

Santiago Esmiro Cadena Carrera

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE
EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE GUAYUSA (*Ilex
guayusa* L.) POR TÉCNICAS A BAIXA E ALTA PRESSÃO.**

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal de Santa
Catarina

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense

Co-Orientador: Prof. Dr. José Miguel
Müller

Florianópolis
2019

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

Cadena-Carrera, Santiago

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA in vitro DE
EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE GUAYUSA (Ilex guayusa
L.) POR TÉCNICAS A BAIXA E ALTA PRESSÃO / Santiago
Cadena-Carrera ; orientador, Haiko Hense,
coorientador, José Miguel Müller, 2019.

173 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração
supercrítica ESC. 3. Extração por líquido pressurizado
ELP. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade
fúngica. I. Hense, Haiko. II. Müller, José Miguel.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* DE
EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE GUAYUSA (*Ilex
guayusa* L.) POR TÉCNICAS A BAIXA E ALTA PRESSÃO”**

Por

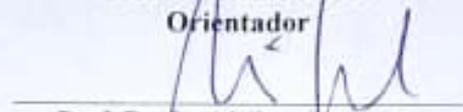
Santiago Esmiro Cadena Carrera

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



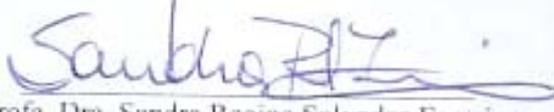
Prof. Dr. Haiko Hense

Orientador



Prof. Dr. José Miguel Mueller

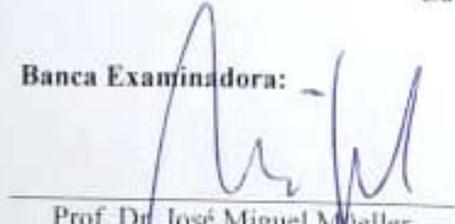
Coorientador



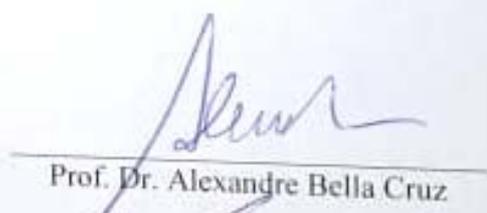
Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coordenadora

Banca Examinadora:



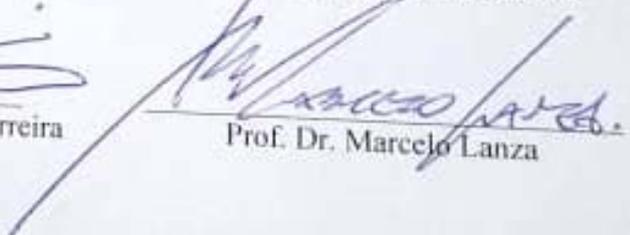
Prof. Dr. José Miguel Mueller



Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz



Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira



Prof. Dr. Marcelo Lanza

Florianópolis, 07 de março de 2019.

Dedico este trabalho à minha mãe Lucila Carrera V. pelo seu amor, exemplo, guia e apoio. Ao meu pai Jaime Cadena Correa (*in memoriam*) pelo apoio e histórias compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar cada momento da minha vida.

A minha família, minha mãe Lucila Carrera, minha irmã Elva e meus irmãos Marlon e Jaime por acreditar em mim, e todo seu apoio.

À família Parolo Tramontin: Senhora Albertina, Senhor Anísio, Dona Carmen, Diele, Balú e especialmente a Deise pelo apoio, carinho, felicidade e tempo compartilhados.

Ao governo da República do Equador especialmente a “*Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnologia SENESCYT*” do Equador pelo apoio financeiro que permitiu a realização do meu doutorado e este trabalho.

Ao meu Orientador Professor Dr. Haiko Hense, por ter aceitado orientar esta pesquisa, pela confiança, dedicação, paciência e os conhecimentos repassados.

Ao meu Co-orientador Professor Dr. José Miguel Müller pela confiança, dedicação, apoio, incentivo e disponibilidade.

Ao Professor Dr. Márcio José Rossi, pelos conhecimentos repassados, pela confiança, disponibilidade e momentos de descontração.

Ao Professor Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI) e a Professora Dra. Rosângela Assis Jacques (UFRGS) pelo apoio, dedicação e disponibilidade que permitiu aprimorar a pesquisa.

Ao Laboratório Yurakuna Food Research Centre (Quito- Equador).

Ao Laboratório de Termodinâmica e tecnologia supercrítica LATESC pelo apoio de infraestrutura, que permitiu a realização dos experimentos.

Aos colegas do LATESC especialmente Heloísa B., Gustavo R., Pedro S. e Simone M. pelos conhecimentos repassados e ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Aos/As Professores/as e amigos/as do PPGEAL UFSC.

"Si quieres aprender los asuntos de las plantas, [...] debes borrar tu historia personal [...] no revelar lo que verdaderamente haces o eres [...] si te conocen te dan por hecho y no puedes romper los lazos de los pensamientos de otros [...]"

Carlos Castaneda, Viaje a Ixtlán.

"What leads and drags the world are not machines, but ideas."

Victor Hugo

RESUMO

A guayusa (*Ilex guayusa* Loes.), uma espécie típica do Equador pertence ao gênero *Ilex* e com suas folhas é preparada uma infusão que tem sido usada há milênios pelas suas propriedades medicinais e psicoativas, e ainda é consumida como fonte de antioxidantes e cafeína.

Entretanto, poucas pesquisas têm sido efetuadas para obter extratos de guayusa usando novas técnicas de extração e avaliar suas propriedades. Atualmente são produzidas e exportadas principalmente folhas de guayusa sem aproveitar completamente o potencial para produzir produtos com valor elevado a partir de extratos.

Considerando isso o presente trabalho teve como objetivo a caracterização das folhas de guayusa (FG), obtenção de extratos de FG usando vários solventes: hexano, acetato de etila, etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água, aplicando técnicas convencionais: Soxhlet e maceração bem como também técnicas a alta pressão, como extração supercrítica (ESC), ESC com adição de cossolventes (etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água) e extração por líquido pressurizado (ELP) usando solventes como etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água.

As FG foram analisadas visando avaliar teores de cafeína, carboidratos, proteínas e lipídeos. Os extratos obtidos foram avaliados com relação a: rendimento da extração (%), teor de compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante (AA) aplicando métodos ABTS e DPPH, atividade antibacteriana e antifúngica e perfil químico mediante técnicas GC-MS e CLAE.

Os resultados das avaliações dependeram da técnica de extração aplicada e características do solvente/cossolvente utilizado.

As FG apresentaram teores de cafeína de $2,27 \pm 0,05$ %, carboidratos ($46,8 \pm 0,2$ %), proteínas ($17,57 \pm 0,07$ %) e lipídeos ($11,8 \pm 0,1$ %), valores maiores aos reportados para outras espécies *Ilex*.

Os rendimentos de extração variaram entre 0,9 % - 39,4 %, os CFT apresentaram valores entre 0,28 - 63,1 mg equivalente de ácido gálico por grama de FG ((GAE) g^{-1}), a AA avaliada mediante o método ABTS apresentou valores entre 0,21 - 163 μmol Equivalente Trolox g^{-1} e valores de IC50 entre 61,9 - 6264 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando avaliada mediante o método DPPH.

Os compostos presentes nos extratos de FG apresentaram maior afinidade com solventes ou cossolventes polares, pois quando avaliado rendimento, CFT e AA, o maior valor foi obtido com a técnica Soxhlet utilizando água como solvente e os menores com a ESC, exceto quando

avaliada a AA mediante a técnica ABTS na qual os melhores resultados foram obtidos usando como solvente a mistura etanol/água (1:1 v/v).

Os extratos de FG obtidos não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações avaliadas, porém apresentaram atividade antifúngica principalmente contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis*.

A análise CG-MS e CLAE determinou que a principal metilxantina presente nos extratos foi a cafeína. Também foram identificados teofilina, esqualeno, α -amirina e o composto fenólico ácido 5-cafeoilquínico. Nesse sentido a técnica ESC com cossolvente etanol apresentou elevada seletividade e mostrou-se versátil, pois dependendo da combinação de pressão e temperatura permitiu obter extratos ricos em cafeína, esqualeno ou α -amirina.

Palavras-chave: *Ilex Guayusa*. Extração Supercrítica. Líquido Pressurizado. Antioxidantes. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

The guayusa (*Ilex guayusa* L.) is a typical specie from Ecuador, it belongs to the *Ilex* genus and with its leaves is brewed an infusion which have being used for centuries by its medicinal a psychoactive properties, and nowadays still is consumed as source of antioxidants and caffeine.

However, few researches have been made in order to get extracts from guayusa using new extraction techniques and evaluating its properties. Currently mainly guayusa leaves are produced and exported without explore thoroughly its potential for producing high value added products from extracts.

Keeping this in, mind this research aimed the characterization of guayusa leaves (FG), obtainment of extracts from FG using many solvents: hexane, ethyl acetate, ethanol, ethanol/water (1:1 v/v) mixture and water applying low pressure extraction techniques such as Soxhlet and maceration, as well as high pressure techniques such as supercritical fluid extraction (ESC), ESC with the addition of eluents (ethanol, ethanol/water (1:1 v/v) mixture and water) and pressurized liquid extraction (ELP) using solvents: ethanol, ethanol/water (1:1 v/v) mixture and water.

The FG were analyzed for determining the caffeine, carbohydrates, protein and fat content. In the extracts obtained were analyzed: global yield (%), total phenolic compounds (CFT), antioxidant capacity (AA) by means of ABTS and DPPH methods, antibacterial and antifungal activity and chemical profile by means of gas chromatography and high performance liquid chromatography.

The results obtained were dependent of the extraction technique and the characteristics of solvent/eluent used.

The FG showed high caffeine content ($2,27 \pm 0,05$ %), carbohydrates ($46,8 \pm 0,2$ %), proteins ($17,57 \pm 0,07$ %) and fats ($11,8 \pm 0,1$ %), which are higher when compared with values reported for other *Ilex* species.

The global yield of extraction varied between 0,9 % - 39,4 %, and the CFT ranged between 0,28 - 63,1 mg of Gallic acid equivalent per g of FG ((GAE) g⁻¹), the AA measured by means of ABTS method showed values between 0,21-163 $\mu\text{mol Trolox equivalents g}^{-1}$ and IC₅₀ values of 61,9 - 6264 $\mu\text{g mL}^{-1}$ when tested with the DPPH methodology.

The compounds in the FG extracts showed high affinity with polar solvents and eluents, because when measured: yield, CFT and AA,

the highest values were obtained with the Soxhlet technique using water as solvent, and the lowest were obtained with ESC technique. Nevertheless, when measured by means of ABTS methodology presented the best results for the mixture ethanol/water (1:1 v/v).

The extracts showed no antibacterial in the concentrations tested, however showed antifungal activity mainly against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis*.

The chemical profile obtained by CG-MS and CLAE showed that the main methylxanthine in the extracts was caffeine. Also were detected theophylline, squalene, α -amyrin and the phenolic compound 5-caffeoylquinic acid. In this regard, the ESC technique with the addition of ethanol as eluent, showed high selectivity and flexibility, because depending of pressure and temperature combination was possible to get extracts rich in caffeine, squalene or α -amyrin.

Keywords: *Ilex Guayusa*. Supercritical fluid extraction. Pressurized liquid extraction. Antioxidants. Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas de <i>Ilex guayusa</i> encontradas em um túmulo datado 1500 a.C.	36
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Ilex guayusa</i>	39
Figura 3. Fotografia de árvore de <i>Ilex guayusa</i>	39
Figura 4. Folhas de <i>Ilex guayusa</i> L.	40
Figura 5. Exportação de guayusa do Equador em toneladas e seu equivalente em milhares de USD.	42
Figura 6. Variação de preços de guayusa exportada USD/ton para o período 2011-2017.	42
Figura 7. Principais destinos das exportações de guayusa desde o Equador para o período 2013-2017.	43
Figura 8. Estrutura das metilxantinas.	49
Figura 9. Estrutura básica de terpenos e derivados de terpeno.	51
Figura 10. Esqualeno.	51
Figura 11. Estrutura das saponinas triterpênicas.	53
Figura 12. Estrutura básica do fenol com anel aromático e um grupo hidroxila.	54
Figura 13. Estrutura de ácido cinâmico e derivados.	56
Figura 14. Derivados do ácido cafeico e ácido quínico.	56
Figura 15. Classificação das técnicas de extração convencional.	64
Figura 16. Unidade de extração supercrítica existente no LATESC.	78
Figura 17. Unidade de extração com fluido pressurizado existente no LATESC.	80
Figura 18. Curva de extração de FG mediante ESC com CO ₂ , P: 200 bar, T: 45 °C, e vazão mássica CO ₂ de 0,5 kg h ⁻¹	94
Figura 19. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO ₂ , mediante planejamento experimental fatorial completo 3 ² , para um nível de confiança de 95 %	96
Figura 20. Isotermas de rendimento da ESC de FG com CO ₂ aplicando planejamento experimental fatorial completo 3 ² , vazão mássica de CO ₂ : 0,5 kg h ⁻¹	97

Figura 21. Curva de extração de FG mediante ESC com cossolvente água (7 %, m/m), P: 150 bar, T: 45 °C, vazão mássica CO ₂ de 0,5 kg h ⁻¹ e tempo 4 h .	98
Figura 22. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO ₂ , mediante planejamento experimental fatorial completo 3 ² , para um nível de confiança de 95 %.	100
Figura 23. Curvas de rendimento de extração da técnica ELP de FG, usando solventes: etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água em temperaturas de 45, 60 e 73 °C, P: 100 bar, durante 30 minutos e vazão mássica de solvente 3,3 g min ⁻¹ .	101
Figura 24. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO ₂ , mediante planejamento experimental fatorial completo 3 ² , para um nível de confiança de 95 %.	103
Figura 25. Variação de rendimento global de extração Y (a), CFT (b), AA (ABTS (c) e IC50 (d)) em função do tempo, para técnica ELP com solvente etanol/água (1:1 v/v) e 75 °C.	124
Figura A-I 1. Curva analítica de ácido gálico padrão, com absorbância no comprimento de onda de 760 nm, para o cálculo de CFT nos extratos de folhas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> L.).	163
Figura A-I 2. Curva analítica de Trólox padrão, com absorbância no comprimento de onda de 734 nm, para o cálculo de AA nos extratos de folhas de guayusa (<i>Ilex guayusa</i> L.).	163
Figura A-II 1. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ESC.	164
Figura A-II 2. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ESC com cossolvente.	164
Figura A-II 3. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ELP.	165
Figura A-III 1. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica ESC	166
Figura A-III 2. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica ESC com cossolvente.	166
Figura A-III 3. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica PLE.	167

