapassaram a linha de corte (linha vermelha).

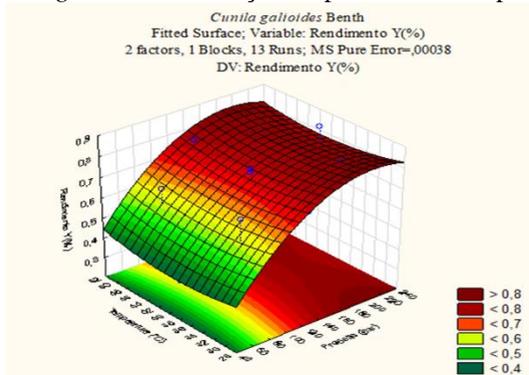
Figura 5.4 - Gráfico de Pareto – *Cunila galioides* Benth.



Fonte: Autora

O gráfico da superfície de resposta e a projeção de seus cortes sobre o plano dos fatores, gerando as curvas de nível, estão apresentados nas figuras 5.5 e 5.6.

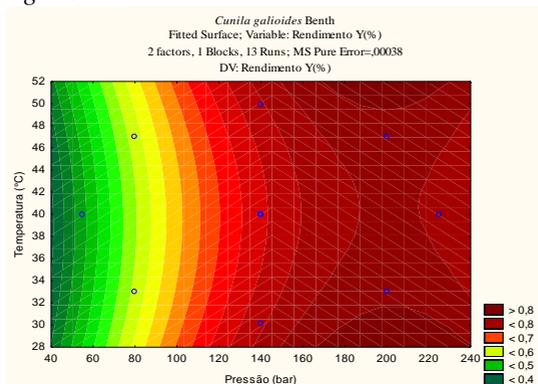
Figura 5.5 - Gráfico da superfície de resposta para o rendimento global da *Cunila galioides* em função da pressão e a temperatura



Fonte: Autora

Observando-se o gráfico da superfície de resposta (figura 5.5), ou seja, o comportamento dos dados em função da pressão e temperatura, verifica-se que a uma dada temperatura (fixa), aumentando-se a pressão e conseqüentemente a densidade, o rendimento aumenta. Já a uma dada pressão (fixa), variando-se a temperatura, praticamente não existe variação do rendimento.

Figura 5.6- Curvas de nível para os fatores pressão e temperatura para a *Cunila galioides*.



Fonte: Autora

Com o gráfico das curvas de nível (figura 5.6), pode-se observar, que com o aumento da temperatura, o efeito dominante foi o da pressão de vapor. Os termos quadrático e linear da temperatura não apresentaram diferenças significativas, provavelmente, devido a existência de dois efeitos dominantes, o da pressão de vapor atuando entre 170 e 240 bar e o efeito da densidade atuando entre aproximadamente 32 e 50 °C.

Em um sistema isotérmico, o aumento da pressão, aumenta a densidade do solvente, diminuindo a distância intermolecular, aumentando assim a interação entre as moléculas de soluto e solvente. Em sistemas isobáricos, o aumento da temperatura acarreta uma diminuição da densidade do solvente e um aumento da pressão de vapor do soluto. Os efeitos antagônicos destes parâmetros ocasionam uma inversão da curva de solubilidade, fenômeno conhecido como retrogradação ou condensação retrógrada, resultado da competição entre esses efeitos (densidade do solvente e pressão de vapor do soluto) e da predominância de um dos dois. (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ e TEMELLI, 2005).

De acordo com o modelo, a melhor condição de extração, em relação à rendimento, foi a 200 bar e 33 °C, correspondendo ao ponto

máximo da superfície de resposta. Entretanto, para a dinâmica do processo foi escolhido o binômio 200 bar e 40 °C, com vazão do solvente de 3 mL/min. Estas condições de pressão e temperatura estão dentro do planejamento e resultaram no maior rendimento.

O modelo leva em consideração que apenas elevando a densidade do solvente, a extração terá um maior rendimento, porém como visto anteriormente, podem ocorrer interações, heterogeneidades do processo, da amostra, que possam resultar em valores de rendimento menores do que o sugerido pelo modelo de superfície de resposta, o que não viria ser um problema para as etapas seguintes.

Para as dinâmicas dos processos, das duas plantas, o tempo de 90 minutos foi mantido, já que nos ensaios testes foi possível observar taxas de acréscimo dos rendimentos praticamente nulas após este tempo. Tempos maiores de extração aumentam a quantidade de ceras extraídas com os óleos e outros compostos, o que não é interessante quando buscam-se compostos mais voláteis (SOVOVA et al., 2015).

O planejamento foi uma importante ferramenta para um melhor entendimento em relação aos rendimentos, neste caso, com a variação do binômio pressão-temperatura, já que na literatura não há registros deste tipo de extração para estas plantas.

5.2.3.3 Caracterização dos extratos – Rendimento

Os resultados dos rendimentos globais de extração (Y) das matrizes vegetais *D. angustifolia* e *C. galioides* com CO₂ supercrítico puro estão apresentados nas tabelas 5.14 e 5.15, com os valores de temperatura (T), pressão (P) e densidade de solvente (ρ_{CO_2}) correspondente.

O rendimento global da extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida que pode ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de pressão, temperatura e vazão para um determinado tempo de processo (MARTÍNEZ, 2005).

Avaliando-se as tabelas 5.14 e 5.15, pode-se observar que o planejamento possibilitou uma melhor compreensão da relação entre densidades e rendimentos, ou seja, quanto maior a densidade do solvente, geralmente, maior o rendimento.

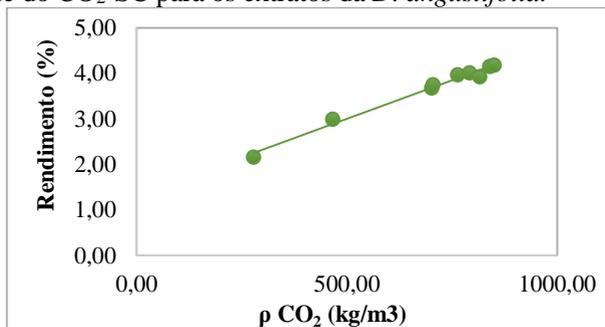
Nas figuras 5.7 e 5.8, observa-se a tendência linear da relação rendimento e densidade, para as duas matrizes vegetais. Quanto maior a densidade, maiores os rendimentos.

O melhor rendimento para a *D. angustifolia* foi na condição de 182 bar, 35 °C e 849,93 kg/m³, com 4,18 % e o pior à 80 bar, 40 °C e 277,90 kg/m³, com 2,16 %.

Para a *C. galioides* a condição para o melhor rendimento foi 200 bar, 40 °C e 839,81 kg/m³, com 0,86 % e para o pior 80 bar, 40 °C e 277,90 kg/m³, com 0,34 %. Neste caso não foi a condição da maior densidade, porém a segunda maior.

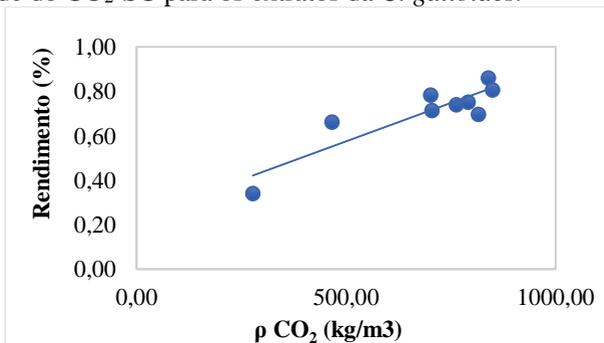
Os ensaios nos pontos centrais indicam os comportamentos das repostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo (LAURINTINO, 2017). Avaliando os pontos centrais das duas matrizes vegetais pode-se afirmar que os ensaios tiveram uma boa repetibilidade.

Figura 5.7 - Gráfico da tendência linear da relação entre rendimento e densidade do CO₂-SC para os extratos da *D. angustifolia*.



Fonte: Autora

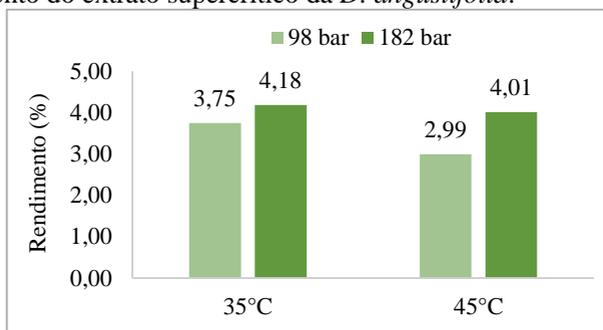
Figura 5.8 - Gráfico da tendência linear da relação entre rendimento e densidade do CO₂-SC para os extratos da *C. galioides*.