Figura A-IV 1. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ESC.	168
Figura A-IV 2. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ESC com cossolvente.	168
Figura A-IV 3. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ELP.	169
Figura A-V 1. Correlação linear entre CFT e AA (ABTS).	170
Figura A-V 2. Correlação linear entre CFT e AA (IC50)..	170
Figura A-VI 1. Cromatograma (GC-MS) do extrato de FG obtido mediante ESC (P 250, T 45 °C)..	171
Figura A- VI 2. Cromatograma (CLAE) do extrato de FG obtido mediante ESC com etanol (P 150, T 75 °C).	171
Figura A-VII 1. Curva calibração cafeína (CLAE)... ..	172
Figura A-VIII 1. Isotermas da ESC para cafeína, expressa em porcentagem de área.....	173
Figura A-VIII 2. Isotermas da ESC com adição de cossolvente etanol para cafeína, expressa em porcentagem de área.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais pesquisas de atividade biológica dos extratos de folhas de <i>Ilex guayusa</i> L.....	45
Tabela 2. Classificação dos fenólicos segundo o número de átomos de carbono.	55
Tabela 3. Atividades biológicas dos principais grupos de metabólitos secundários que podem estar presentes no gênero <i>Ilex</i>	59
Tabela 4. Técnicas de extração aplicadas para obtenção de extratos de folhas de <i>Ilex guayusa</i> L.	65
Tabela 5. Extração de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico mediante CO ₂ supercrítico.....	67
Tabela 6. Exemplo de compostos extraídos aplicando PLE usando diferentes solventes.	69
Tabela 7. Solventes usados para extração convencional.	76
Tabela 8. Cossolventes e solventes usados para extração em alta pressão.....	77
Tabela 9. Combinação dos fatores pressão e temperatura, para o planejamento experimental fatorial completo 3 ² aplicado para a obtenção de isotermas de extração.	79
Tabela 10. Combinação dos fatores pressão, temperatura e cossolvente para o planejamento experimental fatorial 2 ³ aplicado para a ESC.....	80
Tabela 11– Caracterização das FG, secas e moídas.	89
Tabela 12. Rendimento global da extração de FG obtida mediante técnicas convencionais.	92
Tabela 13. Rendimento global da extração de FG mediante CO ₂ supercrítico aplicando planejamento experimental fatorial completo 3 ² , vazão mássica CO ₂ de 0,5 kg h ⁻¹	95
Tabela 14. Rendimento global da extração de FG aplicando ESC junto com diferentes cossolventes (7 % m/m) e diferentes condições de pressão e temperatura, vazão mássica CO ₂ de 0,5 kg h ⁻¹	99
Tabela 15. Rendimento global da extração de FG aplicando técnica ELP, usando solventes etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água	

com temperaturas de 45, 60 e 73 °C e vazão mássica de solvente 3,3 g min ⁻¹	103
Tabela 16. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais.	105
Tabela 17. Teor de compostos fenólicos totais CFT (mg GAE g ⁻¹) reportados para espécies <i>Ilex</i> e chá (<i>C. sinensis</i>).....	107
Tabela 18. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica com CO ₂	108
Tabela 19. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante ESC e cossolventes.	109
Tabela 20. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante líquido pressurizado.	110
Tabela 21. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos por técnicas de extração convencionais.	112
Tabela 22. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica.	113
Tabela 23. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante ESC com cossolventes.	114
Tabela 24. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante ELP.	115
Tabela 25. Atividade antioxidante (AA) reportada para espécies <i>Ilex</i> aplicando metodologia do radical ABTS.....	116
Tabela 26. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais.....	118
Tabela 27. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica com CO ₂ ...	119
Tabela 28. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante ESC e cossolventes.	120
Tabela 29. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos por líquido pressurizado.	122
Tabela 30. Atividade antioxidante (AA) reportada para espécies <i>Ilex</i> aplicando metodologia do radical DPPH.....	123

Tabela 31. Variação de CFT, AA (ABTS e IC50) em função do tempo, para técnica ELP com solvente etanol/água (1:1 v/v) e 75 °C.	124
Tabela 32. Perfil químico determinado mediante CG-MS dos extratos de FG obtidos aplicando técnicas Soxhlet e maceração utilizando solventes hexano, acetato de etila e etanol, técnica ESC e técnica ESC com cossolvente etanol.	127
Tabela 33. Perfil químico determinado mediante CLAE dos extratos de FG obtidos aplicando técnicas Soxhlet, maceração, ESC e ELP usando cossolventes/solventes: etanol, mistura etanol/ água (1:1, v/v) e água.....	129
Tabela 34. Teores de cafeína (C), teobromina (T) e ácido 5-cafeoilquínico (A5COQ) reportados para extratos de I. guayusa e outras espécies Ilex.....	131
Tabela 35. Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra fungos e bactérias para extratos de FG obtidos com diferentes técnicas de extração.	135
Tabela 36. Resumo dos resultados obtidos para extratos de FG aplicando diferentes técnicas de extração.....	137

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
AANPs	Aminoácidos não proteicos
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHA	Butil hidroxianisol
CEREMIC	Centro de Referência Microbiológica
CFT	Compostos fenólicos totais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE/HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ELP	Extração com líquido pressurizado
EREs	Espécies reativas de enxofre
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Extração supercrítica
FAN	Fatores antinutricionais
FG	Folhas de guayusa
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GAE	Equivalente de ácido gálico
GC-MS	Cromatografia gasosa – Espectrômetro de massa
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC50	Concentração inibitória necessária para reduzir 50 % de radicais livres
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
Mac	Maceração
MAU	Maceração assistida por ultrassom
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
TBHQ	Terc-butil-hidroxi-quinona
ton	Tonelada métrica
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
TUHH	<i>Technische Universität Hamburg-Harburg</i>
USD	Dólar dos Estados Unidos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
Y	Rendimento global

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 OBJETIVOS.....	32
1.1.1 Objetivo geral	32
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 O GÊNERO ILEX.....	35
2.1.1 <i>Ilex Guayusa</i> Loesener	37
2.1.1.1 Referência histórica sobre a Guayusa.....	37
2.1.1.2 A Guayusa	38
2.1.1.2.1 <i>Processamento da guayusa</i>	40
2.1.1.2.2 <i>Importância econômica da guayusa</i>	41
2.1.1.2.3 <i>Atividade biológica da guayusa</i>	44
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	46
2.2.1 Metabólitos secundários contendo nitrogênio	48
2.2.1.1 Alcaloides	48
2.2.1.1.1 <i>Metilxantinas</i>	49
2.2.2 Metabólitos secundários sem nitrogênio	50
2.2.2.1 Terpenóides	50
2.2.2.1.1 <i>Esqualeno</i>	51
2.2.2.2 Saponinas.....	51
2.2.2.2.1 <i>Saponinas triterpênicas</i>	52
2.2.2.2.2 <i>Saponinas esteroides</i>	53
2.2.2.3 Fenilpropanoides	53
2.2.2.3.1 <i>Ácidos cinâmicos</i>	55
2.2.3 Atividade biológica dos metabólitos secundários	57

2.2.3.1 Radicais livres e antioxidantes.....	60
2.2.3.1.1 <i>Espécies reativas: radicais</i>	60
2.2.3.1.2 <i>Atividade antioxidante</i>	61
2.2.3.1.3 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	62
2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	63
2.3.1 Técnicas de extração convencional	63
2.3.2 Técnicas de extração não convencionais	65
2.3.2.1 Extração supercrítica (ESC)	65
2.3.2.1.1 <i>CO₂ supercrítico</i>	66
2.3.2.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)	68
3 MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	71
3.1.1 Teor de umidade e substâncias voláteis	71
3.1.2 Teor de cinzas	72
3.1.3 Extrato etéreo (lipídeos)	72
3.1.4 Teor de fibra bruta	73
3.1.5 Teor de proteína bruta	73
3.1.6 Teor de carboidratos totais	74
3.1.7 Teor de cafeína	74
3.1.8 Tamanho de partícula	74
3.1.9 Densidade real ou massa específica real	75
3.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	75
3.2.1 Técnicas de extração convencionais	76
3.2.1.1 Soxhlet	76

3.2.1.2 Maceração	76
3.2.2 Técnicas de extração a alta pressão	77
3.2.2.1 Extração com CO ₂ supercrítico	77
3.2.2.1.1 Curva de extração	78
3.2.2.1.2 Isotermas de rendimento	79
3.2.2.1.3 Extração com CO ₂ supercrítico e cossolvente... 79	
3.2.2.2 Extração com líquido pressurizado (ELP).....	80
3.3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS	81
3.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT)	81
3.3.2 Atividade antioxidante	82
3.3.2.1 Método de captura do radical ABTS	82
3.3.2.1. Método de captura do radical DPPH.....	83
3.3.3 Análise estatística	84
3.3.4 Perfil químico dos extratos	84
3.3.4.1 Análise mediante cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS).....	84
3.3.4.2 Análise mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	85
3.3.5 Atividade antibacteriana e antifúngica	86
3.3.5.1 Microrganismos e meios de cultura.....	86
3.3.5.2 Concentração inibitória mínima CIM.....	87
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	89
4.2 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO	91
4.2.1 Técnicas convencionais	91
4.2.2 Técnicas a alta pressão.....	93

4.2.2.1 ESC com CO ₂	93
4.2.1.2 ESC com adição de cossolvente	98
4.2.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)	100
4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)	104
4.3.1 Técnicas convencionais	104
4.3.2 Técnicas a alta pressão	107
4.3.2.1 ESC com CO ₂	107
4.3.2.2 ESC com adição de cossolvente	108
4.3.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)	110
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA).....	111
4.4.1. ABTS	111
4.4.1.1 Técnicas convencionais	111
4.4.1.2 Técnicas a alta pressão.....	112
4.4.1.2.1 ESC com CO ₂	112
4.4.1.1.2 ESC com cossolventes.....	113
4.4.1.1.3 ELP	114
4.4.2 DPPH	117
4.4.2.1 Técnicas convencionais	117
4.4.2.2 Técnicas a alta pressão.....	119
4.4.2.2.1 ESC com CO ₂	119
4.4.1.1.2 ESC com cossolventes.....	120
4.4.1.1.3 ELP	121
4.5 VARIAÇÃO DE CFT E AA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO	123
4.6 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS.....	125

4.6.1 Análise mediante cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS)	125
4.6.2 Análise mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	128
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	132
5 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	143
APÊNDICES	163
APÊNDICE I	163
APÊNDICE II	164
APÊNDICE III	166
APÊNDICE IV	168
APÊNDICE V	170
APÊNDICE VI	171
APÊNDICE VII	172
APÊNDICE VIII	173

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Por que?

1. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) tem uso milenar na medicina tradicional.
2. Guayusa possui efeitos estimulantes.
3. Guayusa como fonte de compostos com propriedades biológicas.
4. Espécie com relevância socioeconômica para o Equador.

O que consta na literatura?

1. Apenas três pesquisas foram publicadas visando extração e análise de compostos com atividade antioxidante de FG, todas utilizando técnicas de extração convencionais: maceração e Soxhlet.
2. Não existe na literatura trabalhos sobre extração de Guayusa aplicando técnicas em alta pressão ou aplicando técnicas /solventes considerados GRAS.

Hipóteses

1. Técnicas de alta pressão (ESC e ELP) permitem obter extratos de folhas de guayusa com atividade biológica.
2. Extratos de folhas de guayusa apresentam atividade antioxidante.
3. Extratos de folhas de guayusa apresentam atividade antimicrobiana.

Principais métodos experimentais

1. Técnicas de extração convencionais Soxhlet e maceração aplicando solventes de diferente polaridade: hexano, acetato de etila, etanol, etanol/água (50 %, v:v) e água.
2. Técnicas de extração em alta pressão: CO₂ supercrítico.
3. Técnicas de extração em alta pressão, CO₂ supercrítico e cossolventes: etanol, etanol/água (50 %, v:v) e água.
4. Técnicas de extração em alta pressão, líquido pressurizado: etanol, etanol/água (50 %, v:v) e água.
5. Análise de compostos fenólicos totais usando reagente Folin-Ciocalteu.
6. Análise de atividade antioxidante, mediante radicais ABTS e DPPH.
7. Análise de atividade antibacteriana e antifúngica.
8. Perfil químico mediante HPLC e CG-MS.

Respostas

- Avaliar extrato com melhor rendimento de extração.
- Avaliar extrato com melhor atividade antioxidante.
- Avaliar extrato com melhor teor de fenólicos totais.
- Avaliar extrato com melhor potencial antimicrobiano.

1 INTRODUÇÃO

A localização geográfica do Equador, isso é, paralelo zero e a cordilheira dos Andes, faz com que as plantas recebam maior quantidade de radiação solar. Segundo Jaakola e Hohtola (2010), as condições climáticas afetam a biossíntese de vários fitoquímicos e a maior incidência de radiação UV pode incrementar, por exemplo, a produção de ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides entre outros. Assim o tipo e quantidade de metabólitos secundários das plantas nestas localizações e especificamente do Equador e o potencial para seu aproveitamento podem ser maiores. Mesmo que aproximadamente 100 mil metabólitos secundários de plantas tenham sido identificados, apenas uma pequena porcentagem das espécies vegetais tem sido pesquisada à sua procura (GHOSH; JHA, 2008), sem levar em conta que existem espécies endêmicas ainda nem sequer pesquisadas.

A presença desses fitoquímicos faz com que muitas espécies de plantas possuam propriedades que têm sido aproveitadas ao longo dos séculos, por grupos étnicos que habitam o território equatoriano (RONDÓN et al., 2017).

Entre as plantas que têm sido empregadas há milênios está a guayusa (*Ilex guayusa* Loes), uma espécie típica do Equador, que tem sido usada na medicina tradicional com vários propósitos, por exemplo: estimulante do sistema nervoso e imunológico, nos tratamentos de resfriados e congestionamento das vias respiratórias, nas infecções e doenças venéreas, entre outras aplicações descritas na literatura (BAILEY; DAY, 1989; DUEÑAS et al., 2013; GARCIA et al., 2017; PARDAU, 2016; RUSSO et al., 2009; SCHULTES, 1972; VÁSQUEZ, 2015; WASSEN, 1974).

A guayusa apresenta-se também como uma fonte alternativa de compostos fenólicos (GARCIA et al., 2017; PARDAU, 2016). Estes compostos são de especial interesse, pois são multifuncionais e podem agir como agentes redutores e antioxidantes doadores de hidrogênio, apresentando propriedades relevantes no combate dos radicais livres e assim reduzir o efeito oxidativo (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Nesse contexto, o aproveitamento de extratos contendo antioxidantes fenólicos naturais, como o caso da guayusa, apresenta elevado potencial. Se forem isolados e processados, podem ser úteis para a aplicação na indústria de alimentos, como fármacos ou em

substituição dos antioxidantes sintéticos atualmente usados, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) (HAO et al., 2013), uma vez que os antioxidantes sintéticos poderiam acarretar riscos à saúde devido a sua possível ação carcinogênica (ENNEKING e WINK, 2000; VIEITEZ et al., 2017).

Atualmente, pesquisas visando à análise da atividade biológica de espécies nativas e endêmicas do Equador são escassas ou inexistentes, limitando seu aproveitamento, como o caso da guayusa. Apenas três pesquisas foram publicadas visando extração e análise de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante, todas utilizando técnicas de extração convencionais: maceração e Soxhlet (GARCIA et al., 2017; JARA et al., 2013; VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2018). Até o momento nenhuma pesquisa foi realizada aplicando técnicas de extração supercrítica ou fluido pressurizado. Assim esta pesquisa é inédita ao aplicar técnicas de alta pressão para extração de compostos bioativos das folhas de guayusa.