Fonte: Autora

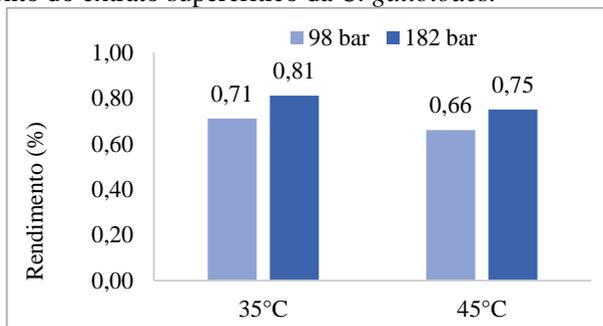
Nas figuras 5.9 e 5.10 a seguir, estão apresentados os ensaios 1, 2, 3 e 4 do planejamento experimental. Na análise do processo de extração isobárico, a 182 bar e também a 98 bar, observou-se que o aumento da temperatura diminuiu o rendimento, para as duas plantas. Neste comportamento a temperatura teve efeito negativo sobre a densidade do solvente, por consequência houve a diminuição do rendimento e um aumento na pressão de vapor do soluto. Provavelmente isto ocorreu pelo fato da pressão se encontrar abaixo do ponto de inversão das isotermas (ARAUCO M., 2014).

Figura 5.9 - Gráfico do efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico da *D. angustifolia*.



Fonte: Autora

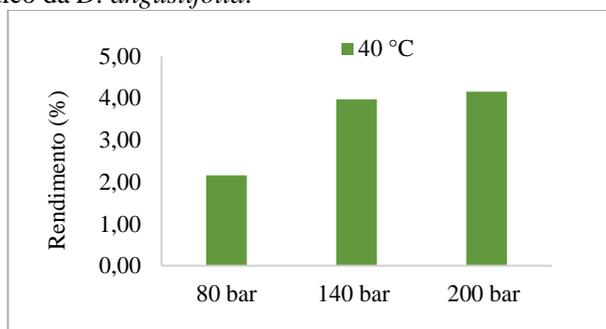
Figura 5.10 - Gráfico do efeito da pressão e temperatura sobre o rendimento do extrato supercrítico da *C. galiioides*.



Fonte: Autora

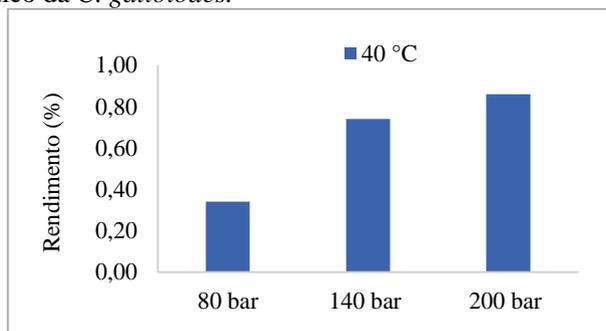
Analisando-se as figuras 5.11 e 5.12, com os experimentos realizados a 40 °C, isotermicamente, tanto para a *D. angustifolia* quanto para a *C. galioides*, apresentaram rendimentos significativamente menores, em pressões baixas (80 bar), ou seja, a densidade teve efeito dominante no processo. O efeito da densidade do solvente supercrítico se mostrou mais efetivo do que a pressão de vapor do soluto. Resultados similares no que tange à variação de pressão e densidade de extração, foram obtidos por Arauco M. (2014) e Laurintino (2017), que avaliaram os efeitos dos parâmetros da extração com dióxido de carbono supercrítico em *S. terebinthifolius* R e *B. graveolens*.

Figura 5.11 - Gráfico do efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da *D. angustifolia*.



Fonte: Autora

Figura 5.12 - Gráfico do efeito da pressão sobre o rendimento do extrato supercrítico da *C. galioides*.



Fonte: Autora

5.2.3.4 Caracterização dos extratos – Teor de Cera

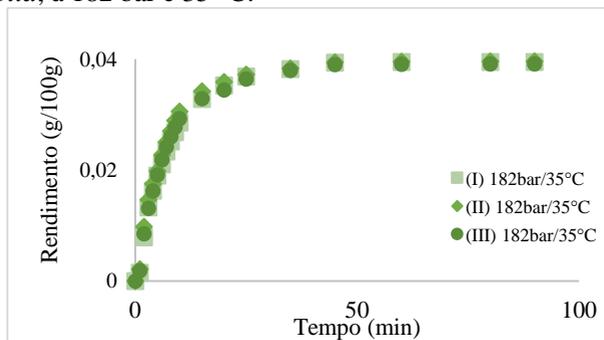
Nas extrações supercríticas não se extrai somente óleos, mas ceras e outros compostos pesados, e que muitas vezes são confundidos quanto aos rendimentos. O conhecimento do teor de cera nas extrações supercríticas é importante, visto que a cera é um composto indesejado, quando se pretende obter um extrato oleoso.

Pela metodologia empregada na quantificação das ceras, não foi possível observar efeitos da condição operacional nessa medida. No entanto, pode-se afirmar que a média do teor de cera coextraída com os extratos supercríticos da *D. angustifolia* e da *C. galioides* foi de 0,35 % e 3,57 %, respectivamente. Esta grande diferença ocorreu devido a extração da *D. angustifolia* ser das folhas e da *C. galioides* da parte aérea, ou seja, flores e talos, consequentemente com mais cera. Estes valores são considerados baixos segundo Reverchon (1997).

5.2.3.5 Curvas de Extração

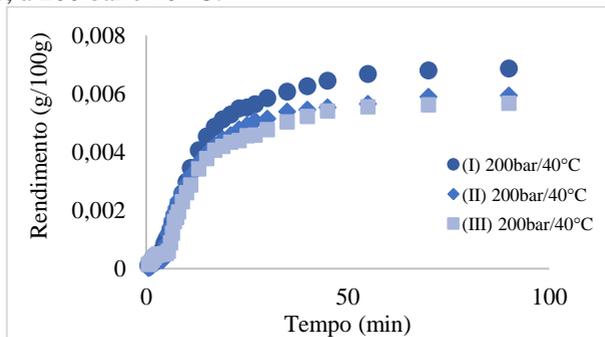
As curvas dos processos de extração da *D. angustifolia* e da *C. galioides* estão apresentadas nas figuras 5.13 e 5.14, a seguir. A pressão e temperatura utilizadas na dinâmica foram escolhidas em função da análise estatística. Sendo que para a *D. angustifolia* foi o binômio 182 bar e 35 °C e para a *C. galioides* 200 bar e 40 °C. As dinâmicas para as duas plantas foram realizadas em triplicatas.

Figura 5.13 - Gráfico das curvas dinâmicas do processo de extração da *D. angustifolia*, à 182 bar e 35 °C.



Fonte: Autora

Figura 5.14 - Gráfico das curvas dinâmicas do processo de extração da *C. galioides*, à 200 bar e 40 °C.



Fonte: Autora

Segundo Brunner (1994), o comportamento típico da dinâmica de uma extração supercrítica de plantas, ocorre em três etapas: a de taxa constante (CER), a de taxa decrescente (FER) e por último a de taxa nula de extração (LER), quando o mecanismo de difusão é predominante.

Na primeira etapa, a de taxa constante, a extração pelo solvente ocorre com facilidade devido ao soluto/óleo estar na superfície externa das partículas. O mecanismo dominante nesta fase é a convecção.

Na segunda etapa, a de taxa decrescente de extração, a camada externa de óleo nas partículas começa a se esgotar e o mecanismo de difusão se inicia. Nesta fase operam difusão e convecção.

Na última etapa, taxa nula de extração, o soluto/óleo não se encontra mais na parte externa da partícula e a transferência de massa ocorre só por difusão, dentro das partículas. Nesta fase a inclinação da curva diminui e o traçado se aproxima assintoticamente do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (Y). Assim, para a determinação do rendimento (Y) o tempo de extração deve assegurar que esta etapa de extração quase nula seja alcançada (ARAUCO M., 2014).

Neste estudo as dinâmicas para as duas plantas, comportaram-se de maneira típica ao que normalmente ocorre.

5.2.3.6 Caracterização dos extratos - Análises cromatográficas e espectroscópica

Drimys angustifolia:

A caracterização dos extratos da *D. angustifolia*, não foi realizada apenas com a cromatografia acoplada ao espectrômetro de

massa (GC-MS). Nas análises de GC-MS, o composto majoritário, cerca de 50%, não foi identificado. A biblioteca no qual o equipamento faz a comparação, não identificou alguns compostos e dentre estes estava o majoritário. Para constatar se o erro estava no procedimento, tipo de coluna ou biblioteca utilizada, os extratos foram enviados para dois laboratórios distintos de cromatografia com espectrometria de massa, um na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC e o outro na Universidade Regional de Blumenau – FURB. Nos dois laboratórios os resultados das análises dos extratos foram os mesmos, ou seja, sem identificação do composto majoritário.

Em vista disto, realizou-se a análise de cromatografia em camada delgada e a análise de ressonância magnética nuclear (RMN). Com estas duas análises foi possível identificar o composto majoritário.

Os compostos encontrados em maiores quantidades pelas análises de GC-MS nos extratos da *D. angustifolia* estão apresentados na tabela 5.18, a seguir.

Tabela 5.18 - Composição química dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* (% área) por GC-MS e os totais de compostos identificados e não identificados.

<i>Drimys angustifolia</i>														
Ensaio	P (bar)	T (°C)	BG	CA	DR	ES	MI	RI	SA	α CU	β CU	γ MU	Total ID (%)	Total NID (%)
1	98	35	3,7	6,6	2,7	2,7	8,2	4,1	1,3	4,5	1,4	4,8	42,2	57,8
2	182	35	3,7	6,1	3,0	2,8	8,4	4,2	1,5	4,7	1,5	4,9	43,0	57,0
3	98	45	3,1	5,3	2,6	2,9	7,9	4,3	1,0	4,1	0,9	4,7	38,2	61,8
4	182	45	3,7	6,0	3,0	2,9	8,4	4,2	1,5	4,5	1,1	4,8	42,5	57,5
5	140	40	4,3	7,4	2,4	2,5	8,1	3,8	1,7	4,9	1,5	4,8	43,6	56,4
6	140	40	4,0	7,0	2,7	2,6	8,3	3,9	1,6	4,6	1,5	4,8	43,3	56,7
7	140	40	3,9	6,7	2,7	2,7	8,3	4,0	1,6	4,6	1,5	4,8	43,0	57,0
8	140	40	3,6	5,9	2,9	2,8	8,3	4,1	1,3	4,3	1,4	4,7	41,3	58,7
9	140	40	3,9	6,8	2,7	2,7	8,3	4,0	1,6	4,6	1,5	4,7	42,8	57,2
10	80	40	3,3	6,1	2,4	3,3	9,2	4,9	1,0	4,4	1,1	4,6	41,7	58,3
11	140	47	3,2	5,4	2,5	2,9	8,6	4,3	1,1	4,3	0,9	4,6	39,2	60,8
12	200	40	3,1	4,6	3,1	3,0	8,6	4,4	1,0	4,1	1,3	5,2	39,7	60,3
13	140	33	3,0	4,6	3,3	3,2	8,5	4,5	1,0	4,1	0,8	4,9	39,5	60,5
Média			3,6	6,0	2,8	2,9	8,4	4,2	1,3	4,4	1,3	4,8	41,5	58,5
Desvio Padrão			0,4	0,9	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	1,8	1,8

BG–bicclogermacreno; CA–Cadinadieno-1,4; DR–drimenol; ES–Espatuleno; MI–miristicina; RI–Rimuene; SA–Safrol; α CU– α -curcumeno; β CU– β -curcumeno; γ MU– γ Muuroleno; ID–Identificado e NID–Não Identificado.

Fonte: Autora

Os compostos identificados em maiores quantidades são miristicina (MI), cadinadieno (CA), γ -muuroлено (γ MU), α -curcumeno (α CU), rimueno (RI), biciclogermacreno (BG), espatulenol (ES), drimenol (DR), β -curcumeno (β CU) e safrol (SA). Na literatura não foram encontrados extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* para comparações.

A composição química dos extratos supercríticos obtidos com o DCC da *D. angustifolia* praticamente não variou, o que pode ser observado pelos valores dos desvios padrões de cada composto em relação à média. Os resultados dos desvios padrões em relação as suas médias foram de 0,2 à 1,0 %. o que pode ser considerado um valor aceitável (SOARES, 2017). Com isso, pode-se realizar a escolha do melhor binômio pressão/temperatura, baseando-se apenas no custo da extração, ou seja, em condições de extração mais brandas.

Devido à falta de identificação do composto majoritário fez-se necessário a realização da análise de cromatografia em camada delgada. Com esta análise foi possível observar a presença de uma diversidade de bandas e a predominância de uma banda mais intensa em $R_f = 0,5$ cm (Fator de Retenção = $5 / 10 = 0,5$ cm), figura 5.15, que configura o composto majoritário.

Figura 5.15 – Foto da análise de cromatografia em camada delgada do extrato da *Drimys angustifolia*.



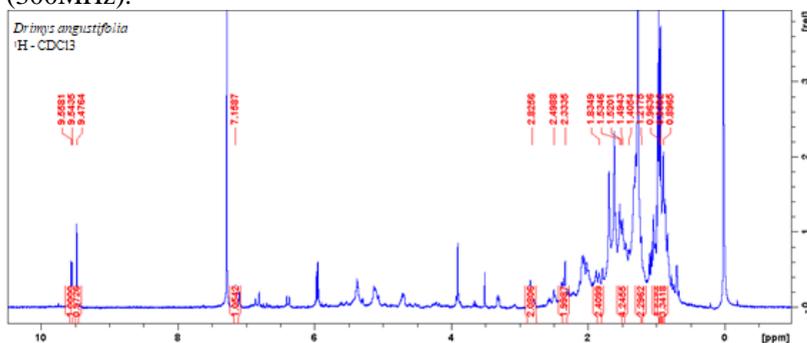
Fonte: Autora

Com a confirmação da existência de um composto majoritário, foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono foram comparados com a literatura. Dentre alguns pesquisados, foi observado que em compostos isolados do gênero *Drimys*, existe uma predominância de sesquiterpenos do tipo drimanos (RODRÍGUEZ et al.,

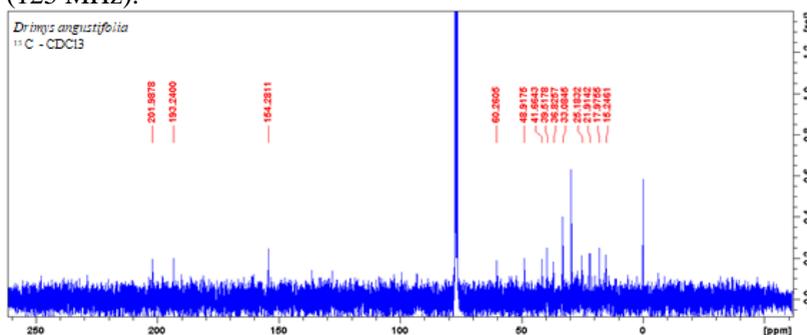
2005). Analisando-se os espectros nas figuras 5.16 e 5.17 e comparando com os resultados obtidos pelos autores já citados, foi possível afirmar que o composto majoritário do extrato da *Drimys angustifolia* é o poligodial, um sesquiterpeno do tipo drimano.

Figura 5.16 - Espectro de RMN ^1H do extrato da *Drimys angustifolia* (300MHz).



Fonte: Autora

Figura 5.17 - Espectro de RMN ^{13}C do extrato da *Drimys angustifolia* (125 MHz).



Fonte: Autora

Os dados obtidos com os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram tabelados juntamente com os dados obtidos por Rodriguez et al., (2005). Na tabela 5.19 a seguir, estão apresentados estes resultados.

Analisando-se a próxima tabela 5.19, pode-se observar que os valores obtidos com os espectros de RMN para ^1H e o ^{13}C nos dois estudos

ficaram praticamente iguais, o que confirma que o composto estudado é mesmo o poligodial.

Tabela 5.19 - Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C para o composto poligodial, no estudo de Rodriguez et al., (2005) e no extrato *Drimys angustifolia*.