Pesquisas inéditas, como o presente estudo, promovem o desenvolvimento tecnológico - científico por meio da aplicação de tecnologias sustentáveis que permitam criar vantagens competitivas baseadas na agregação de valor e uso de novas tecnologias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar extratos de folhas de guayusa (*Ilex guayusa* L.) quanto a composição e atividade biológica *in vitro* obtidos aplicando diferentes solventes em técnicas de extração convencionais e técnicas a alta pressão.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a caracterização química (composição centesimal) das folhas de guayusa FG quanto a: umidade, cinzas, lipídeos, fibra bruta, proteína bruta, carboidratos totais e cafeína, bem como a caracterização física das FG moídas quanto a: tamanho de partícula e densidade real.

- b) Obter extratos de folhas de guayusa (FG) mediante técnicas convencionais: Soxhlet e maceração, com uso de solventes orgânicos de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila, etanol, mistura etanol/água (1:1, v/v), água).
- c) Determinar o rendimento em técnicas convencionais para escolher o cossolvente a ser aplicado na técnica de alta pressão.
- d) Avaliar o efeito da variação de pressão e temperatura na obtenção de extratos de FG mediante técnica de alta pressão: extração supercrítica com CO₂ puro (ESC), aplicando um planejamento experimental tipo fatorial completo 3².
- e) Avaliar a influência da adição de cossolventes (etanol, mistura etanol / água (1:1 v/v) e água) na técnica ESC na obtenção de extratos de FG, aplicando um planejamento fatorial 2³.
- f) Avaliar a influência da temperatura e tipo de solvente (etanol, mistura etanol/água (1:1, v/v) e água) na obtenção de extratos de FG mediante técnica de alta pressão: extração com líquido pressurizado (ELP), aplicando um planejamento experimental tipo fatorial completo 3².
- g) Determinar o rendimento de extração para técnicas de alta pressão: ESC (CO₂ puro, CO₂ com cossolvente: etanol, mistura etanol / água (1:1, v/v), água) e ELP.
- h) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos com técnicas convencionais e com técnicas de alta pressão mediante os métodos *in vitro* 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS).
- i) Determinar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos com técnicas convencionais e com técnicas de alta pressão mediante o método Folin-Ciocalteu.
- j) Realizar análise comparativa entre todas as técnicas utilizadas no que tange ao rendimento, atividade antioxidante e CFT.
- k) Realizar análise de atividade antibacteriana e antifúngica, concentração inibitória mínima CIM, de todos os extratos obtidos.
- l) Identificar o perfil de composição dos compostos voláteis existentes nos extratos obtidos por meio de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS).
- m) Identificar o perfil de composição dos extratos obtidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO ILEX

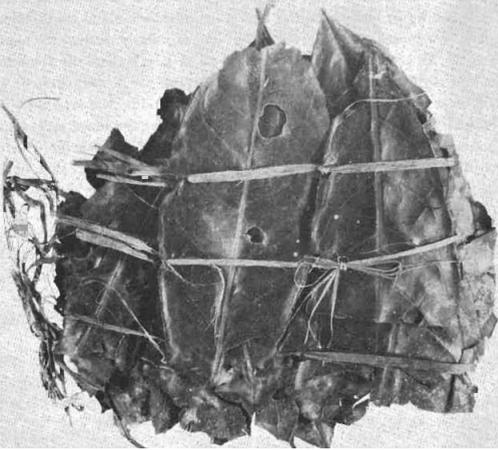
O gênero *Ilex* pertence à família *Aquifoliaceae* com aproximadamente 600 espécies (LOIZEAU et al., 2005 apud DUEÑAS et al., 2013; YI et al, 2016) tem ocorrência em todos os continentes, com exceção da Antártida, especialmente em lugares com elevados índices de precipitação e umidade como o Leste Asiático e América do Sul. Na América do Sul encontram-se aproximadamente 300 espécies do gênero *Ilex* (DUEÑAS et al., 2013; EDWARDS; BENNETT, 2005), enquanto na China tem sido reportadas 200 espécies (YI et al, 2016).

Seu uso no mundo todo é muito antigo, principalmente por grupos étnicos, que apreciavam as suas propriedades medicinais e estimulantes. Na China existem registros do uso da *I. latifolia* e *I. kudingcha* há aproximadamente 2000 anos (HAO et al., 2013). Na América do Sul preparava-se uma bebida com as folhas da *I. paraguayensis* consumida pelos Guaranis desde a era pré-colombiana (EDWARDS; BENNETT, 2005; YI et al., 2016). Os nativos do Sudeste de América do Norte preparavam uma bebida denominada “*Black drink*”, elaborada com a *I. vomitoria* subespécie *chiapensis* (Sharp) conhecida como “yaupon” ou com a *I. cassine* também desde a era pré-colombiana (EVANS, 1984; PATIÑO, 1963; SCHULTES, 1972).

A *I. guayusa* tem sido usada em rituais por etnias do Equador, Peru e Colômbia há muito tempo. Seu uso milenar pode ser evidenciado pelos vestígios arqueológicos datados em 1500 a.C., achados em um túmulo na Bolívia onde foram encontrados maços de FG (Figura 1) junto com outros utensílios ritualísticos (EVANS, 1984; DICKAU; REDWOOD; COOKE, 2012).

Atualmente ainda são consumidas no mundo todo como infusão algumas espécies *Ilex*, bem como na antiguidade, devido ao seu sabor especial, efeito estimulante e propriedades medicinais, destacando-se entre elas: Kudingcha (*I. latifolia* e *I. kudingcha*), erva-mate (*I. paraguayensis* e *I. brevicuspis*), guayusa (*I. guayusa*), yaupon (*I. vomitoria*) e o chá “apalache” (*I. glabra*), que são as mais populares. Também na China algumas espécies *Ilex* são usadas como remédios da medicina tradicional chinesa (YI et al, 2016).

Figura 1. Folhas de *Ilex guayusa* encontradas em um túmulo datado 1500 a.C.



Fonte: Schultes (1972).

As propriedades do gênero *Ilex* tem chamado a atenção, com perspectiva farmacológica desde 1980 (HAO et al., 2013). A partir de então mais de 200 compostos têm sido isolados e identificados no gênero *Ilex*, dentre os quais destacam as metilxantinas, terpenóides, saponinas, esteróis, compostos fenólicos, ácidos carboxílicos, e outros compostos lipofílicos (JACQUES et al., 2007; YI et al, 2016).

Alguns estudos tem avaliado a atividade biológica desses compostos e entre as principais propriedades atribuídas a eles estão: a atividade antioxidante, que é importante no combate ao estresse oxidativo (RUPASINGHE, 2014 apud GARCIA et al., 2017), promoção da resposta imune e redução do risco de doenças degenerativas tais como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas e degeneração macular (GARCIA et al, 2017), modulação da atividade do metabolismo lipídico, anti-obesidade, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral (YI et al, 2016). Isso evidencia o grande potencial que possui o gênero *Ilex* desde uma perspectiva farmacológica.

Entretanto, nem todas as espécies *Ilex* possuem os mesmos compostos, pelo contrário variam em quantidades e características de espécie a espécie, e em muitos casos a sua presença ou ausência é um fator chave na identificação, por exemplo, quando se compara *I. paraguariensis* e *I. kudingcha*, a erva-mate possui metilxantinas, enquanto a kudingcha não possui (HAO et al., 2013). Por isso é

necessário avaliar cada uma das espécies no que tange aos constituintes e propriedades medicinais.

2.1.1 *Ilex Guayusa* Loesener

2.1.1.1 Referência histórica sobre a Guayusa

Como citado anteriormente, a guayusa é usada pelo menos há 1500 anos pelos povos que habitam o território da Amazônia equatoriana (DUEÑAS et al., 2013).

A primeira descrição da guayusa pode ser atribuída ao Jesuíta, Juan Lorenzo Lucero em 1682, quando durante uma excursão feita na Amazônia do Equador ele descreve uma etnia denominada “Jívaros” atualmente a Untsuri Shuar. Entre os rituais praticados por eles e principalmente dos xamãs ou homens da medicina consistia no uso da guayusa junto com outras plantas como tabaco enquanto realizavam rituais médico-mágicos; também todos os membros da tribo consumiam uma decocção feita com FG várias vezes ao dia (BENNETT, 1992; PATIÑO, 1963).

Posteriormente, em 1738, o missionário católico italiano Padre Pablo Maroni, descreveu que o uso da guayusa passou dos nativos para os exploradores, principalmente entre os missionários, que usavam a guayusa na ausência de medicamentos para problemas estomacais, na forma de decocção das folhas, a mesma que era consumida diariamente com suco de limão ou laranja (PATIÑO, 1963).

Em 1740, outro Jesuíta, Juan Magnin, trabalhou na elaboração do mapa da Amazônia e, descreveu as plantas usadas pelos nativos das regiões de Borja, Santiago e Archidona (atual território do Equador). Além da coca e do amendoim descreveu uma “poção” benéfica feita com FG que, quando fervida, torna a água preta como tinta, e era a bebida preferida dos habitantes daquela região (PATIÑO, 1963).

Foram os Jesuítas que espalharam o uso da guayusa e estabeleceram um mercado lucrativo para as suas folhas. Assim, a guayusa tornou-se muito popular entre os Jesuítas e entre os habitantes do Equador principalmente Quito, mas também em lugares como Peru, Colômbia e até na Europa. Os Jesuítas utilizavam a guayusa como curativa para infecções venéreas, resfriados, limpeza do sangue, melhora da digestão e apetite, etc. (PATIÑO, 1963; SCHULTES, 1998), e na Europa foi bem aceita tanto que é reportada como planta

tradicionalmente usada no tratamento da diabetes (SOUMYANATH, 2006).

Porém, com o abandono das missões devido à expulsão dos Jesuítas das colônias espanholas em América em 1766, a planta caiu em desuso e apenas em meados do século XIX houve algumas menções sobre seu uso, sendo o mesmo confinado às tribos de nativos da região Amazônica do Equador (PATIÑO, 1963; SCHULTES, 1979).

Em 1901 Loesener fez a primeira identificação científica e descrição botânica. Ele denominou a espécie como *Ilex guayusa* destacando sua similaridade com a *I. paraguariensis* e *I. nitida*. Ele distinguiu a guayusa por suas longas folhas, cujas pontas são agudamente acuminadas (que se afinam na ponta). Na descrição original, Loesener enfatizou sua origem como Equador e o norte do Peru (SCHULTES, 1972). Porém, essa descrição botânica pode ser considerada polêmica, pois Loesener fez a descrição com material incompleto, estéril, sem material floral disponível e o próprio Loesener colocou como duvidosa sua descrição (LOIZEAU; BARRIERA, 2007 apud DUEÑAS et al., 2003; LOESENER, 1901 apud PATIÑO, 1963; LOESENER, 1901 apud SCHULTES, 1979).

Desde então, tem-se publicado pouco sobre a história natural e ecológica da guayusa. Suas flores foram descritas aproximadamente 80 anos depois da descrição da espécie (SHEMLUCK, 1979 apud DUEÑAS et al., 2013).

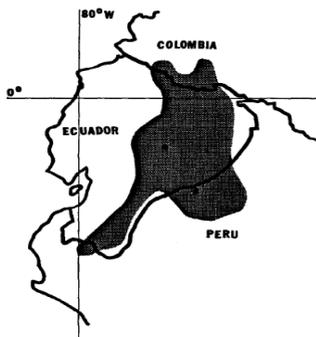
Atualmente, tem sido reportado o uso da guayusa como estimulante e medicamento em pelo menos seis grupos indígenas da Amazônia do Equador: Cofán, Secoya, Záparo, Achuar, especialmente nas Kichwa e Shuar; e pelo menos em três grupos de outras regiões: Kichwa da Serra, Mestizo e Tsa'chi (BENNETT, 1992; DE LA TORRE et al., 2008; KVIST e HOLM-NIELSEN, 1987 apud DUEÑAS et al., 2013; GARCIA et al., 2017).

2.1.1.2 A Guayusa

A guayusa é uma espécie arbórea que se distribui desde o norte peruano, em todo o território da Amazônia do Equador, até o sul da Colômbia entre os 200 a 2500 m acima do nível do mar (LOIZEAU; BARREIRA, 1999 apud DUEÑAS et al., 2013), porém também tem sido reportado o crescimento de guayusa em altitudes de até 3000 m,

especificamente no Vale Sibundoy, Departamento do Putumayo, Colômbia (DUEÑAS et al., 2016).

Figura 2. Distribuição geográfica de *Ilex guayusa*.



Fonte: Lewis et al. (1991)

As árvores de guayusa (Figura 3) podem atingir uma altura média de 10 metros e um diâmetro médio de 500 a 800 mm, possui um tronco bifurcado, casca branca e textura lisa, com galhos compridos e flexíveis que apresentam uma folhagem densa (CARANQUI; HUMANTE, 2010; DUEÑAS et al., 2013).

Figura 3. Fotografia de árvore de *Ilex guayusa*.



Fonte: Alvarado (2016).

As folhas (Figura 4) são a única parte da árvore que é utilizada e apresentam uma textura coriácea, de cor verde escura, elípticas, acuminadas, simples e dentadas. Seu comprimento varia entre 150 - 210 mm, e largura entre 50 - 75 mm, pecíolo curto de 10 mm de comprimento (CARANQUI; HUMANTE, 2010). Quando comparada com a erva-mate a guayusa possui folhas muito mais longas (SCHULTES, 1979).

Figura 4. Folhas de *Ilex guayusa* L.



Fonte Alvarado (2016); Chankuap (2014)

Porém, existem plantas de outros gêneros, principalmente *Piperaceae*; que são denominadas popularmente como guayusa ou nomes semelhantes, e são confundidas com a *I. guayusa*. Isso acontece, por exemplo, no Peru, onde existe uma outra planta conhecida como guayusa ou huayosa (RENGIFO; CERRUTI, 1997).

2.1.1.2.1 Processamento da guayusa

O processamento industrial da guayusa é similar ao processamento do chá (*Camellia sinensis*). O processo começa com a colheita manual das folhas frescas, posteriormente são submetidas à pré-secagem. Depois, e dependendo das características do produto final, efetua-se uma secagem completa ou a fermentação. Finalmente a trituração/peneiramento e a embalagem (DUEÑAS et al., 2013; EL TELÉGRAFO, 2015; GARCIA et al., 2017; IMBAQUINGO, 2016;

PARDAU, 2016; UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM, 2017; VÁSQUEZ, 2015).

2.1.1.2.2 Importância econômica da guayusa

Atualmente, no mundo, existe demanda de produtos com as propriedades benéficas que possuem os representantes do gênero *Ilex*. Por exemplo, quando se analisa o caso da erva-mate, esta é uma espécie que é aproveitada grandemente e constitui uma atividade econômica importante para a região Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina.

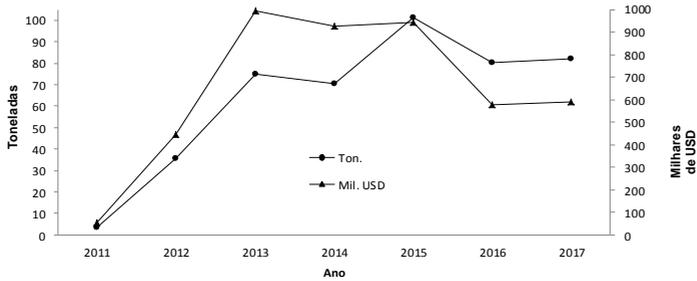
O maior produtor de erva-mate no ano de 2015 foi a Argentina, que nesse ano produziu aproximadamente 290 mil ton, e exportou aproximadamente 34 mil ton, equivalendo a 104 milhões de dólares dos Estados Unidos (USD). O principal destino das exportações de erva-mate argentina foi o Oriente Médio, principalmente Síria, Líbano e Israel que importaram aproximadamente 65 % da exportação total de erva-mate (SCHINELLA et al., 2009; WILSON; VERPOORTE, 2012).