^1H	^1H	^1H	^{13}C	^{13}C	^{13}C
	400 MHz, CDCl_3 Rodriguez et al., (2005)	300MHz, CDCl_3 <i>Drimys</i> <i>angustifolia</i>		400 MHz, CDCl_3 Rodriguez et al., (2005)	300 MHz, CDCl_3 <i>Drimys</i> <i>angustifolia</i>
1 α	1.36 dd	1.38 m	1	39.50	39.51
1 β	1.82 dddd	1.83 m	2	17.96	17.97
2 α	1.47 m	1.49 m	3	41.65	41.66
2 β	1.52 qt	1.52 m	4	33.07	33.08
3 α	1.21 m	1.21 m	5	48.89	48.91
3 β	1.47 m	1.49 m	6	25.17	25.18
5 α	1.24 dd	1.25 m	7	154.30	154.30
6 α	2.49 dddd	2.49 m	8	138.19	138.20
6 β	2.30 dddd	2.33 m	9	60.24	60.26
7	7.12 ddd	7.14 ddd	10	36.80	36.82
9 α	2.80 dddd	2.80 dddd	11	201.95	201.98
9 β	-	-	12	193.23	192.24
11A	9.51 d	9.54 d	13	33.07	33.08
11B	-	-	14	21.89	21.91
12A	9.44 s	9.47 s	15	15.22	15.24
12B	-	-			
Me-13	0.90 s	0.89 s			
Me-14	0.94 s	0.96 s			
Me-15	0.93 s	0.93 s			

Fonte: Autora

Portanto o composto na qual a biblioteca do GC-MS por comparação não conseguiu identificar o pico majoritário é o poligodial. Todos os ensaios realizados, dentro do planejamento experimental, apresentaram o pico majoritário não identificado pelo GC-MS. A porcentagem média das áreas destes picos para os treze ensaios, foi de $49,4\% \pm 1,3$ ou seja, praticamente 50% do extrato supercrítico da *Drimys angustifolia* é composto de Poligodial.

Cunila galioides:

A composição química dos extratos supercríticos da *C. galioides* estão apresentados na tabela 5.20 a seguir.

Tabela 5.20 - Composição química dos extratos supercríticos da *Cunila galioides* (% área) por GC-MS e os totais de compostos identificados e não identificados.

<i>Cunila galioides</i>													
Ensaio	P (bar)	T (°C)	EI	ES	FI	ISO	LI	OC	OCA	α EL	α TE	Total ID (%)	Total NID (%)
1	98	35	1,9	27,6	2,3	1,4	2,8	0,5	36,9	1,7	4,2	89,4	10,6
2	182	35	2,5	32,2	2,2	1,4	1,9	0,6	34,8	1,6	5,9	82,8	17,2
3	98	45	2,5	28,0	2,1	0,6	1,6	0,5	29,8	1,6	4,9	82,6	17,4
4	182	45	3,5	34,3	1,6	1,4	2,8	0,5	39,2	1,6	6,8	88,3	11,7
5	140	40	2,8	30,6	2,0	1,5	3,3	0,5	30,8	1,9	6,5	77,1	22,9
6	140	40	2,4	30,8	1,7	1,3	1,7	0,8	32,5	1,7	7,6	78,0	22,0
7	140	40	3,3	33,7	1,7	1,8	0,7	0,7	32,6	1,9	6,1	79,2	20,8
8	140	40	2,8	31,1	1,8	1,6	1,6	0,8	32,5	1,8	6,4	77,4	22,6
9	140	40	2,9	31,5	1,9	1,6	1,8	0,8	32,3	1,8	6,8	78,5	21,5
10	80	40	3,6	39,1	2,8	1,4	1,3	0,9	26,4	3,2	2,8	77,7	22,3
11	140	47	2,8	29,4	1,7	1,6	1,1	0,5	28,6	1,8	4,2	68,8	31,2
12	200	40	2,8	33,6	1,9	1,6	4,3	0,7	36,2	2,2	7,1	87,5	12,5
13	140	33	2,3	34,3	1,7	1,5	2,0	0,5	38,4	1,7	5,1	85,2	14,8
Média			2,8	32,0	1,9	1,4	2,1	0,6	33,1	1,9	5,7	81,0	19,0
Desvio Padrão			0,5	3,1	0,3	0,3	1,0	0,1	3,8	0,4	1,4	5,7	5,7

EI-Eicosano; ES-Espatulenol; FI-Fitol; ISO-Isolongifoleno; LI-Linalol; OC-Ocatadecano; OCA-Óxido de cariofileno; α EL- α Elemeno; α TE- α Terpineol; ID-Identificado; NID-Não Identificado.

Fonte: Autora

A porcentagem de compostos identificados foi de aproximadamente 80 % em área. Os compostos majoritários foram o Espatulenol (ES) e o Óxido de cariofileno (OCA), totalizando aproximadamente 65 % da área do GC/MS. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Santos et al. (2004), na extração supercrítica da *Cunila galioides*, observaram após 90 minutos de extração e análise por GC-MS, os compostos citral 66 % e ácido gerânico.34 %.

Os valores dos desvios padrões em relação às médias dos compostos majoritários da *C. galioides*, ficaram entre 0,1 e 3,8%, o que também, como mencionado para o extrato da *D. angustifolia*, podem ser considerados valores aceitáveis. Portanto, como não houve grandes variações na composição dos extratos obtidos com diferentes temperaturas e pressões, a condição mais branda poderá ser a escolhida para a extração.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

5.3.1 Comparação em relação aos rendimentos

Os rendimentos dos extratos e óleos essenciais da *D. angustifolia* e da *C. galioides* obtidos com os quatro métodos de extração podem ser melhor visualizados e analisados nas tabelas 5.21 e 5.22.

Tabela 5.21 - Rendimentos globais das extrações de *D. angustifolia* obtidos por diferentes métodos.

<i>Drimys angustifolia</i>	
Métodos de extração	Rendimentos %
Hidrodestilação	1,33 ± 0,17
Soxhlet Hexano	10,69 ± 1,37
Soxhlet Etanol	25,29 ± 0,68
Supercrítica	4,18 ± 0,02

Fonte: Autora

Tabela 5.22 - Rendimentos globais das extrações de *C. galioides* obtidos por diferentes métodos.

<i>Cunila galioides</i>	
Métodos de extração	Rendimentos %
Hidrodestilação	0,67 ± 0,00
Soxhlet Hexano	5,34 ± 0,17
Soxhlet Etanol	13,67 ± 0,16
Supercrítica	0,86 ± 0,07

Fonte: Autora

Os valores apresentados indicam que o método de extração com maior rendimento tanto para a *D. angustifolia* quanto para *C. galioides* foi a extração por soxhlet com etanol, seguida da com hexano, logo após a extração supercrítica e por último a hidrodestilação. Os valores de rendimentos já eram os esperados, entretanto como visto anteriormente,

a extração por soxhlet não é interessante devido a utilização de solventes, muitas vezes orgânicos, o que impossibilita sua utilização.

Nos dois materiais vegetais existe uma predominância de terpenos e terpenóides, estes compostos são caracterizados pela instabilidade térmica, devido a dupla ligação carbono-carbono. Portanto, as moléculas apresentam diferentes reorganizações (isomerizações) que fazem com que a solubilidade seja reduzida. A hidrodestilação é caracterizada com uma técnica de baixo rendimento e seletividade de compostos.(LAURINTINO, 2017). Os resultados deste estudo para a extração por hidrodestilação corroboram com Soares (2017) e Laurintino (2017).

Na extração por soxhlet, ocorre a ebulição do solvente e conseqüentemente a diminuição da sua tensão superficial e da sua viscosidade, facilitando o seu acesso aos solutos presentes nos espaços das matrizes vegetais (MARKOM et al., 2007). Isto foi observado neste estudo e também no de Zhao e Zhang (2014) onde os maiores rendimentos ocorreram nas extrações por soxhlet. A diferença de rendimento entre o extrato hexânico e o etanólico como mencionado anteriormente, deve-se a solubilização dos compostos hidrofóbico presentes na superfície do material vegetal pelo etanol.

Soares (2017) utilizou técnicas de hidrodestilação, soxhlet e supercrítica para a obtenção de extrato vegetal das folhas da cerejeira-domato e obteve os mesmos resultados que o presente estudo, em relação aos rendimentos.

Os resultados desta pesquisa também corroboram com o outros estudos, como por exemplo, Barros et al. (2014), extraindo óleos de manjeriço, observaram que o método de hidrodestilação apresentou menor rendimento, seguido por extração supercrítica e soxhlet. Laurintino (2017), no processo de extração de óleo de palo santo, também obteve os mesmos resultados em relação aos rendimentos e as técnicas de extração.

5.3.2 Comparação em relação aos compostos presentes

Os compostos obtidos com as quatro técnicas de extração para a duas matrizes vegetais estudadas podem ser melhor visualizadas nas tabelas 5.23 e 5.24.