Neste contexto a guayusa apresenta um grande potencial, pois as propriedades medicinais e estimulantes que apresenta, faz dela uma alternativa à erva-mate, além de que quando comparadas as características organolépticas da guayusa com as da erva-mate, a guayusa se caracteriza por possuir um sabor mais suave, fino e menos amargo (CAF, 2011; RUNA, 2014 apud PARDAU, 2016; SPRUCE, 1908 apud SCHULTES, 1972; SERRA, 1956 apud SCHULTES, 1979; GARCIA et al., 2017).

As exportações de FG (Figura 5) desde o ano 2011 até 2015 tiveram uma tendência crescente, atingindo o valor máximo de 101 ton em 2015. Porém, a partir de 2015 apresentou uma tendência decrescente e atualmente as exportações de FG são baixas, atingindo um mínimo de 82 ton no ano 2017 (BANCO CENTRAL DEL ECUADOR-BCE, 2017).

O equivalente em USD das exportações de FG (Figura 5) também tem apresentado variações. No período 2011-2013 houve uma tendência crescente nas exportações que atingiu o valor de 992,6 mil USD em 2013. Contudo, desde então o equivalente em USD por exportações tem diminuído até 589 mil USD no ano 2017 (BANCO CENTRAL DEL ECUADOR-BCE, 2017).

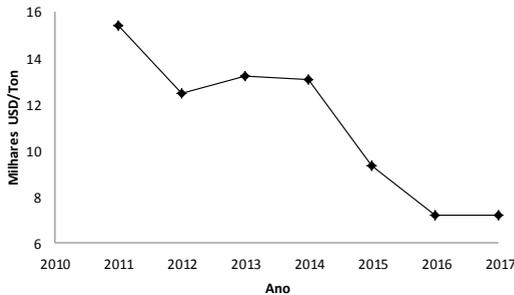
Figura 5. Exportação de guayusa do Equador em toneladas e seu equivalente em milhares de USD.



Fonte: Banco Central Equador (2017).

Os preços de guayusa por tonelada também apresentam uma tendência decrescente durante o período 2011-2017 (Figura 6). O maior preço foi no ano de 2011 com valores de 15,4 mil USD/ton, e para o ano 2017 um preço de 7,2 mil USD/ton, apresentando uma variação de -52 % (BANCO CENTRAL DEL ECUADOR-BCE, 2017).

Figura 6. Variação de preços de guayusa exportada USD/ton para o período 2011-2017.



Fonte: Banco Central Equador (2017).

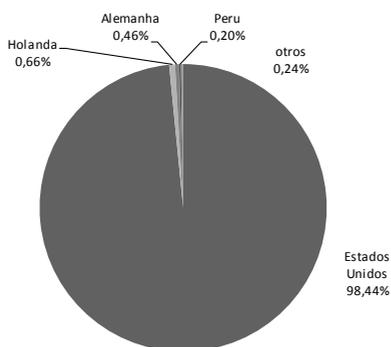
A baixa produção de guayusa pode estar relacionada com algumas debilidades existentes na cadeia de produção devido à falta de conhecimento produtivo por parte dos agricultores, baixa integração entre os membros da cadeia de produção e a existência de poucas áreas cultivadas no país para satisfazer a demanda (CAF, 2011).

A existência de poucas áreas cultivadas pode ser devido ao fato de que o cultivo da guayusa não está baseado na monocultura intensiva, mas pelo contrário, a árvore de guayusa cresce sob a sombra de árvores maiores, o que permite aplicar o sistema agro florestal e tem ajudado ao reflorestamento da região com espécies nativas (IMBAQUINGO, 2010).

Em viveiros comunitários, por exemplo, no período 2010 a 2012, em torno de 150 mil plantas de guayusa foram distribuídas entre 750 famílias de camponeses principalmente na província de Napo (DUEÑAS et al., 2013) que realizam a colheita das FG a cada 3 meses (IMBAQUINGO, 2010). Boa parte das árvores de guayusa são plantadas em terras pertencentes a comunidades nativas da Amazônia e a colheita das suas folhas tem se convertido em fonte de renda para camponeses indígenas e comunidades dessa região do Equador (RUNA, 2014 apud PARDAU, 2016).

O principal destino para as exportações de guayusa é Estados Unidos (Figura 7), que durante o período de 2013 a 2017, teve como destino 98 % das exportações, equivalente a 402 ton, e 3,9 milhões USD, enquanto outros países não atingem 1 %, entre eles Holanda, com apenas 0,66 %, equivalente a 2,7 ton e 15,3 mil USD (BANCO CENTRAL DEL ECUADOR-BCE, 2017).

Figura 7. Principais destinos das exportações de guayusa desde o Equador para o período 2013-2017.



Fonte: Banco Central Equador (2017).

A elevada dependência das exportações de guayusa ao mercado Norte Americano pode ser devido ao fato de que os principais produtores/exportadores de guayusa no Equador são empresas dos

Estados Unidos: Fundação Runa, com sede em Brooklyn-New York, junto com a empresa Runatarpuna Exportadora S.A., (CUENCAHIGHLIFE, 2015; DUEÑAS et al., 2013) que exportam produto semiprocessado (CUENCAHIGHLIFE, 2015; GONZÁLEZ, 2013), principalmente folhas secas, onde costumam ser ingredientes de bebidas energéticas (VÁSQUEZ, 2015).

A exportação de FG ou produtos derivados com pouco ou nenhum valor agregado evidencia a necessidade de desenvolver pesquisas relacionadas, principalmente devido ao seu potencial, uma vez que espécies do gênero *Ilex* são usadas como plantas com importante viabilidade econômica por seu elevado teor de cafeína (SANSOME-SMITH, 2016), ou devido aos compostos presentes em suas folhas, que quando isolados podem ser aproveitados na produção de produtos fitoterápicos para o tratamento de sobrepeso e obesidade, suplementos dietéticos, antioxidantes, entre outras utilizações (HAO et al., 2013 apud DUEÑAS et al., 2013; SCHULTES, 1972).

2.1.1.2.3 Atividade biológica da *guayusa*

Há muito tempo, têm sido atribuídas várias propriedades à *guayusa*, entre as mais conhecidas estão: estimulante do sistema nervoso e imunológico, redutor da glicemia nos pacientes com diabetes, protetor da próstata e rins. Tem sido aplicada nos tratamentos de: infertilidade em mulheres, pós-parto, resfriados, congestionamento de vias respiratórias, distúrbios estomacais, infecções venéreas, eliminação de cálculos renais entre outras (BAILEY; DAY, 1989; DUEÑAS et al., 2013; GARCIA et al., 2017; PARDAU, 2016; RUSSO et al., 2009; SCHULTES, 1972; VÁSQUEZ, 2015; WASSER, 1974).

Entre os compostos presentes nas FG, até agora identificados estão as metilxantinas (cafeína, teofilina, teobromina), principalmente a cafeína em quantidades superiores às do café e do chá (*Camellia sinensis*) (COLÔMBIA, 2008; SCHULTES, 1998), taninos, compostos fenólicos, flavonoides, quinonas, esteroides, terpenóides, lactonas, lactonas terpênicas, guanidina, saponinas, saponinas triterpênicas, compostos cumarínicos, óleos essenciais (COLÔMBIA, 2008; BAILEY; DAY, 1989; CARPINTERO; SALAZAR, 2007; DICKAU; REDWOOD; COOKE, 2012; LEWIS et al., 1991; RUIZ, ROQUE; 2009; RUSSO et al., 2009; SWANSTON-FLATT et al., 1988).

Mesmo assim, ainda existe pouca pesquisa para avaliar e aproveitar os potenciais benefícios que a guayusa pode apresentar. A maioria das pesquisas realizadas têm um enfoque geral de caracterização, identificação e quantificação de cafeína (CARPINTERO; SALAZAR, 2014; COLÔMBIA, 2008; DICKAU; REDWOOD; COOKE, 2012; RADICE e VIDARI, 2007; SCHULTES, 1998). Apenas três pesquisas foram publicadas visando análise de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (GARCIA et al., 2017; JARA et al., 2013; VILLACIS-CHIRIBOGA et al., 2018).

Todos os processos de extração dos compostos de FG disponíveis na literatura são processos convencionais, comuns e tradicionais, isso é: maceração, Soxhlet, infusão e percolação, nenhuma pesquisa tem sido publicada visando o uso de técnicas de alta pressão, como extração com fluido supercrítico ou com fluido pressurizado. Bem como nenhuma pesquisa tem procurado avaliar a melhor alternativa para a recuperação/fracionamento de compostos fenólicos ou alcaloides provenientes das FG.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo das pesquisas mais relevantes publicadas visando avaliar a atividade biológica de extratos de folhas de guayusa.

Tabela 1. Principais pesquisas de atividade biológica dos extratos de folhas de *Ilex guayusa* L.

Solvente	Compostos alvo	Atividade biológica	Fonte
Água	-	Tratamento para diabetes	Swanston-Flatt et al., 1989
Água	Metilxantinas	Efeito estimulante	Lewis et al., 1991
Água	Metilxantinas	Efeito estimulante	Colômbia, 2008
Metanol; Etanol+água	Extrato de folhas	Atividade antimicrobiana	Ruiz e Roque, 2009
Etanol Acetato de etila	Fenólicos - flavonóides	Atividade antioxidante	Jara et al., 2013
Água	Fenólicos	Atividade antioxidante e antiinflamatória	Pardau, 2016
Metanol+água	Fenólicos derivados do ácido hidroxicinnâmico	Atividade antioxidante	Garcia et al., 2017
Acetona 70%	Fenólicos	Atividade antioxidante e antiinflamatória	Villacis-Chiriboga et al., 2018

As propriedades da guayusa, que permitem sua aplicação para usos diversos ocorre devido à presença de uma grande diversidade de

compostos fitoquímicos denominados metabólitos secundários (HOPKINS; HÜNER, 2009).

A seguir se descrevem rapidamente os grupos de metabólitos secundários mais relevantes encontrados na família Ilex, principalmente aqueles presentes na guayusa e solúveis em solventes ambientalmente seguros ou GRAS (*generally recognized as safe*).

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A distinção entre metabólito primário¹ e secundário não é fácil, pois compartilham várias das mesmas moléculas precursoras e são derivados das mesmas vias metabólicas (GHOSH; JHA, 2008; HOPKINS; HÜNER, 2009).

Os metabólitos secundários estão presentes em todas as plantas e apresentam uma grande diversidade estrutural (WINK, 2003). Embora aproximadamente 50 mil compostos tenham sido elucidados, provavelmente existem ainda milhares com potencial aproveitamento que ainda não foram descritos (GHOSH; JHA, 2008).

A explicação da existência de metabólitos secundários ocorre de acordo com a teoria da adaptação evolutiva e sugere que devido ao fato das plantas serem organismos carentes de locomoção e sem sistema imunológico precisaram evoluir e desenvolver defesas químicas, ou aleloquímicas, para dissuadir, controlar, inibir ou matar plantas concorrentes, vírus, bactérias e, principalmente, para se defenderem contra herbívoros (WINK, 1999; WINK, 2003).

Mas, as plantas precisaram também desenvolver estratégias de cooperação ou coexistência com outros organismos, por exemplo, para a reprodução algumas plantas precisam de vetores que efetuem a polinização e espalhem sementes. Assim as plantas atraem animais e insetos mediante metabólitos secundários (aromas e corantes em flores e frutos) ou mediante a associação simbiótica entre plantas e outros seres como as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Micorriza* que favorecem absorção de nutrientes necessários para as plantas, entre outras (HOPKINS; HÜNER, 2009; WINK, 1997).

¹As moléculas essenciais para a célula vegetal são os carboidratos, proteínas e lipídeos, eles são sintetizados mediante vias metabólicas como fotossíntese, respiração, síntese de proteína, etc.(HOPKINS; HÜNER, 2009).

Frequentemente alguns metabólitos secundários apresentam um efeito duplo, por exemplo, servem para atrair e ao mesmo tempo para defender. Como no caso das antocianinas que com cores vivas (vermelho e roxo) presentes em frutos maduros atraem e ao mesmo tempo controlam bactérias e fungos que poderiam se desenvolver facilmente no néctar ou na polpa. Os metabólitos secundários existem em maiores concentrações quando a fruta ainda está em processo de amadurecimento (HOPKINS; HÜNER, 2009; WINK, 1997; WINK, 1999).

Alguns metabólitos secundários também são conhecidos como fatores antinutricionais (FAN), pois, quando ingeridos, além de desagradáveis ao gosto, interferem na digestibilidade, absorção, ou utilização de nutrientes, tais como saponinas, taninos, glicosídeos cianogênicos, isoflavonas ou alcaloides amargos (ENNEKING; WINK, 2000).

Os metabólitos secundários estão presentes nas plantas em uma mistura complexa, consistindo em vários tipos de estruturas de diferentes compostos. Essa estratégia garante uma interferência com mais de um alvo molecular nos herbívoros, insetos e microrganismos e assim uma planta pode se proteger contra uma ampla variedade de patógenos. Dessa forma, mesmo que a interação individual de um metabólito secundário seja fraca e inespecífica, o efeito conjunto das interações de vários metabólitos com diferentes alvos moleculares produz um efeito relevante (WINK, 2003). Por isso o efeito sinérgico entre diferentes fitoquímicos é o responsável por um resultado definido, e não apenas a presença de um único composto.

O aparecimento de um determinado tipo estrutural de metabólito secundário pode acontecer em diferentes integrantes do reino vegetal, e pequenas mudanças na química do composto podem ser a base para uma nova atividade farmacológica; consequentemente, nem todos os membros de um mesmo gênero, desenvolvem os mesmos metabólitos secundários (WINK, 1999; WINK, 2003).

A localização do metabólito secundário na planta vai depender do seu tipo. A superfície das plantas está coberta frequentemente por uma cutícula hidrofóbica que consiste em ceras com função de antibiótico e dissuasor (WINK, 1997). Compostos solúveis em água são usualmente armazenados no vacúolo da célula vegetal, enquanto que substâncias lipofílicas são mantidas nos canais resinosos, canais lactíferos, pelos glandulares, tricomas, membranas tilacoides, ou na cutícula (WINK, 1999). Sementes são fontes ricas de energia

(carboidratos, lipídeos, proteínas), geralmente acumulam compostos químicos para defesa, como lectinas, inibidores de protease, aminoácidos não proteicos (AANPs), alcaloides, glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos, isoflavonas, oligossacarídeos, ácido erúxico, ou ácido fítico (ENNEKING e WINK, 2000).

As propriedades que apresentam os metabólitos secundários têm-se mostrado interessantes atualmente para sua aplicação como fonte de compostos com potencial bioativo, farmacológico ou, como precursores químicos (SALIM; CHIN; KINGHORN, 2008; WINK, 2003), por exemplo, antioxidantes, anticarcinogênicos, fármacos e outros. No entanto, nem todos os efeitos que podem ter os metabólitos secundários são desejados, pois também existem metabólitos secundários que podem ter efeitos mutagênicos, isso é perturbam a replicação do DNA, ou podem ser letais se ingeridos além de uma dose determinada, como é o caso dos alcaloides pirrolizidínicos (WINK, 2003), os glicosídeos cardíacos e outros. Por isso se faz necessária uma avaliação completa dos tipos de compostos existentes e os mecanismos de ação (HOPKINS; HÜNER, 2009).

Segundo Wink (2004) os metabólitos secundários podem ser divididos em dois grandes grupos: compostos contendo nitrogênio e compostos sem nitrogênio.

2.2.1 Metabólitos secundários contendo nitrogênio

Mais de 14 mil compostos têm sido descritos nesta categoria, incluindo alcaloides, aminas e aminoácidos não proteicos, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, inibidores de protease, e lectinas (WINK, 2004).

2.2.1.1 Alcaloides

O registro histórico mostra que há mais de 2000 a.C., ao redor do mundo plantas contendo alcaloides têm sido usadas na medicina. Isso se deve ao fato que os alcaloides geram variados níveis de resposta fisiológica e psicológica em humanos, por isso a sua relevância especial na área farmacêutica. Nos últimos 200 anos vários alcaloides tornaram-se elementos essenciais para a indústria farmacêutica. Até 1985 dez das doze drogas derivadas de plantas mais importantes eram alcaloides e,

atualmente 53 alcaloides são o princípio ativo de vários medicamentos, por exemplo, atropina, cafeína, codeína, ergotamina, morfina, quinina, teobromina, teofilina, etc. (HOPKINS; HÜNER, 2009; AMIRKIA; HEINRICH, 2014).

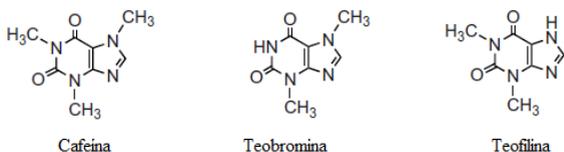
Os alcaloides são compostos frequentemente armazenados no vacúolo e existe uma grande diversidade deles. Atualmente mais de 12 mil alcaloides têm sido encontrados em aproximadamente 20 % das espécies de plantas com flores, principalmente plantas dicotiledôneas. Como grupo, os alcaloides compartilham três características principais: são solúveis em água, possuem pelo menos um átomo de nitrogênio e apresentam elevada atividade biológica ao interferir com neurotransmissores.

A presença de átomos de nitrogênio faz com que frequentemente o N₂ aceite um próton o que torna a molécula ligeiramente básica ou alcalina em solução. É por isso que esses compostos são denominados alcaloides (HOPKINS; HÜNER, 2009; WINK, 1997; WINK, 2004).

2.2.1.1.1 Metilxantinas

Pertencem a esse grupo a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina), são alcaloides derivados da estrutura orgânica heterocíclica purina (Figura 8) (ANAYA; CRUZ-ORTEGA; WALLER, 2006).

Figura 8. Estrutura das metilxantinas.



Fonte: Lean et al. (2012)

As metilxantinas têm sido encontradas em aproximadamente 100 espécies, em 13 ordens do reino vegetal, porém, o acúmulo de grandes quantidades de metilxantinas, principalmente a cafeína, está restrita a um número de espécies pertencentes ao gênero *Camellia* (2 - 3 % b.s. (em base seca)), *Coffea* (0,4 - 2,4 % b.s.), *Cola* (2 - 3 %), *Paullinia* (4 - 5 % b.s.), *Ilex* (3 - 4 % b.s.) e *Theobroma* (0,6 - 0,8 % b.s.). A teobromina é um produto intermediário na biossíntese da cafeína,

porém é a principal metilxantina presente na espécie *Theobroma cacao*, quantificando entre 2,2 - 2,7 % b.s. em comparação com 0,6 - 0,8 % de cafeína. A teofilina está presente em chá, café, mate e guaraná apenas em pequenas quantidades (ASHIHARA; YOKOTA, 2013).

Dentro do mesmo gênero, a presença de cafeína acontece apenas em algumas espécies. Por exemplo, no gênero *Ilex* várias espécies possuem cafeína, como a *I. guayusa*, *I. vomitoria*, *I. paraguariensis* ou erva mate, e outras não, como a *I. brasiliensis*, (SCHINELLA et al., 2009). O mesmo acontece no gênero *Camellia* do chá que também não acumula teofilina (LEAN et al., 2012).

A cafeína, bem como outros metabólitos secundários, não se encontra isolada e disponível, mas, associada a algum composto mediante ligação não covalente. No caso do café, a cafeína está associada ao ácido clorogênico e no caso do chá (*Camellia sinensis*), ao ácido gálico (ANAYA; CRUZ - ORTEGA; WALLER, 2006).

2.2.2 Metabólitos secundários sem nitrogênio

Neste grupo estão os terpenóides, incluindo as saponinas e glicosídeos cardíacos; policetídeos ou antraquinonas; poliacetilenos; e compostos fenólicos (WINK, 2004).

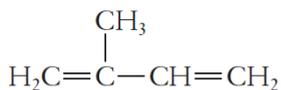
2.2.2.1 Terpenóides

A classe de terpenóides, com aproximadamente 15 mil estruturas conhecidas, é provavelmente a maior e a mais diversa classe de compostos orgânicos dentre as plantas. A característica comum dos terpenos é que eles são polímeros lipofílicos, armazenados em dutos resinosos, glândulas, células mortas ou tricomas (HOPKINS; HÜNER, 2009).

A estrutura básica dos terpenos e seus derivados é o isopreno que está constituído por 5 carbonos (Figura 9). Dependendo do número de átomos de carbono podem ser classificados em hemiterpenos (5C), monoterpênos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), esteroides (27C), tetraterpenos (40C).

Os terpenos e seus derivados de menor tamanho, hemi, mono e sesquiterpenos, podem ser isolados como óleos essenciais, pois podem ser de moderada ou grande volatilidade.

Figura 9. Estrutura básica de terpenos e derivados de terpeno.



Fonte: Hopkins e Hüner (2009).

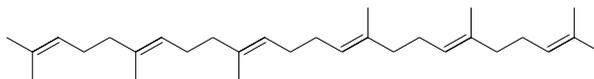
2.2.2.1.1 Esqualeno

O esqualeno é um hidrocarboneto alifático altamente insaturado, (Figura 10). É um triterpeno intermediário para a biossíntese de fitosterol ou colesterol (POPA et al., 2015; WEJNEROWSKA; HEINRICH; GACA, 2013)

A principal fonte natural de esqualeno é o fígado de tubarões de águas profundas, que possui as maiores concentrações desse composto (WEJNEROWSKA; HEINRICH; GACA, 2013), porém devido ao elevado impacto na espécie procuram-se fontes alternativas, como, por exemplo, oliva, amaranto e outras espécies vegetais (HE et al., 2002, POPA et al., 2015).

O esqualeno apresenta propriedades antioxidantes, proteção solar, anticarcinogênicas e hipocolesterolêmicas. Isso faz com que seja usado grandemente na indústria farmacêutica, cosmética e alimentos (HE et al., 2002; WEJNEROWSKA; HEINRICH; GACA, 2013). Principalmente na indústria farmacêutica como adjuvante ou carregador de princípios ativos em vacinas (POPA et al., 2015; REDDY e COUVREUR, 2009).

Figura 10. Esqualeno



Fonte: Popa et al. (2015).

2.2.2.2 Saponinas

As saponinas são moléculas heterogêneas formadas por um grupo aglicona unido mediante ligação covalente a um ou mais grupos glicosídeos. A presença do grupo glicosídeo faz com que a molécula das

saponinas apresente propriedades hidrofílicas, e o grupo aglicona, por sua vez, propriedades lipofílicas. Assim as saponinas têm o caráter anfífilo, isso é, as saponinas podem agir como substâncias que modificam a tensão superficial com propriedades detergentes e emulsificantes (HOPKINS; HÜNER, 2009; SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007).

A estrutura das saponinas é diversificada, pois apresenta um número variável de monossacarídeos ligados entre si em cadeia linear ou como cadeia ramificada (SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007). Os glicosídeos que podem formar saponinas são D-glicose, D-galactose, L-arabinose, L-ramnose, D-xilose, D-frutose, ou ácido D-glucorônico e dependendo do número de grupos glicosídeos enlaçados ao grupo aglicona, as saponinas podem ser mono-, di e tri- glicosiladas (CHAIEB, 2010).

O principal papel das saponinas é a defesa contra o ataque de fungos e bactérias, pois reagem fortemente com os esteróis na membrana celular do invasor, formando poros e assim produzindo a perda da integridade da mesma, resultando em um amplo efeito citotóxico ou antimicrobiano (HOPKINS; HÜNER, 2009; SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007; WINK, 2004).

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o número de glicosídeos unidos á aglicona ou segundo a natureza da aglicona. Em função do número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona, as saponinas podem ser monodesmosídicas se possuem uma cadeia de açúcares unida à aglicona, ou saponinas bidesmosídicas se possuem duas cadeias de açúcares unidas à aglicona. Essa diferenciação é importante, uma vez que, frequentemente, as saponinas bidesmosídicas não apresentam as atividades biológicas relatadas para as saponinas monodesmosídicas (SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007).

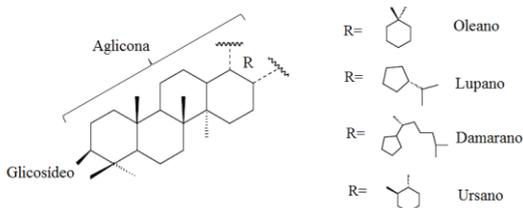
Segundo a natureza da aglicona, as saponinas são classificadas em dois grandes grupos: saponinas com aglicona esteroide e saponina com aglicona triterpênica (CHAIEB, 2010; SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007).

2.2.2.2.1 Saponinas triterpênicas

São as mais frequentemente encontradas na natureza, possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico (SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 2014), as

estruturas básicas da aglicona que podem estar presentes nas saponinas triterpênicas são damarano, oleano, ursano e lupano (Figura 11) (CHAIEB, 2010).

Figura 11. Estrutura das saponinas triterpênicas.



Fonte: Adaptado de Chaieb (2010).

Este tipo de saponinas está presente em várias espécies do gênero *Ilex*, como uma mistura muito complexa de mais de 10 glicosídeos principalmente como glicosídeos do ácido ursólico ou oleanólico. Deve se levar em conta que a estrutura para cada espécie *Ilex* será diferente (SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN; 2014).

2.2.2.2.2 Saponinas esteroides

Nesse caso, a aglicona é formada por 27 átomos de carbono dispostos em um sistema tetracíclico do tipo esteroide. Podem ser tipo neutro ou básico. As de caráter neutro são encontradas quase exclusivamente em plantas monocotiledôneas, sendo gêneros especialmente ricos nessas saponinas os *Smilax*, *Dioscorea*, *Agave* e *Yucca*. As saponinas esteroides de caráter básico possuem nitrogênio na sua estrutura e pertencem ao grupo dos alcaloides esteroidais, que são característicos do gênero *Solanum* (família Solanaceae) (CHAIEB, 2010; SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007).

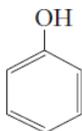
2.2.2.3 Fenilpropanoides

Também conhecidos como fenólicos, os fenilpropanoides são metabólitos secundários derivados de aminoácidos aromáticos e abrangem uma família de compostos quimicamente diversa, variando desde ácidos fenólicos simples até complexos poliméricos muito

grandes tais como taninos, lignanas e ligninas. Nessa família estão também inclusos pigmentos como os flavonoides. A estrutura básica dos fenilpropanoides é um anel aromático (fenol) que tem um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente (Figura 12). Quando vários desses grupos (fenólico – hidroxila) se encontram ligados a um ou mais anéis benzênicos formam os polifenóis (HOPKINS; HÜNER, 2009; VERMERRIS; NICHOLSON 2008).

Compostos fenólicos são característicos de plantas e como grupo eles são usualmente achados como ésteres ou glicosídeos mais do que como compostos livres. Esses compostos são solúveis em água e são armazenados no vacúolo da célula vegetal. Bem como os outros metabólitos secundários, vários fenólicos estão envolvidos nas interações planta/herbívoros e alguns, por exemplo, a lignina, são componentes estruturais importantes, enquanto que outros aparentemente são apenas subprodutos metabólicos sem função óbvia (HOPKINS; HÜNER, 2009; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008; WINK, 1997; WINK, 1999).

Figura 12. Estrutura básica do fenol com anel aromático e um grupo hidroxila.



Fonte: Hopkins e Hüner (2009).

Dentre os fitoquímicos, os fenólicos representam a maior parte da atividade antioxidante em plantas ou produtos vegetais. Na atualidade, têm sido identificados aproximadamente 8 mil compostos fenólicos em plantas, sendo que, mais de 4500 são representantes do grupo de flavonoides (HOPKINS; HÜNER, 2009; JOHN, et al., 2014).

Os fenólicos podem ser classificados de várias maneiras, entre elas, em grupos segundo o número de carbonos na molécula como ilustra a Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos fenólicos segundo o número de átomos de carbono.

Estrutura	Classe	Exemplo
C ₆	Fenólicos simples	Catecol, hidroquinona, resorcinol
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	Ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico
C ₆ -C ₂	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	Ácido p-hidroxifenilacético
C ₆ -C ₃	Ácidos cinâmicos, cinamil aldeídos, cinamil álcoois	Ácido cafeico, ácido ferúlico
	Fenilpropenos	Eugenol, miristicina
	Cumarinas, isocumarinas	Umbelliferone, esculetina
	Cromonas	Eugenina
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Juglona
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Mangostina, mangiferina
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Resveratrol
	Antraquinonas	Emodina
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides	
	Flavonas	Sinensetina, nobiletina, tangeretina, isosinensetin, flavonas polimetoxiladas
	Flavonol	Quercetina, kaempferol
	Flavonóis glicosídeos	Rutina
	Flavanonóis	Dihidroquercetina e glicosídeos dihidrokaempferol hesperitina, naringenina
	Flavanona glicosídeos	Hesperidina, neohesperidina, narirutina, naringina, eriocitrina
	Antocianinas	Glicosídeos de cianidina, malvidina incluindo derivados e formas aciladas
		Glicosídeos de pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina
	Flavanóis (catequinas)	Cianidina 3-glicosídeo e 3-rutinoside (+)-Catequina, (-) epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina
	Chalconas	Derivados fletina, notável floridzina
	Arbutina, glicosídeo fletina, Chalconaringenina	
(C ₆ -C ₃) _{2,n}	Lignanas, neolignanas e ligninas	Pinosinol
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides	Agatisflavona
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos	Flobafenos

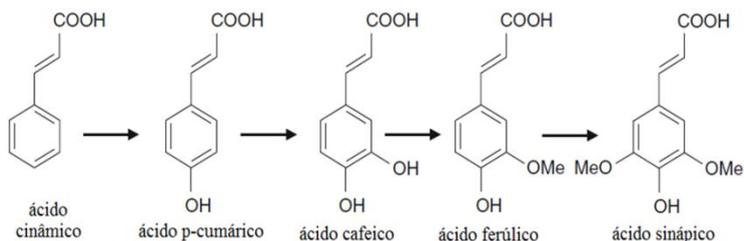
Fonte: Adaptado de Antolovich et al. (2000); Vermerris e Nicholson (2008).