Tabela 5.23 - Comparação dos compostos obtidos com as quatro técnicas de extração da *Drimys angustifolia*.

<i>Drimys angustifolia</i>				
Compostos	Hidrodestilação	Soxhlet hexano	Soxhlet etanol	*Supercrítico
Ácido Linoleico			3,38	
Ácido Linolênico			0,59	
Ácido Palmítico			5,35	
Aloaromadendreno	0,38		3,13	
Biciclogermacreno	6,12	4,49	2,90	3,59
Cadinadieno-1,4				6,05
D-Limonene	0,71	3,25		
Drimenol	2,60	2,53	7,60	2,75
Espatuleno	0,53	1,05	2,54	2,86
Hidrato de cis-sesquisabineno	0,96			
Miristicina	16,76	6,19	9,39	8,4
Moretenone	1,90			
Poligodial		51,74	20,61	49,5
Rimuene	2,36	2,99	4,50	4,21
Safrol	6,67	1,06	1,14	1,31
α Bergamoteno	0,75			
α Cubebeno	0,73			
α Curcumeno	12,18	3,12	4,37	4,44
α Kaurene	0,18	0,49	1,04	0,54
α Pineno	10,21	1,75	3,81	
β Cariofileno	0,74			
β Curcumeno	3,58	1,25	1,26	
β Guaiene	0,87			
β Himacaleno	15,31			
β Ocimeno	0,72			
β Farneseno	2,65	0,69		0,93
β Pineno	1,10			
γ Muuroleno		2,78	2,28	4,79
2,4-Heptadieno, 2,6-dimetil-		0,40	0,77	0,77
Compostos identificados (%)	88,01	83,78	74,66	90,14

*Valores médios dos compostos obtidos com o planejamento experimental.

Fonte: Autora

Para a *D. angustifolia*, o método de extração com a maior porcentagem de compostos identificados foi o supercrítico com 90 %, seguido da hidrodestilação 88,01 %, soxhlet com hexano 83,78 % e por último o soxhlet com etanol 74,66 %. Os compostos presentes simultaneamente nas quatro técnicas são o biciclogermacreno, drimenol, espatuleno, miristicina, rimuene, safrol, α -curcumeno e α -kaurene.

O biciclogermacreno é um sesquiterpeno, com atividade antifúngica e bactericida (DA SILVA et al., 2007; SANTOS et al., 2013). O drimenol é muito utilizado como composto de partida para a síntese de uma série de drimanes e nordrimanes, estes exibem atividades biológicas como, fagoinibidores, reguladores de crescimento nas plantas, propriedades antimicrobianas, antifúngicas, inseticidas e outras (ROBLES-KELLY et al., 2017). O espatulenol possui atividades inseticida, citotóxica e microbiana (ALENCAR DE et al., 2014). A miristicina é um fenilpropanóide, conhecida por induzir efeitos anticolinérgicos (efeitos que inibem a ação do neurotransmissor acetilcolina), psicodislépticos (efeitos profundos sobre a mente) e pode também alterar a função da membrana mitocondrial, induzindo a apoptose em células de leucemia (MARTINS et al., 2014). A miristicina possui ainda ações inseticida e fungicida (TEIXEIRA et al., 2008). O safrol é muito utilizado nas indústrias de cosméticos, pesticidas/herbicidas, farmacêuticas e alimentos. Ele também é o reagente de partida para vários análogos da anfetamina e, por isso, tem a sua venda controlada, no Brasil (MAAR e ROSENBROCK, 2012). O composto α -curcumeno é utilizado como anti-inflamatório além de melhorar as funções imunológicas (CHAVES et al., 2012).

Na hidrodestilação o composto majoritário é a miristicina seguida do β -himacaleno, que possui ação inseticida e larvicida (CHAUDHARY et al., 2011; SINGH e AGARWAL, 1988).

Nas extrações com soxhlet e na supercrítica o composto majoritário é o poligodial, com aproximadamente 50% de área relativa do CG-MS, exceto para o soxhlet com etanol que foi de 20%. O poligodial é um sesquiterpeno que apresenta atividades como antinocicepção, atividade anti-inflamatória, atividade antialérgica, antifúngica e antimicrobiana. O poligodial por ter um sabor apimentado foi identificado como uma substância equivalente no sabor quente de especiarias apimentadas da culinária tradicional japonesa (KUBO et al., 2001; MALHEIROS, 2011; MALHEIROS et al., 2005; MATSUDA et al., 2002).

A extração supercrítica para a *D. angustifolia*, foi de grande importância para a obtenção de compostos apolares, como o poligodial, visto que no extrato hidrodestilado não foi encontrado e na extração com soxhlet existe a presença dos solventes, o que impossibilita sua utilização.

Nas extrações da *Cunila galioides* a técnica de hidrodestilação foi a que obteve a maior porcentagem de compostos identificados, quase 100 %, seguido do soxhlet com hexano 93,40 %, soxhlet com etanol 86,89 % e por último a supercrítica com 82,07 %.

Tabela 5.24 - Comparação dos compostos obtidos com as quatro técnicas extração da *Cunila galioides*.

Compostos	<i>Cunila galioides</i>			
	Hidrodestilação	Soxhlet hexano	Soxhlet etanol	*Supercrítica
	Área relativa (%)			
Cicloocteno	2,54			
D-Limoneno	0,92	21,48		
Eicosano				2,76
Espatuleno	16,6	6,27	12,42	32,02
Fitol		1,05	4,70	1,94
Isolongifoleno				1,43
Linalol	44,08	49,41	48,68	2,06
Moretenona	6,34			
1-Octen-3-ol	1,17			
Octadecano				0,67
Óxido de cariofileno	19,42	7,75	12,27	33,61
α Elemeno				1,87
α Terpineol	4,77	5,88	8,82	5,71
β Cariofileno	2,15			
β Ocimeno		1,56		
γ Muuroleno	0,79			
Compostos identificados (%)	98,78	93,4	86,89	82,07

*Valores médios dos compostos obtidos com o planejamento experimental.

Fonte: Autora

Os compostos que estão presentes nos extratos dos quatro métodos de extração são espatuleno, linalol, óxido de cariofileno e o α terpineol. O espatuleno como mencionado anteriormente possui atividades microbiana, inseticida e citotóxica (ALENCAR DE et al., 2014). O linalol é um importante intermediário na produção de fixadores de fragrâncias e vitaminas (FARIA, 2017). O óxido de cariofileno é um sesquiterpeno, fungicida, eficaz no tratamento de onicomicoses (YANG et al., 1999) e anti-inflamatório (CHAVAN M.J. et al., 2010). O α -terpineol é um monoterpene de odor agradável, utilizado nas indústrias de perfumarias, cosméticos, farmacêuticas e produtos de limpeza. Tem ação desinfetante, aromatizantes, antifúngica e antisséptica (BAPTISTELLA et al., 2009).

Com a hidrodestilação, o soxhlet com hexano e com etanol, foi possível observar a seletividade para o composto linalol, onde a área relativa foi de aproximadamente 50 %. Nos extratos obtidos com a extração supercrítica foi observado a existência de dois compostos

majoritários, o espatulenol e o óxido de cariofileno, cada um com aproximadamente 35 % de área relativa.

Observando-se as tabelas 5.23 e 5.24, a grande variabilidade de compostos presentes nos extratos e/ou óleos da *D. angustifolia* e da *C. galioides* para as quatro técnicas de extração, pode ser devido à seletividade dos métodos.

Comparando-se os quatro métodos, a extração supercrítica, em relação as outras técnicas de extração, apresenta como principal desvantagem o elevado custo energético, em razão do uso de altas pressões, como também o alto valor dos equipamentos. Entretanto, a melhor escolha para a obtenção de extratos mais versáteis em relação ao seu potencial, frente aos mercados farmacêuticos, cosméticos ou mesmo alimentícios, é a extração supercrítica. As principais vantagens deste tipo de extração é a obtenção de produtos livres de solventes orgânicos, prejudiciais à saúde e ao meio ambiente e preservação das características originais dos componentes das matrizes vegetais.

5.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DOS EXTRATOS SUPERCRTICOS

5.4.1 Atividade bactericida

Os resultados da atividade bactericida dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* estão apresentados na tabela 5.25.

Tabela 5.25 - Concentração inibitória mínima (CIM), dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* frente as bactérias.