2.2.2.3.1 Ácidos cinâmicos

Os fenilpropanoídeos do grupo de ácidos cinâmicos e derivados (Figura 12): ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido 5-hidroxiferúlico, e ácido sinápico, são encontrados praticamente em todas as plantas e provavelmente a maioria possui pelo menos três deles (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

O ácido cinâmico é produto da desaminação do aminoácido fenilalanina, e depois da adição sequencial de grupos hidroxila e metoxi ao ácido cinâmico, sendo obtidos então os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e ácido sinápico respectivamente (LATTANZIO, 2012; HOPKINS; HÜNER, 2009).

Figura 13. Estrutura de ácido cinâmico e derivados.



Fonte: Adaptado de Lattanzio (2012).

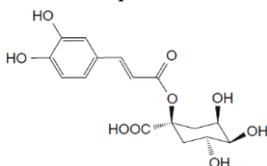
Nenhum desses fenóis simples parecem se acumular, mas sua principal função aparentemente é serem precursores de derivados mais complexos tais como cumarinas, ligninas, taninos, flavonóis e isoflavonóides (HOPKINS; HÜNER, 2009).

Bem como outros metabólitos secundários os ácidos hidroxicinâmicos não estão presentes nas plantas em estado livre, exceto devido à hidrólise química ou enzimática durante a extração do composto. Em solventes aquosos eles isomerizam de uma forma mais estável E (*trans*) para a forma Z (*cis*), especialmente sob ação da luz UV (LATTANZIO, 2012). Os derivados do ácido cafeico e ácido quínico são ilustrados na Figura 14.

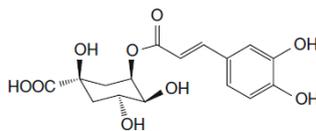
Frequentemente os ácidos cinâmicos e derivados estão presentes como ésteres ou heterosídeos conjugados mediante ligações com açúcares ou ácidos orgânicos; portanto, solúveis em água e em solventes polares. Entre os ésteres e heterosídeos de ácido cinâmico, destacam-se os derivados do ácido cafeico e ácido quínico, que dependendo do ponto de esterificação da hidroxila e do arranjo desses dois ácidos apresentam uma diversidade de compostos, com variadas e interessantes propriedades (LATTANZIO, 2012, TAVARES; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Figura 14. Derivados do ácido cafeico e ácido quínico.

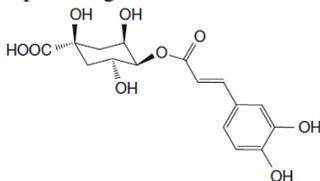
1-O-cafeoilquínico



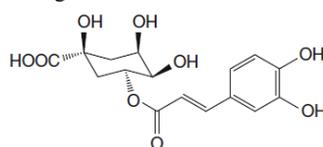
3-O- cafeoilquínico ou ácido neoclorogênico



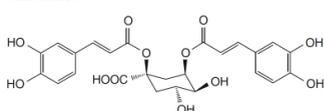
4-O- cafeoilquínico ou ácido criptoclorogênico



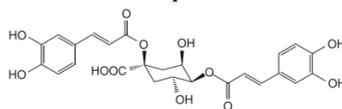
5-O- cafeoilquínico ou ácido clorogênico



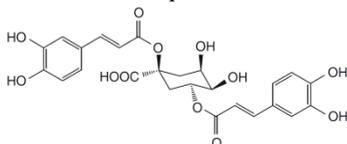
1,3-O-Di cafeoilquínico ou cinarina



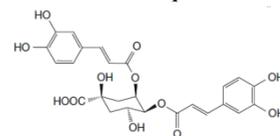
1,4-O-Di cafeoilquínico



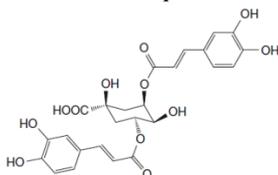
1,5-O-Di cafeoilquínico



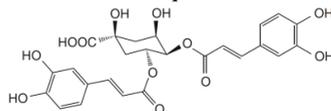
3,4-O-Di cafeoilquínico



3,5-O-Di cafeoilquínico



4,5-O-Di cafeoilquínico



Fonte: Adaptado de Lattanzio (2012); Kremr et al. (2016).

2.2.3 Atividade biológica dos metabólitos secundários

Atividade biológica dos metabólitos secundários é a capacidade que eles apresentam para agir em outros organismos vivos, em nível

molecular, podendo apresentar efeitos favoráveis ou desfavoráveis. Isso se torna possível porque eles podem interagir com alvos moleculares importantes, frequentemente receptores de células, podendo ser inibidores ou moduladores específicos (WINK, 1993).

Na Tabela 3 são descritas as principais atividades biológicas, de maneira geral, dos principais grupos de metabólitos secundários que podem estar presentes no gênero *Ilex*.

Embora tenham sido descritas frequentemente as atividades biológicas favoráveis ou desejáveis, existem aspectos negativos ou efeitos tóxicos que também podem apresentar os metabólitos secundários presentes no gênero *Ilex*. Como o caso de alguns compostos fenólicos que podem apresentar atividade estrogênica que afeta o equilíbrio dos hormônios e podem induzir ao câncer de mama nas mulheres (ANTOLOVICH et al., 2000; JOHN et al., 2014; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

Também segundo Hao et al. (2013) os alcaloides do grupo purina ao qual pertencem as metilxantinas, apresentam propriedades genotóxicas e mutagênicas que incrementam a incidência de câncer, especialmente a cafeína que apresenta um efeito citotóxico e genotóxico. As saponinas produzem irritação gástrica severa se forem consumidas e possuem elevadas propriedades hemolíticas quando aplicadas intravenosamente (HOPKINS; HÜNER, 2009; SCHENKEL; GOSMANN; LINDE, 2007; WINK, 2004), por isso, qualquer atividade biológica requer a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, de frações ou extratos da droga vegetal (SONAGLIO et al., 2007).

Tabela 3. Atividades biológicas dos principais grupos de metabólitos secundários que podem estar presentes no gênero *Ilex*.

Grupo	Atividade	Fonte
Metilxantinas	- Estimulação do sistema nervoso central, incremento da atenção, desempenho da memória.	Anaya, Cruz-Ortega, Waller (2006); Amirkia e Heinrich (2014); Ashihara, Yokota e Crozier (2013); Lean et al. (2012)
	- Incrementa o desempenho físico.	
	- Promove a recuperação muscular e pressão intramuscular.	
	- Reduz o risco de doenças cardíacas.	
	- Diurético.	
	- Estimulante cardíaco.	
	- Relaxante de músculo liso (bronco-dilatação, gastrosfágico, relaxamento do útero); para o tratamento de asma.	
	- Vasodilatador (sinergia com nitritos e analgésicos).	
	- Tratamento na apneia neonatal.	
	- Tratamento da dermatite atópica.	
Polifenóis	- Capacidade de inibir germinação ou crescimento de plantas	Antolovich et al. (2000); John et al. (2014); Murkovic (2003); Rice-Evans, Miller e Paganga (1996); Tavares, Gosmann e Schenkel (2007); Vermerris e Nicholson (2008); Wink (2004)
	- Atividade antibacteriana e antifúngica.	
	- Inseticida.	
	- Antioxidante	
	- Anticarcinogênico	
	- Antimutagênico	
	- Antiinflamatório	
	- Proteção contra radiação UV-B	
	- Agente antimicrobiano	
	- Atividade antiviral	
Saponinas	- Antialérgico	Hopkin s e Hüner (2009); Savage (2003); Schenkel, Gosmann e Linde (2007); Wink (2003); Wink (2004).
	- Inseticida	
	- Promotor da atividade antiviral contra HIV, herpes simples, vírus influenza, e rinovírus	
	- Capacidade de modificar a expressão genética	
	- Propriedades desintoxicantes.	
	- Antifúngico.	
Saponinas	- Antimicrobiano.	Hopkin s e Hüner (2009); Savage (2003); Schenkel, Gosmann e Linde (2007); Wink (2003); Wink (2004).
	- Atividades ictiotóxica (veneno para peixes).	
	- Atividades moluscicida	
	- Ação espermicida.	
	- Atividade anti-helmíntica.	
Saponinas	- Capacidade de reduzir o colesterol do plasma para reduzir o risco de doenças coronárias.	Hopkin s e Hüner (2009); Savage (2003); Schenkel, Gosmann e Linde (2007); Wink (2003); Wink (2004).
	- Capacidade de reduzir o colesterol do plasma para reduzir o risco de doenças coronárias.	

2.2.3.1 Radicais livres e antioxidantes

2.2.3.1.1 *Espécies reativas: radicais*

Como resultado do metabolismo normal das células, é gerado um grupo de espécies reativas chamadas radicais. Radicais são átomos ou moléculas com elétrons livres ou desemparelhados (MARTELLI; NUNES, 2014; MURKOVIC, 2003; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

Fontes externas também podem induzir a formação de radicais livres, como a radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, pesticidas e solventes industriais (MARTELLI; NUNES, 2014).

Existem três classes de espécies reativas, átomos, moléculas ou íons, que em sua grande maioria possuem alta reatividade: espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (MARTELLI; NUNES, 2014).

As EROs incluem os radicais: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íon hidroxila (OH^{\cdot}), radicais alcóxila lipídico e íon peroxil (HOH^{\cdot}) (MURKOVIC, 2003; SCHINELLA et al., 2009).

A presença de radicais, em quantidades apropriadas, no processo metabólico da célula é normal e até necessária, pois as EROs, em níveis baixos e moderados, agem como moléculas sinalizadoras que promovem a proliferação celular, condição necessária que permite a sobrevivência da célula (BIANCO, 2016; MARTELLI; NUNES, 2014).

Porém, no evento de um acúmulo excessivo de EROs e ERNs pode acontecer um desequilíbrio e por estes radicais serem muito reativos e quando deixados livres, produzem um fenômeno denominado “estresse oxidativo”. Este processo oxidativo ocorre no nível molecular da célula, isto é, a oxidação de lipídeos, proteínas ou DNA e, portanto, pode gerar efeitos negativos no metabolismo celular. Por sua vez, este mecanismo se manifesta no desenvolvimento de várias doenças relacionadas com o sistema imunológico, incluindo câncer, Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, deficiências cardíacas, doença falciforme, etc. (ANESI; FERRARO; FILIP, 1979; BIANCO, 2016; MARTELLI; NUNES, 2014; MURKOVIC, 2003; PARDAU, 2016; SCHINELLA et al., 2009; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

2.2.3.1.2 Atividade antioxidante

Para garantir a sobrevivência da célula, é essencial manter um equilíbrio entre as EROs produzidas durante o metabolismo e a eliminação ou desintoxicação das mesmas, a homeostase redox (BIANCO, 2016; MARTELLI; NUNES, 2014; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Compostos que possam eliminar, inibir ou regular os radicais e reparar os danos produzidos por eles são conhecidos como antioxidantes. As células possuem um sistema antioxidante biológico próprio, para manter a homeostase redox, que inclui os antioxidantes como glutatona, glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona S-transferase, junto com um sistema enzimático, superóxido dismutase e catalase, tioredoxina (ANESI; FERRARO; FILIP, 1979; BIANCO, 2016), mas nem sempre o sistema antioxidante próprio das células consegue lidar efetivamente se existe uma produção descontrolada de radicais ou deficiências no próprio sistema antioxidante biológico.

Nesse caso, fontes alimentícias externas naturais ricas em substâncias antioxidantes, por exemplo, polifenóis, flavonoides, vitamina A, vitamina C e vitamina E (BIANCO, 2016; PARDAU, 2016) permitem o controle dos radicais. O melhor antioxidante conhecido é a vitamina C e a vitamina E. A vitamina E é lipossolúvel, e composta por uma mistura de α -, β -, γ -, δ -tocoferóis. Desses compostos o α -tocoferol é o mais efetivo (VERMERRIS; NICHOLSON, 2008).

Diferentes polifenóis têm demonstrado ser potentes antioxidantes inibindo a oxidação das células ou atuando como limpadores de radicais livres (ANESI; FERRARO; FILIP, 1979), isso devido à sua estrutura molecular, que tem substitutos doadores de hidrogênio e também apresenta a habilidade de deslocar o elétron livre resultante. Assim, devido ao deslocamento do elétron, o radical resultante não tem a energia suficiente para posteriores reações (MURKOVIC, 2003; VERMERRIS; NICHOLSON, 2008). Este comportamento faz com que várias classes de fenólicos sejam consideradas como compostos úteis com importantes propriedades antioxidantes, que podem ter um papel na prevenção de alguns tipos de câncer e podem ser aplicados na obtenção de compostos com potencial farmacológico. Tais ingredientes são chamados nutracêuticos, em analogia aos fitofarmacêuticos (WINK, 2004).

O ácido clorogênico, ácido cafeico e seus ésteres, têm a capacidade de inibir EROs e ERNs (KONDO et al., 1997 apud

PARDAU, 2016). Assim várias pesquisas destacam sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-obesidade, quimioprevenção contra o câncer e redução de problemas cardiometabólicos, diabetes tipo 2 e doenças de Alzheimer (GARCIA et al., 2017). Também tem sido relatada atividade antioxidante sobre a lipoproteína LDL (lipoproteína de baixa densidade) *in vitro* e *in vivo*, assim, doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas (HAO et al., 2013; TAVARES; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Deve-se ter em conta que a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número de grupos hidroxila na molécula (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Tavares, Gosmann e Schenkel (2007) sugerem que o ácido clorogênico e o ácido cafeico apresentam propriedades anti-obesidade, incluindo a redução do peso do corpo e massa de gordura nas vísceras, leptina no plasma, insulina, triglicerídeos, e níveis de colesterol.

Um aspecto relevante do ácido clorogênico é que pode ser hidrolisado pela microbiota intestinal em ácido cafeico e ácido quínico, o que favorece sua absorção (SATO et al., 2011 apud PARDAU, 2016). O ácido clorogênico apresenta estabilidade contra auto oxidação em maiores pH, isso evita que toda atividade antioxidante seja perdida como consequência da digestão duodenal e faz com que este composto possa proteger a mucosa do intestino contra danos oxidativos (PARDAU, 2016).

Assim, o ácido clorogênico e derivados apresentam características que fazem deles compostos com propriedades farmacológicas interessantes, além disso, também tem sido apontada atividade antibacteriana e antiviral de ésteres de ácido cafeico (TAVARES; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

2.2.3.1.3 Avaliação da atividade antioxidante

Existem diversas metodologias para avaliar a atividade antioxidante (AA), baseadas em um dos mecanismos de reação: a transferência de elétrons ou a transferência de átomos de hidrogênio. Descrição detalhada do mecanismo de reação, vantagens, desvantagens e limitações dos diferentes métodos para avaliar a AA têm sido reportadas na literatura (ALAM; JAHAM; RAFIQUZZAMAN, 2013; FRANKEL; MEYER, 2000; MURAKAMI, 2013; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; PARDAU, 2016).

Dentre as metodologias para avaliar a AA baseadas na transferência de elétrons, destacam-se a de captura do radical ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e a de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). O radical ABTS se caracteriza por ser solúvel em água e solventes orgânicos podendo ser usado com vários solventes para determinar AA de extratos hidrofóbicos e/ou hidrofílicos. O radical DPPH é hidrofóbico e o meio reacional deve ser feito em solventes orgânicos e os extratos devem ser solúveis nesses solventes (BOROSKI et al., 2015; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Contudo, deve-se lembrar de que nenhuma análise sozinha pode refletir com exatidão a AA de todos os compostos, devido à existência de características de reação múltiplas, variações e interações do meio reacional (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O elevado potencial de atividade antioxidante de compostos fenólicos e a atual demanda de fontes naturais com essas propriedades promotoras de saúde mostra a importância de realizar pesquisas visando a extração, separação e purificação desses compostos.