Bactérias	<i>Drimys angustifolia</i>	<i>Cunila galioides</i>
	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125	500

Fonte: Autora

Conforme já mencionado no item 4.2.5.1, valores de CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados atividade bactericida modera, 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ atividade bactericida fraca e acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sem atividade bactericida (inativa). Portanto, observando os resultados da tabela anterior, o extrato da *Drimys angustifolia* possui atividade

bactericida moderada, para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para *E. coli* o extrato é inativo. Para o extrato da *Cunila galioides* a atividade bactericida apresentou-se moderada para a bactéria *P. aeruginosa*, fraca para a *S. aureus* e inativa para *E. coli*.

Santos et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes, porém para o extrato hidrodestilado, para a *D. angustifolia*, quanto a inatividade frente a bactéria *E. coli*, entretanto para as outras duas bactérias também apresentou inatividade, diferentemente do extrato supercrítico.

Sandri et al. (2007) para o extrato hidrodestilado da *C. galioides*, obteve valores semelhantes em relação as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, a inatividade e atividade bactericida fraca respectivamente, porém para *P. aeruginosa* obteve como resultado a inatividade, diferente do obtido no extrato supercrítico.

5.4.2 Atividade fungicida

Os resultados da atividade fungicida dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* estão apresentados na tabela 5.26 a seguir.

Tabela 5.26 - Concentração inibitória mínima (CIM), dos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e da *Cunila galioides* frente aos fungos.

Fungos	<i>Drimys</i>	<i>Cunila</i>	<i>Cetoconazol</i>
	<i>angustifolia</i>	<i>galioides</i>	
CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
<i>Aspergillus fumigato</i>	500	>1000	7
<i>Aspergillus niger</i>	500	>1000	4
<i>Rhizopus</i> sp.	1000	>1000	8
<i>Epidermophyton floccosum</i>	62,50	500	0,5
<i>Microsporum canis</i>	15,62	1000	8
<i>Microsporum gypseum</i>	15,62	1000	6
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	62,50	1000	8
<i>Trichophyton rubrum</i>	31,25	1000	4
<i>Candida albicans</i>	31,25	>1000	7
<i>Candida krusei</i>	125	>1000	8
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,90	500	5

Fonte: Autora

Avaliando-se os resultados da análise fungicida, o extrato supercrítico da *Cunila galioides*, apresentou ação antifúngica de fraca a inativa para praticamente todos os fungos testados.

O extrato da *Drimys angustifolia*, entretanto apresentou bons resultados. Apenas para os fungos oportunistas (fungos que se aproveitam da debilidade do infectado para se instalar e utilizam como porta de entrada no organismo humano a via respiratória, de onde podem ser eliminados sem ocasionar doença em indivíduos imunocompetentes), que a CIM foi fraca. Para os demais fungos, a atividade fungicida foi considerada de boa à excelente. Em especial o *Cryptococcus neoformans*, causador da meningite fúngica, onde a sua CIM foi de $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, menor que o próprio controle (cetoconazol) $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Contra os fungos dermatófitos *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* a CIM foi de $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$, considerado praticamente excelente. Estes resultados corroboram com os estudos de Malheiros (2011), onde o autor obteve bons resultados de atividade antifúngica, porém para extratos metanólicos e clorofórmicos das cascas, caules e folhas da *Drimys brasiliense* e *angustifolia*. Segundo o mesmo autor, resultados obtidos sugerem que os drimanos são os responsáveis pela atividade antifúngica. Esta afirmação vem acordar com os resultados obtido neste estudo, onde praticamente 50 % da composição do extrato supercrítico da *D. angustifolia* é composto pelo drimano poligodial, entretanto livre de qualquer solvente orgânico, como é o caso dos extratos de Malheiros (2011).

5.4.3 Atividades de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e α -glicosidase.

Os resultados das porcentagens de inibição das enzimas pelos extratos podem ser observados na tabela 5.27, a seguir, juntamente com os inibidores padrões.

A inibição das enzimas acetilcolinesterase e α -glicosidase pelo extrato supercrítico da *Drimys angustifolia* apresentou-se fraca, segundo os critérios utilizados por Vinutha B. et al. (2007), ou seja valores menores que 30 % de inibição são considerados inibidores fracos.

Tabela 5.27 - Porcentagem de inibição das enzimas acetilcolinesterase e α -glicosidase, pelos extratos supercríticos da *Drimys angustifolia* e *Cunila galioides*, juntamente com os padrões.

Enzimas	<i>D. angustifolia</i>	<i>C. galioides</i>	Acarbose	Neostigmina
	(1000 mg.L ⁻¹)	(1000 mg.L ⁻¹)	(300 mg.L ⁻¹)	(10 mg.L ⁻¹)
% Inibição \pm DP				
Acetilcolinesterase	14,82 \pm 2,38	0	n.a	58,89 \pm 2,45
α -Glicosidase	21,44 \pm 2,59	68,56 \pm 5,98	43,68 \pm 2,92	n.a

n.a – não se aplica.

Fonte: Autora

O extrato supercrítico da *Cunila galioides*, para a enzima acetilcolinesterase não apresentou nenhum valor de inibição, porém para a α -glicosidase o extrato obteve uma inibição de 68,5 %, segundo o autor citado anteriormente, acima de 50 % é considerada inibição forte. Este resultado ficou acima da acarbose, inibidor padrão utilizado no teste. Entretanto, a concentração de extrato utilizada em relação ao padrão foi 3 vezes maior. Este resultado aponta o extrato supercrítico da *Cunila galioides* como um potencial farmacêutico para pessoas portadoras do Diabetes mellitus.

5.4.4 Ação repelente e inseticida do extrato da *Drimys angustifolia* Miers frente o *Aedes aegypti*

Os resultados do teste de repelência de contato do produto formulado com o extrato da *D. angustifolia* e sua ação inseticida estão apresentados a seguir. Na tabela 5.28, pode ser observado o número de insetos na área tratada, o número de insetos na área não tratada e a porcentagem de repelência para cada tempo de avaliação.

Tabela 5.28 - Distribuição dos insetos no interior do aparato do teste de repelência de contato.

Repetições	15 min.		30 min.		60 min.		90 min.		120 min.		180 min.	
	AT	AC	AT	AC	AT	AC	AT	AC	AT	AC	AT	AC
1	1	14	0	15	0	15	2	13	0	15	0	15
2	2	13	1	14	1	14	1	14	1	14	0	15
3	2	14	2	13	0	15	1	14	2	13	1	14
% Média Repelência	88,7		93,3		98,0		91,3		93,3		98,0	

AT – Número de insetos na Área Tratada;

AC – Número de insetos na Área Controle (não tratada).

Fonte: Autora

A porcentagem de repelência de contato da solução com o extrato supercrítico da *D. angustifolia* foi de aproximadamente 90 % em todos os tempos avaliados. Após 180 minutos de teste a porcentagem de repelência foi de 98 %.

O número de insetos tombados durante o período de avaliação pode ser observado na tabela 5.29.

Tabela 5.29 - Número de insetos tombados no interior do aparato do teste de repelência de contato.

Repetições	Número de Insetos Tombados					
	15 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min	180 min.
1	0	0	1	6	10	12
2	0	0	2	5	8	11
3	0	0	2	5	9	11
% Insetos tombado	0,0	0,0	11,1	35,5	60,0	75,5

Fonte: Autora

O número de mosquitos tombados demonstra que a substância teste teve efeito tóxico aos insetos que em algum momento estiveram em contato com a área tratada.

Os mosquitos tombados foram recolhidos e avaliados segundo a mortalidade, após 24 horas da exposição à solução. Estes dados podem ser observados na tabela 5.30.

Tabela 5.30 - Número de insetos vivos e mortos, após 24 horas de exposição dos insetos à solução teste.

Solução teste	Repetições						Mortalidade %
	1		2		3		
	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto	
24 horas	3	12	4	11	4	11	75,5

Fonte: Autora

Com 75 % dos mosquitos mortos após a exposição à solução teste, pode-se afirmar que o extrato supercrítico da *Drimys angustifolia* teve ação inseticida, sobre os insetos *Aedes aegypti*.

Os resultados do teste de repelência em ambientes (rota de fuga), podem ser visualizados na tabela 5.31 a seguir.

Tabela 5.31 - Distribuição dos insetos no interior do aparato do teste de repelência em ambientes (rota de fuga).

Repetições	15 min.		30 min.		60 min.		90 min.		120 min.		180 min.		240 min.	
	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC
1	39	61	37	63	30	70	29	71	28	72	27	73	29	71
2	34	66	35	65	28	72	24	76	28	72	26	74	24	76
3	37	63	38	62	33	67	30	70	32	62	24	76	30	70
% MR	63,3		63,3		69,7		70,7		74,3		72,3		78,7	

GT – Número de insetos na Gaiola Tratada;

GC – Número de insetos na Gaiola Controle (não tratada);

MR – Média de repelência.

Fonte: Autora

A porcentagem média de repelência em ambientes, da solução teste, durante o período avaliado ficou entre 63,3 – 78,7 %, frente ao *Aedes aegypti*.

Estes resultados demonstram que o extrato da *Drimys angustifolia* possui ação inseticida e de repelência sobre o *Aedes aegypti*. Na literatura não foram encontrados estudos com a mesma planta e mosquito que possam ser comparados. Entretanto, existem alguns estudos com extratos hidrodestilado, hexânico e etanólicos para o gênero *Drimys* que podem ser apresentados. Gomes et al., (2014) avaliaram a repelência dos extratos hidrodestilados da *D. angustifolia* e *D. brasiliense*, solubilizados em etanol frente a cupim de madeira e constataram que os mesmo não possuíam ação repelente, exceto para a *D. brasiliense* que apresentou na maior concentração a porcentagem de repelência de 11%. Anese (2014) em seu estudo observou que o extrato hexânico da *D. brasiliense* e o poligodial isolado causaram alta toxicidade aos *Toxoptera citricidus* (pulgões preto dos citros), provocando alta mortalidade. Segundo a autora estes e outros resultados permitem a indicação do poligodial com um composto biopesticida. Zapata e Smagghe (2010) constataram boa atividade de repelência por contato e a toxicidade, dos óleos essenciais das folhas e cascas da *Laurelia sempervirens* e *Drimys winteri*, extraídos por hidrodestilação, contra o besouro *Tribolium castaneum*.

Os resultados deste estudo, apontam o extrato supercrítico da *D. angustifolia*, contendo 50 % do composto poligodial, como um potencial para indústria cosmética, no uso em formulações repelentes.

Na sequência serão apresentadas as principais conclusões obtidas a partir dos resultados mais significantes.

6 CONCLUSÕES

Os principais resultados do presente trabalho possibilitaram algumas conclusões. Dentre elas, utilizando-se diferentes métodos de extração, obteve-se para as duas espécies vegetais estudadas, extratos com diferenças qualitativas e quantitativas para composição e rendimento. A extração supercrítica para as duas plantas, foi seletiva na obtenção de biocompostos com potenciais farmacêuticos e cosméticos.

O extrato supercrítico da *Cunila galioides* apresenta forte inativação da enzima α -glicosidase, responsável pela quebra da glicose, sacarose e outros, aumentando o açúcar no sangue. Tal resultado fica acima da acarbose, inibidor padrão utilizado no teste. O resultado aponta o extrato supercrítico da *Cunila galioides* como um potencial farmacêutico para pessoas portadoras do Diabetes mellitus. Para as atividades fungicida e bactericida o mesmo não se mostrou tão eficaz.

No extrato supercrítico das folhas da *Drimys angustifolia* os resultados das atividades avaliadas indicaram o composto majoritário poligodial, com aproximadamente 50 % da composição, sendo o grande responsável pelas ações fungicida, inseticida e de repelência. Este composto foi observado nesta pesquisa e também por outros autores em extratos obtidos com solventes orgânicos. Entretanto, a presença do solvente está atrelada a restrições legais quanto ao uso, por questões ambientais e de saúde humana.

A grande vantagem do método de extração supercrítica para o extrato da *D. angustifolia* é a seletividade quanto a composição, indicando que este extrato é um produto promissor para indústria cosmética fabricante de repelentes e para a farmacêutica contra fungo *Cryptococcus neoformans*, causador da meningite fúngica.

A extração supercrítica além de ser uma tecnologia limpa, é seletiva na obtenção de compostos bioativos livres de solventes prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Além disso, o extrato obtido conserva as características sensoriais das matrizes vegetais, já que, o processo ocorre em temperaturas relativamente baixas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação dos resultados apresentados neste trabalho, sugerem-se alguns pontos a serem desenvolvidos em trabalhos futuros.

Para a matriz vegetal *Drimys angustifolia* Miers:

- Separar o extrato em frações para a identificação do composto químico poligodial, ao longo do processo de extração supercrítica;
- Verificar qual é o grau de toxicidade do extrato como fármaco e cosmético para seres humanos;
- Realizar novos testes de repelência para produtos formulados com diferentes concentrações do extrato;
- Testar a atividade repelente do extrato em seres humanos;

Para o extrato da *Cunila galioides* Benth:

- Realizar novos teste de inibição enzimática em diferentes concentrações e posterior aplicação em fármacos destinados a pessoas diabéticas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI G. Filogenia e variabilidade genética do gênero *Cunila Royen* ex L., (Lamiaceae). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre., 2008.
- ALENCAR DE, D. C. et al. Composição química do óleo essencial das folhas de *Xylopia excellens* (Annonaceae). Reunião anual da sociedade brasileira de química 37, livro de resumos, 2014.
- ALVES DA CONCEIÇÃO, R.; NOGUEIRA DA SILVA, P.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o tratamento do diabetes Tipo II: Uma visita ao passado e um olhar para o futuro. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 2, p. 514–534, 2017.
- ANESE, S. Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis* Miers e identificação de compostos com atividade fitotóxica e inseticida. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- APEL, M. A. et al. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitology Research, v. 105, n. 3, p. 863–868, 2009.
- ARAUCO, M. L. Obtenção e separação de compostos bioativos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em meio supercrítico e avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. Journal of Food Engineering, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BAPTISTELLA, L. H. B. et al. Preparação do (+)- α -terpineol a partir do (+)-limoneno: Monoterpeno de odor agradável em um projeto para química orgânica experimental. Química nova, v. 32, n. 4, p. 1069–1071, 2009.
- BARRERO, A. F.; HERRADOR M. M.; ARTEAGA, P.; LARA, A.; CORTÊS, M. Chemical composition of the essential oil from *Drimys winteri* Forst. wood. Journal of Essential Oil Research, v. 12, p. 685–688, 2000.
- BARROS, N. A. DE; ASSIS, A. VON R. DE; MENDES, M. F. Extração do óleo de manjerição usando fluido supercrítico: análise experimental e matemática. Ciência Rural de Santa Maria, v. 44, n. 8, p. 1499–1505, 2014.
- BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª ed. Campinas: UNICAMP, 2007.

BASKAR, K. et al. Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target zebra fish. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 101, p. 197–201, 2018.

BENSEBIA, O. et. al. Supercritical CO₂ extraction of *rosemary*: Effect of extraction parameters and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, p. 161–166, 2009.

BILIA, A. R. et al. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chemistry*, v. 76, n. 3, p. 307–310, 2002.

BISCAIA, D. Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2007.

BORDIGNON, S. A. et. al. The essential oil of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. *Phytochemistry*, v. 44, p. 1283–1286, 1997.

BORDIGNON SA, SCHENKEL EP, S. V. The essential oil of *Cunila angustifolia* (Lamiaceae). *Essential Oil Research*, v. 11, p. 145–148, 1999.

BORDIGNON SAL, SCHENKEL EP, S. V. The essential oil of *Cunila incisa* (Laminaceae) - a rich source of 1.8-cineole. *Química Nova*, v. 19, p. 105–107, 1996.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. New York: Springer Science & Business Media, 1994.

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

CHAUDHARY, A. et al. Chemical composition and larvicidal activities of the Himalayan cedar, *Cedrus deodara* essential oil and its fractions against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Science*, v. 11, n. 157, p. 1–10, 2011.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Phytomedicine Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010.

CHAVES, F. C. M. et al. Avaliação agrônômica e caracterização química de acessos de gengibre (*Zingiber officinale*) nas condições de Manaus, AM. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p. 5805–5809, 2012.

CHELLAPPANDIAN, M. et al. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International*, v. 113, p. 214–230, 2018.

CLSI, C. AND L. S. I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. v. 32 (M100-S, n. 3, p. 184, 2012.

CONCEIÇÃO, K. et al. Composição química e potencial antinociceptivo do óleo volátil das cascas do tronco de *Drimys brasiliensis*. Reunião anual da sociedade brasileira de química 30, 2007.

CRF-PR; Conselho Regional de Farmácia do Estado do Paraná. Brasil importa 85% dos princípios ativos para a fabricação de medicamentos. Disponível em: <<http://crf-pr.org.br/noticia/visualizar/id/5884>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

CRUZ, A.; SILVA, M. Further terpenoids and phenolics of *D. winteri*. *Journal Phytochemistry*, v. 12, p. 2549–2550, 1973.