2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

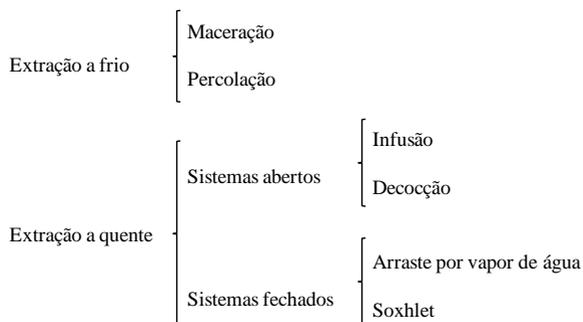
A presença de metabólitos secundários com potencial atividade biológica em uma espécie vegetal ou animal não é suficiente, pois o seu aproveitamento requer técnicas para a retirada desses compostos da estrutura celular ou matriz e disponibilizá-los. Serão descritas brevemente as técnicas de extração de compostos bioativos.

A extração de compostos com atividade biológica pode ser realizada usando várias técnicas. Essas técnicas podem ser convencionais e não convencionais (AZMIR et al., 2013).

2.3.1 Técnicas de extração convencional

São técnicas de extração que se caracterizam pela sua simplicidade e baixo custo. Estão baseadas no poder de solvatação de diferentes solventes que, com a aplicação de calor e/ou agitação permite a extração dos compostos bioativos (Figura 15).

Figura 15. Classificação das técnicas de extração convencional.



Essas técnicas requerem um longo tempo de extração, uso de certos tipos de solventes que podem trazer riscos para saúde ou para o meio ambiente, além de em alguns casos provocar reações que alteram as características dos compostos bioativos ou causam degradação térmica dependendo da técnica e solvente utilizado. Além de necessitar operações adicionais para separar o solvente dos compostos extraídos (AZMIR et al., 2013; GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Ainda assim, essas técnicas são importantes, pois se têm convertido em referência para comparação com outras técnicas não convencionais, principalmente a extração tipo Soxhlet (AZMIR et al., 2013).

Para o caso da guayusa, todas as pesquisas efetuadas têm aplicado técnicas convencionais de extração: Soxhlet, maceração, infusão e decocção usando diferentes solventes e misturas deles. Na Tabela 4 é apresentado um resumo dos trabalhos publicados para obtenção do extrato das folhas de *Ilex guayusa* L.

Tabela 4. Técnicas de extração aplicadas para obtenção de extratos de folhas de *Ilex guayusa* L.

Técnica de extração	Solvente	Temperatura [°C]	Fonte
Decocção	Água	90	Lewis et al. (1991)
	Etanol 95 %		
Mac	Metanol	20	Jara et al. (2013)
	Etanol + Água		
	Etanol		
Mac	Acetato de etila	20	Jara et al. (2013)
	Diclorometano		
Mac	Etanol 96 %	20	Contero et al. (2015)
Mac	Metanol-Água (70:30 v/v)	20	Pardau (2016)
Infusão	Água	90	
MAU	Metanol-Água (70:30 v/v)	20	Garcia et al. (2017)
MAU	Acetona 70%		Villacís-Chiriboga et al. (2018)

Mac= maceração; MAU=maceração assistida por ultrassom.

O principal solvente usado para obter extratos de FG é o etanol, e para a maioria foi empregada a técnica de maceração a temperatura ambiente.

2.3.2 Técnicas de extração não convencionais

Devido às desvantagens que apresentam as técnicas convencionais de extração, se pesquisa alternativas que permitam obter extratos de elevada qualidade, com menor risco, em menor tempo e reduzindo os resíduos produzidos (AZMIR et al., 2013).

2.3.2.1 Extração supercrítica (ESC)

Mesmo sendo apresentada como uma técnica nova, a ESC foi descoberta há vários anos. O primeiro reporte sobre o aparecimento da fase supercrítica em algumas substâncias foi realizado por Baron Carniard de la Tour em 1822. Posteriormente em 1879 Hannay e Hogarth, demonstraram pela primeira vez o poder de solvatação de fluidos supercríticos, mas a primeira aplicação da técnica é atribuída a Zosel quem apresentou a primeira patente para descafeinação de café mediante ESC com CO₂ em 1964 (AZMIR et al., 2013; Taylor, 1996), desde então o uso da técnica supercrítica tem se diversificado e

atualmente além de extração é aplicada como meio de reação, encapsulamento, inativação microbiana, impregnação, limpeza de peças eletrônicas, etc. (TAYLOR, 1996).

A extração supercrítica está baseada nas propriedades únicas, como a densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade que apresenta uma substância quando é submetida a condições de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico (BRUNNER, 1994; ROSA et al., 2008). Nessas condições as propriedades específicas de gás e/ou líquido desaparecem (AZMIR et al., 2013; TAYLOR, 1996) e se apresentam como propriedades entre gás e líquido. Assim, um fluido em condições supercríticas apresenta uma densidade similar à de um líquido, consequentemente elevado poder de solvatação. A viscosidade, difusividade, e tensão superficial similares à do gás, que permitem elevadas taxas de extração (AZMIR et al., 2013; GIL-CHÁVEZ et al., 2013; ROSA et al., 2008; TAYLOR, 1996).

As suas propriedades permitem que fluidos supercríticos possam ser usados como solvente para a extração de compostos bioativos em pouco tempo com elevados rendimentos (AZMIR et al., 2013). Além disso, a densidade pode ser alterada mediante pequenas variações na pressão e temperatura do sistema, principalmente na região próxima do ponto crítico, e esse efeito fornece seletividade durante a extração e também permite processos fáceis de separação soluto-solvente (BRUNNER, 1994; ESPINOSA-PARDO, 2017; ROSA et al., 2008).

Existem várias substâncias que podem ser usadas como fluido supercrítico, por exemplo, etileno, metano, nitrogênio, xenônio, fluorocarbonetos, monóxido de carbono, dióxido de carbono, etc., porém nem todos são seguros para saúde ou para o meio ambiente (BRUNNER, 1994; GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Atualmente a maioria de processos de extração usa CO₂ supercrítico.

2.3.2.1.1 CO₂ supercrítico

O CO₂ possui vantagens que fazem dele a melhor escolha para a técnica supercrítica. Essas vantagens são:

- Baixa temperatura crítica (31 °C) o que permite que seja usado para extrair compostos termossensíveis e reativos;

- Baixa pressão crítica (7,7 MPa) que oferece a possibilidade de operar a moderadas pressões, geralmente entre 10 e 45 MPa;
- Baixo custo com elevada pureza;
- Atóxico;
- Não inflamável;
- Não explosivo;
- Inodoro;
- Pode ser separado facilmente do extrato preservando suas propriedades biológicas;
- Eficiente para a purificação e fracionamento de compostos hidrofóbicos;
- Molécula ambientalmente amigável classificada como “*generally recognized as safe*” (GRAS) (AZMIR et al., 2013; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; ESPINOSA-PARDO, 2017; GIL-CHÁVEZ et al., 2013; PIANTINO et al., 2008; ROSA et al., 2008).

A limitação do dióxido de carbono é sua baixa polaridade o que faz dele ideal para solubilizar substâncias não polares, lipídeos e gorduras, porém inapropriado para a maioria de outros compostos (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; AZMIR et al., 2013; ROSA et al., 2008).

Mesmo assim, compostos ligeiramente polares, especificamente fenólicos derivados do ácido cinâmico têm sido extraídos com CO₂ supercrítico, quando a pressão e/ou temperatura são incrementadas. Na Tabela 5 são apresentados os derivados do ácido cinâmico obtidos através de CO₂ supercrítico.

Tabela 5. Extração de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico mediante CO₂ supercrítico.

Ácido Fenólico	P [bar]	T [°C]	Autor
Ácido cinâmico	200-400	40-60	Piantino et al. (2008)
Ácido p-cumárico	85-250	35-50	Choi, Noh e Yoo (1998)
	85-250	35-50	Jouyban, Chan e Foster (2002)
	85-500	40-50	Murga et al. (2003)
Ácido cafeico	85-500	40-60	Murga et al. (2003)
	100-350	35-65	Yongyue, Shufen e Can (2005)
Ácido ferúlico	120-280	28-60	Sovová (2001)
	85-500	40-60	Murga et al. (2003)

Fonte: Díaz-Reinoso et al. (2006); Piantino et al. (2008)

A limitação da baixa polaridade do dióxido de carbono tem sido superada com sucesso mediante o uso de modificadores ou cossolventes. Usualmente uma pequena quantidade de modificador é considerada útil

para favorecer a solubilidade e a seletividade do CO₂ com vários compostos (AZMIR et al., 2013; ROSA et al., 2008).

Os modificadores ou cossolventes² usados junto com CO₂ supercrítico são água (9,0), hexano (0), etanol (5,2), isopropanol (3,9), acetonitrila (5,8), diclorometano (3,4), acetato de etila (4,3), entre outros. O cossolvente mais aplicado na extração supercrítica é o etanol devido a sua baixa toxicidade e miscibilidade em CO₂ (GIL-CHÁVEZ et al., 2013). Porém, outros cossolventes apresentam propriedades não favoráveis com relação à segurança e ao meio ambiente, assim eliminando a característica desejável da tecnologia supercrítica de ser segura e ambientalmente correta (AZMIR et al., 2013; GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Outros limitantes do uso de cossolvente, além da possível toxicidade, é a necessidade de processos adicionais para separar o extrato do cossolvente usado, é a possibilidade de reações entre o cossolvente e o extrato (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Além da desvantagem da baixa polaridade, essa técnica apresenta restrições, principalmente econômicas devido aos elevados custos de investimento relacionados com equipamentos apropriados para as elevadas pressões do processo; porém, estudos recentes têm mostrado que a ESC pode ser economicamente viável para obter extratos vegetais principalmente em setores vinculados à indústria de alimentos, farmacêutica e química (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; VEGGI; CALVACANTI; MEIRELES, 2014).

2.3.2.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

A extração com fluido pressurizado também é conhecida como extração acelerada por solvente, extração com líquido pressurizado, extração promovida com solvente ou extração com solvente em elevada pressão (AZMIR et al., 2013; GIL-CHÁVEZ et al., 2013; OSORIO-TOBÓN, J.; MEIRELES, 2013). Quem descreveu pela primeira vez a ELP foram Richter e colaboradores, em 1996 (AZMIR et al., 2013).

O princípio da técnica de extração com líquido pressurizado é a aplicação de elevada pressão suficiente para manter o solvente em estado líquido a temperaturas além do seu ponto normal de ebulição,

² Índice de polaridade relativo expresso entre parênteses.

mas sem atingir o ponto crítico (AZMIR et al., 2013; OSORIO-TOBÓN; MEIRELES, 2013).

Devido à elevada pressão e/ou temperatura aplicada na ELP o processo de extração é favorecido, permitindo reduzir o tempo de operação e quantidade de solvente usado, pois, a maior temperatura de extração promove uma maior solubilidade dos compostos, também reduz a viscosidade e tensão superficial dos solventes, assim melhorando a taxa de extração. A elevação da pressão, por outro lado, contribui para que as células se inchem e sejam preenchidas mais facilmente pelo solvente e promove a sua entrada na matriz vegetal (AZMIR et al., 2013; GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

A ELP é considerada uma técnica alternativa à ESC para a extração de compostos polares. Dependendo do solvente usado, por exemplo, o etanol, a técnica de ELP pode ser também considerada como GRAS (GIL-CHÁVEZ et al., 2013), isso faz com que essa técnica seja amplamente usada na extração de compostos com atividade biológica (Tabela 6).

Tabela 6. Exemplo de compostos extraídos aplicando PLE usando diferentes solventes.

Grupo	Solvente	Matriz vegetal	Fonte
Vitamina E, ácidos graxos	eter, etanol	Pariparova	Péres et al., 2006
Isoflavonas	água, etanol, metanol	Soja	Luthria; Biswas e Natarajan, 2007
Cafeína, teobromina	hexano, metanol	Erva mate	Jacques et al., 2008
Catequinas	água, etanol, metanol, acetato de etila	Chá (<i>Camellia sinensis</i>), sementes de uva	Piñeiro; Palmae Barroso, 2004
Polifenóis	água, etanol	Colza	Hassas-Roudsari et al., 2009
Antocianinas	etanol, etanol-água	Amoras	Machado et al., 2014
Carotenoides	etanol	Palma	Cárdenas-Toro et al., 2015
Terpenos	água, etanol, metanol	Café verde	Belandria et al., 2016

Quando água é usada como solvente, a ELP é uma técnica intermediária entre a extração convencional e a extração com água supercrítica, pois as pressões e temperaturas usadas são menores (T_c : 374 °C, P_c : 22 MPa). Essa técnica também é conhecida como extração com água subcrítica, extração por água superaquecida ou água quente pressurizada é usada principalmente na extração de compostos com potencial biológico ou para limpeza de solos, remoção de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou metais (BRUNER, 2009; PLAZA e TURNER, 2015).

Por outra parte, a água na região crítica, é altamente reativa, e permite fragmentar compostos mediante reações de hidrólise e pirólise ou oxidar substâncias é por isso que tem sido usada como meio de reação, produção de biocombustíveis e tratamento de efluentes (BRUNER, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Folhas secas e moídas de guayusa foram adquiridas de uma empresa processadora de FG no Equador. Lote: 2-11-dic-2015, da cidade de Archidona (Altitude de 577m), província de Napo. As condições de secagem foram: 50 °C por 8 h. O material foi colocado em sacos de polietileno, selado e acondicionado para o transporte ao Brasil. Depois da chegada ao Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) o material foi mantido em freezer a -18 °C, até a realização dos experimentos e análises.

As análises de cinzas, lipídeos, fibra bruta, proteína, teor de carboidratos e cafeína foram realizados no Laboratório de Ciência de Alimentos da UFSC, e as análises de umidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram realizados no LATESC.

3.1.1 Teor de umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis foi determinado segundo metodologia 930.04 da *Association of Official Analytical Chemists* AOAC (2002).

Uma massa de aproximadamente 5 g de amostra foi colocada em cápsulas de porcelana previamente pesadas, usando uma balança analítica (Practum224-1S, Sartorius, Goettingen, Alemanha), as amostras foram colocadas em estufa (SN-30PLUS, Memmert, Büchenbach, Alemanha) durante 3 horas a 105 °C. Posteriormente foram resfriadas em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente, e foi medida novamente a massa até obtenção de massa constante.

O cálculo do teor de umidade e substâncias voláteis, em base úmida, foi realizado usando a Equação 1.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{N}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde, N é perda de massa da amostra em gramas e m_i é a massa inicial da amostra.

Este procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.2 Teor de cinzas

O resíduo por incineração ou cinzas foi determinado segundo metodologia AOAC 942.05 (2002).

Uma massa de aproximadamente 5 g de amostra foi colocada em cápsulas de porcelana com massa conhecida, por meio da utilização de uma balança analítica (AY220 TE036/1, Shimadzu, Japão). As amostras foram colocadas em mufla (Q318M24, Quimis, São Paulo, Brasil) até eliminação completa do material orgânico a 550 °C e posteriormente resfriadas em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido até obtenção de massa constante.

O cálculo de cinzas foi realizado usando a Equação 2.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde, m_f é a massa final da amostra em gramas e m_i é a massa inicial da amostra.