DA SILVA, L. et al. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 3, p. 361–367, 2007.

DE MELO, M. M. et al. Experimental and modeling study of supercritical CO₂ extraction of *Quercus cerris* cork : Influence of ethanol and particle size on extraction kinetics and selectivity to friedelin. *Separation and Purification Technology*, v. 187, p. 34–45, 2017.

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

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, n. 5, p. 467–475, 2003.

ESPINEL-INGROF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN, R.H. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 6^a ed. Washington: ASM, 1995.

FARIA, A. DE C. Valorização dos sesquiterpenóides - cariofileno e óxido de cariofileno por meio da reação de hidroformilação catalisada por complexos de ródio. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 3, p. 369–394, 2006.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, v. 66, p. 86–95, 2017.

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

GALTIER, F. Definition, epidemiology, risk factors. *Diabetes & Metabolism*, v. 36, n. 6, p. 628–651, 2010.

GENENA, A. K. Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

GOMES, M. R. F. et al. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *Drimys brasiliensis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 2, p. 284–290, 2013.

GOMES, M. R. F. et al. Chemical composition of essential oils of *Drimys angustifolia* Miers and *Drimys brasiliensis* Miers and their repellency to drywood termite *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 1, p. 41–46, 2014.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; TEMELLI, F. Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, n. 1, p. 1–15, 2005.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, Capítulo 1, p.13-26, 2001.

GUO, L. P. et al. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, n. 5, p. 1250–1253, 2010.

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

- JELEN, H. H.; GRACKA, A. Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, v. 1418, p. 200–209, 2015.
- KNEZ, Z. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, v. 77, p. 235–243, 2014.
- KUBO, I.; FUJITA, K.; LEE, S. H. Antifungal mechanism of polygodial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 1607–1611, 2001.
- LAGO, J. H. G. et al. Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of essential oils from leaves and stem barks from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 9, p. 1760–1765, 2010.
- LAURINTINO, T. Avaliação do potencial do extrato e do óleo essencial de palo santo (*Bursera graveolens*) para aplicação em produtos inseticidas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- LHULLIER, C. Investigação química de espécies do gênero *Laurencia Lamouroux* na costa sul brasileira. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- LIMBERGER, R. P. et al. Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, n. 3, p. 130–137, 2007.
- LLOP, C. et al. Comparison of three methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 2, p. 239–242, 2000.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. *Plantarum*, v. 2, 1992.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, v. 369, p. 1–10, 1998.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.
- LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª edição, ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LUZ, R. et al. Effect of the essential oils of brazilian *Cunila* species on the growth and biofilm formation by *Aeromonas*. In: Modern multidisciplinary applied microbiology: Exploiting microbes and their interactions. Badajoz, Spain: Willey-VCH, Verlag GmbH & C, 2006.

MAAR, J. H.; ROSENBROCK, L. C. C. A química fina que poderia ter sido: a extração de óleo de sassafrás e de safrol no alto e médio vale do Itajaí. *Scientiae Studia*, p. 799–820, 2012.

MACHADO, K. E. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, v. 43, n. 7, p. 636–639, 2005.

MALHEIROS, A. et al. Antifungal activity of driman sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided. *Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 8, p. 335–339, 2005.

MALHEIROS, A. Estudos Químicos Farmacológicos e Alelopáticos das espécies *Drimys angustifolia* e *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

MAR, J. M. et al. *Lippia origanoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Industrial Crops and Products*, v. 111, n. October 2017, p. 292–297, 2018.

MARANGONI, A. Extração de rotenona com fluido em estado supercrítico em escala industrial. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

MARKOM, M. et al. 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-BLOSCA, Y. et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet. *Journal of Separation Science*, v. 32, n. 10, p. 1748–1756, 2009.

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: Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. .; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 3, p. 380–397, 2010.

- MARTINS, C. et al. Myristicin from nutmeg induces apoptosis via the mitochondrial pathway and down regulates genes of DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 218, p. 1–9, 2014.
- MARTINS, D. Florística, fitossociologia e potencialidades medicinais em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. Florianópolis: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2009.
- MATSUDA, H. et al. Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: Structural requirements and mode of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, n. 3, p. 477–482, 2002.
- MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 4, p. 624–628, 2012.
- MOURÃO MIGUEL, L. Tendências do uso de Produtos Naturais nas Indústrias de Cosméticos da França. *Revista Geográfica de América Central*, v. Número Esp, p. 1–15, 2011.
- PAULETTI, G. Influência ambiental e de parâmetros agrônômicos na produção de poejo (*Cunila galioides* Benth). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technol*, p. 340–372, 2010.
- PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário das Plantas. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 12 maio. 2017.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1163, p. 2–24, 2007.
- PURUSHOTHAMAN, D. N.; RAVI, S. GC-MS analysis of essential oil obtained from *Heracleum candolleianum* (Wight et Arn). *Journal of Pharmacy Research*, v. 6, n. 1, p. 155–157, 2013.
- RAMÍREZ, P. et al. Use of specially designed columns for antioxidants and antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1143, p. 234–242, 2007.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 57, p. 405–424, 2012.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochem Pharmacol.*, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014.

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

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

RIBEIRO, V. L. S. et al. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal Parasitology Research*, v. 102, p. 531–535, 2008.

ROBLES-KELLY, C. et al. Effect of drimenol and synthetic derivatives on growth and germination of *Botrytis cinerea*: Evaluation of possible mechanism of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 141, p. 50–56, 2017.

RODRÍGUEZ, B. et al. Spectral Assignments and Reference Data - A complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for four drimane sesquiterpenoids isolated from *Drimys winteri*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 43, n. 1, p. 82–84, 2005.

SALGIN, U.; DÖKER, O.; ÇALIMLI, A. Extraction of sunflower oil with supercritical CO₂: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 3, p. 326–331, 2006.

SANDRI, I. G. et al. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, v. 103, n. 3, p. 823–828, 2007.

SANTOS, A. C. A. et al. Extração do óleo essencial de *Cunila galioides* utilizando CO₂ supercrítico. *Anais do V Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos*. Anais. Florianópolis, Santa Catarina: UFSC, 2004

SANTOS, T. G. et al. Chemical characterization of essential oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and antibacterial activity of their major compounds. *J. of the Brazilian Chemical Society*, v.24, n.1, p.164–170, 2013.

SCHULTZ, G.; PETERSON, C.; COATS, J. Natural Insect Repellents: Activity against Mosquitoes and Cockroaches. *Natural Products for Pest Management*, v. 927, n. 5, p. 168–181, 2006.

SIBBR, Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/index.php?area=biodiversidade>>. Acesso em: 28 fev. 2018.

SIEBERT, D. A.; ALBERTON, M. D.; MICKE, G. A. Microanálise mediada por eletroforese capilar como método de avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase. XXIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2016.

SIMÕES, C. M. . et al. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 5ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, 1988.

SINGH, D.; AGARWAL, S. K. Himachalol and Beta-himachalene: Insecticidal Principles of *Himalayan Cedarwood* Oil. *Journal of Chemical Ecology*, v. 14, n. 4, p. 1145–1151, 1988.

SOARES, J. C. J. Avaliação da seletividade da extração com CO₂ supercrítico das folhas de *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato) da floresta ombrófila mista de Santa Catarina. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2017.

SOUZA, P. M. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado. Brasília: Universidade de Brasília, 2011.

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

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

TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 539, n. 1–2, p. 190–209, 2018.

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

TEIXEIRA, G. F. et al. Conteúdo de miristicina em preparados de noz moscada (*Myristica fragans*, Houtt). Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 67, n. 1, p. 39–45, 2008.

TRINTA, E. F.; SANTOS, E. Winteráceas. Herbário Barbosa Rodrigues, p. 20, 1997.

VEGGI, P. C.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. Modifier effects on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of some Brazilian plants: Antioxidant activity and Economical evaluation. Procedia Food Science, v. 1, p. 1717–1724, 2011.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology, v. 109, n. 2, p. 359–363, 2007.

WANG, P. et al. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples. Analytica Chimica Acta, v. 663, p. 43–48, 2010.

WITACENIS, A. et al. Pharmacological and toxicological studies of *Drimys angustifolia* Miers. (Winteraceae). Journal of Ethnopharmacology, v. 111, n. 3, p. 541–546, 2007.

YANG, D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. Mycopathologia, v. 148, n. 2, p. 79–82, 1999.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Chapecó: Argo, p. 17–44, 2001.

ZAPATA, N.; SMAGGHE, G. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. Ind. Crops & Products, v. 32, n. 3, p. 405–410, 2010.

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

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