Este procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.3 Extrato etéreo (lipídeos)

Os lipídeos ou extrato etéreo mediante extração em Soxhlet foram determinados segundo metodologia AOAC 945.16 (2002).

Uma massa de aproximadamente 5 g de amostra foi medida numa balança analítica (AY220 TE036/1, Shimadzu, Japão) e colocada em extrator Soxhlet com éter de petróleo sob aquecimento à extração contínua por 8 h (quatro a cinco gotas por segundo). Depois o solvente foi retirado do extrato que foi mantido em estufa a 105 °C durante uma hora. As amostras foram resfriadas em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente, e foi medida a massa até obter um valor constante.

O cálculo de lipídeos foi realizado usando a Equação 3.

$$\text{Lipídios ou extrato etéreo} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde, m_f é a massa final da amostra em gramas e m_i é a massa inicial da amostra.

Este procedimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.4 Teor de fibra bruta

A fibra bruta foi determinada segundo a metodologia 044/IV do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

Uma massa de 2 g de amostra foi medida usando uma balança analítica (AY220 TE036/1, Shimadzu, Japão). As amostras foram colocadas em extrator Soxhlet com éter sob aquecimento à extração contínua por 8 h, o resíduo foi colocado em frasco erlenmeyer e adicionada solução ácida, depois a amostra é colocada em estufa a 105 °C durante 2 h (420D, Nova Ética, São Paulo, Brasil). Posteriormente as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica gel até temperatura ambiente, e foi medida novamente a massa até ter uma leitura de massa constante.

O cálculo de fibra bruta, foi obtido usando a Equação 4.

$$\% \text{ fibra bruta} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (4)$$

Onde, m_f é a massa final da amostra em gramas e m_i é a massa inicial da amostra.

Este procedimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.5 Teor de proteína bruta

O teor de proteína bruta ou nitrogênio total foi determinado segundo metodologia AOAC 2001.11 (2002).

Uma massa de 5 g de amostra foi medida em balança analítica (AY220 TE036/1, Shimadzu, São Paulo, Brasil), a amostra foi colocada num equipamento para digestão Kjeldahl durante 2 h junto com ácido sulfúrico, e depois, encaminhada para uma unidade de destilação (Te037, Tecnal, São Paulo, Brasil). Realizou-se titulação com ácido clorídrico, com fator de correção 6,25, para determinar a proteína bruta como nitrogênio total segundo a Equação 5.

$$\% \text{ nitrogênio} = \frac{1.4007 \times (V_s - V_b) \times M}{m} \times 100 \quad (5)$$

Onde, V_s, V_b mL de HCl usados para titulação e branco, M é a molaridade da solução de HCl, e m a massa de amostra.

Este procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.6 Teor de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi calculado segundo a Resolução - RDC n° 360, de 23 de dezembro da ANVISA, que indica que é calculado como a diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, fibra bruta, umidade e cinzas.

3.1.7 Teor de cafeína

A cafeína foi determinada segundo o método espectrofotométrico AOAC 979.11 (2002).

Uma massa de 1 g de amostra foi medida usando balança analítica (AY220 TE036/1, Shimadzu, São Paulo, Brasil). As amostras foram colocadas em um béquer com ácido sulfúrico, filtrado e adicionado clorofórmio ao filtrado. A fase de clorofórmio foi recuperada num balão e o clorofórmio foi evaporado. Adicionou-se água ao extrato e mediu-se a absorvância em espectrofotômetro (AJX-3002PC, Micronal, São Paulo, Brasil) em um comprimento de onda de 274 nm.

A quantidade de cafeína foi determinada segundo a curva padrão previamente estabelecida pelo laboratório.

Este procedimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.1.8 Tamanho de partícula

O diâmetro médio das partículas foi determinado mediante o procedimento sugerido por Gomide (1983), aproximadamente 70 g de amostra de FG moída e seca, foram colocadas no jogo de peneiras, as séries de Tyler usadas foram mesh 6, 18, 20, 35, 45 e fundo, sendo o conjunto de peneiras agitado durante 30 minutos em agitador de peneiras (Bertel Metalurgic Ind. Ltda., Caieiras/SP, Brasil).

Mediu-se a massa retida em cada peneira em balança analítica (AY220, SHIMADZU, São Paulo, Brasil), e depois se calculou o diâmetro médio das partículas mediante as Equações 6 e 7.

$$\overline{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta l_i}{d_i^2}}} \quad (6)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (7)$$

Onde, \overline{d}_s é o diâmetro médio das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), m_t é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número de frações.

3.1.9 Densidade real ou massa específica real

A massa específica real das FG secas e moídas foi determinada mediante a técnica de picnometria em gás hélio (Accu Pyc II 1340, Micrometrics, Geórgia, Estados Unidos). Usou-se uma massa de 2 g de amostra e os resultados foram expressos a média \pm desvio padrão.

3.2 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

As técnicas de extração utilizadas no presente trabalho foram técnicas convencionais e técnicas não convencionas em alta pressão.

Para a eliminação do solvente das amostras quando necessário, utilizou-se evaporador rotativo (802, Fisatom, São Paulo, Brasil), a temperatura de 50 °C e sob vácuo (NT613, Novatecnica, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os extratos foram resfriados até temperatura ambiente, e foi medida a massa do extrato até obter uma leitura constante.

Para todas as técnicas de extração calculou-se o rendimento segundo a Equação 8.

$$Y = \frac{m_e}{m_i} \times 100 \quad (8)$$

Onde, Y é o rendimento da extração (%), m_i é a massa de amostra inicial usada para a extração (g), e m_e é a massa do extrato obtido (g), após eliminação de solventes ou cossolventes.

Todas as extrações foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

Para armazenar os extratos obtidos, usaram-se frascos âmbar que foram mantidos em freezer a -18 °C, até realizar as análises.

3.2.1 Técnicas de extração convencionais

As técnicas convencionais foram Soxhlet e maceração, para ambas as técnicas foram empregados os solventes indicados na Tabela 7 com índice de polaridade crescente, segundo Kumoro; Hasana e Singh (2009).

Tabela 7. Solventes usados para extração convencional.

Solvente	Marca	Índice de polaridade
Hexano P.A.	Synth, Brasil	0
Acetato de etila P.A.	Synth, Brasil	4,4
Etanol P.A. 99,5%	Synth, Brasil	5,2
Mistura Etanol / Água (1:1, v/v)	-	7,1
Água	-	9

3.2.1.1 Soxhlet

Os extratos mediante a técnica Soxhlet foram obtidos segundo a AOAC (2002). Uma massa de 5 g (AY220, Shimadzu, São Paulo/SP, Brasil) de amostra foi colocada em cartucho de papel filtro, o qual foi inserido no extrator Soxhlet. Foram usados 150 mL de solvente e o sistema foi mantido em aquecimento e extração contínua durante 6 h (quatro a cinco gotas por segundo).

3.2.1.2 Maceração

Os extratos obtidos mediante a técnica de maceração foram realizados segundo a metodologia descrita por Oliveira (2015). Uma massa de 5 g de FG secas foram pesadas (AY220, Shimadzu, São

Paulo/SP, Brasil) e colocadas num béquer com 150 mL dos solventes indicados na Tabela 6. Os recipientes foram fechados com polietileno e mantidos ao abrigo da luz a temperatura ambiente, durante um período de 94 h.

Após a extração, o sistema foi filtrado com vácuo em funil de Buchner através de papel filtro e o filtrado foi recolhido em Kitasato.

3.2.2 Técnicas de extração a alta pressão

As técnicas a alta pressão foram extração supercrítica (ESC) com CO₂ supercrítico, ESC com CO₂ supercrítico/cossolvente, e extração com líquido pressurizado (ELP).

Para ambas as técnicas de extração: ESC com CO₂ supercrítico/cossolvente, e ELP foram empregados os cossolventes/solventes: etanol, etanol/água (1:1 v/v) e água, indicados na Tabela 8 com índice de polaridade crescente, segundo Kumoro; Hasana; Singh (2009).

Tabela 8. Cossolventes e solventes usados para extração em alta pressão.

Solvente	Marca	Índice de polaridade
Etanol P.A. 99.5%	Synth, Brasil	5,2
Etanol/Água (1:1 v/v)	-	7,1
Água	-	9

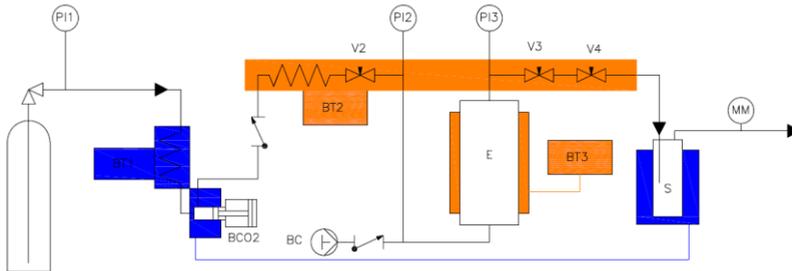
3.2.2.1 Extração com CO₂ supercrítico

As extrações com CO₂ supercrítico foram realizados na unidade ESC do LATESC da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Essa unidade foi desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha. Maiores detalhes acerca da unidade de extração bem como sua operação estão descritos no trabalho apresentado por Zetzel, Brunner e Meireles (2003) e nas várias pesquisas realizadas pelo LATESC com esse equipamento (ANDRADE, 2015; De OLIVEIRA, 2015; LASTA, 2017; MAZZUTTI, 2016; COELHO, 2015).

Na Figura 16 é apresentado um diagrama de tubulação e instrumentação (P&ID) da unidade ESC existente no LATESC.

Figura 16. Unidade de extração supercrítica existente no LATESC.



Legenda: BCO2: multiplicador de pressão para CO₂; BC: bomba cossolvente; BT1: Banho termostático baixa temperatura (inferior a 0 °C); BT2: Banho termostático válvulas expansão (60 °C); BT3: Banho termostático temperatura extração; E: extrator (diâmetro interno: 20 mm; L: 300 mm; V_{max}: 100 mL, P_{max}: 600 bar); MM: medidor vazão mássica CO₂; PI1: indicador pressão saída do cilindro; PI2: indicador pressão entrada do extrator; PI3: indicador pressão saída do extrator; S: separador/coletor de extrato; V3, V4: Válvulas expansão.

Fonte: Adaptado de Zetzi, Brunner e Meireles (2003).

Para todos os experimentos usou-se CO₂ (pureza 99,9 %) fornecido pela White Martins do Brasil.

O leito de extração foi conformado da seguinte maneira: camada de algodão (espessura \approx 10 mm), esferas de vidro com diâmetro médio 3 mm ($V \approx$ 30 mL), camada de algodão (espessura \approx 10 mm), amostra (15 g), camada de algodão (espessura \approx 10 mm).

3.2.2.1.1 Curva de extração

Testes iniciais da ESC, visando definir o tempo de extração, foram realizados mediante a metodologia usada no LATESC (ANDRADE, 2015; De OLIVEIRA, 2015; LASTA, 2017; MAZZUTTI, 2016; COELHO, 2015) que consiste na medição da massa do extrato obtido durante uma extração supercrítica dinâmica em intervalos de tempo definidos.

Para a curva de extração foram utilizadas 15 g de FG no leito do extrator, e as condições supercríticas de pressão e temperatura foram fixadas em 200 bar e 45 °C respectivamente, com uma vazão mássica de CO₂ de 0,5 kg h⁻¹ durante 7 h.

3.2.2.1.2 Isotermas de rendimento

Para a determinação das isotermas de rendimento global usou-se a metodologia descrita por Michelin et al. (2005) apud De Oliveira (2015). Uma massa de amostra de 15 g foi colocada no leito do extrator, e usando um planejamento experimental tipo fatorial completo 3^2 as seguintes condições de operação foram avaliadas: pressões de 150, 200 e 250 bar, temperaturas de 45, 60 e 75 °C (Tabela 9); a vazão mássica de CO_2 se manteve fixa em $0,5 \text{ kg h}^{-1}$.

Tabela 9. Combinação dos fatores pressão e temperatura, para o planejamento experimental fatorial completo 3^2 aplicado para a obtenção de isotermas de extração.

T	P
-1 (45 °C)	-1 (150 bar)
0 (60 °C)	-1 (150 bar)
+1 (75 °C)	-1 (150 bar)
-1 (45 °C)	0 (200 bar)
0 (60 °C)	0 (200 bar)
+1 (75 °C)	0 (200 bar)
-1 (45 °C)	+1 (250 bar)
0 (60 °C)	+1 (250 bar)
+1 (75 °C)	+1 (250 bar)

A massa do extrato obtida após esse tempo de extração foi medida em balança analítica e calculou-se o rendimento global mediante a Equação (8) para cada uma das condições de pressão e temperatura.

3.2.2.1.3 Extração com CO_2 supercrítico e cossolvente

Os experimentos foram realizados seguindo um planejamento fatorial 2^3 , os limites superiores e inferiores para temperatura e pressão foram, 75 °C, 45 °C e 250 bar e 150 bar respectivamente (Tabela 10). O ponto central foi nas condições de 60 °C e 200 bar e efetuado em triplicata (Tabela 10).

A vazão durante a ESC foi mantida em $0,5 \text{ kg CO}_2 \text{ h}^{-1}$, e o cossolvente foi adicionado mediante uma bomba para cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (515 HPLC, Waters, Inglaterra) em fração mássica de 7 % em relação à massa total de CO_2 empregada na extração ($m_{\text{cossolvente}} m_{\text{CO}_2}^{-1}$).

Tabela 10. Combinação dos fatores pressão, temperatura e cossolvente para o planejamento experimental fatorial 2^3 aplicado para a ESC.

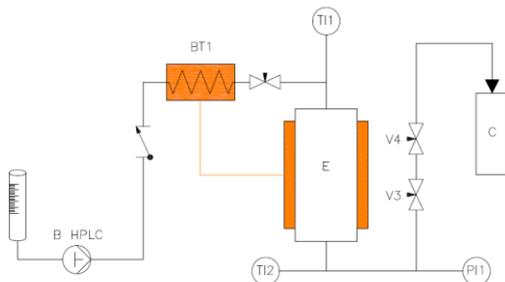
T	P	Cossolv
-1 (45°C)	-1 (150 bar)	-1 (Etanol)
+1 (75°C)	-1 (150 bar)	-1 (Etanol)
-1 (45°C)	+1 (250 bar)	-1 (Etanol)
+1 (75°C)	+1 (250 bar)	-1 (Etanol)
-1 (45°C)	-1 (150 bar)	+1 (Água)
+1 (75°C)	-1 (150 bar)	+1 (Água)
-1 (45°C)	+1 (250 bar)	+1 (Água)
+1 (75°C)	+1 (250 bar)	+1 (Água)
0 (60°C)	0 (200 bar)	0 (Mistura Etanol/Água)

Calculou-se o rendimento global mediante a Equação (8) para cada uma das condições de pressão, temperatura e cossolvente.

3.2.2.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

As extrações com líquido pressurizado foram realizadas na unidade construída para esse fim pelo LATESC na UFSC. A unidade é descrita em detalhe por Lasta (2017), e é ilustrada na Figura 17.

Figura 17. Unidade de extração com fluido pressurizado existente no LATESC.



Legenda: B HPLC: bomba para cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (515 HPLC, Waters, Inglaterra); BT1: Banho termostático temperatura extração; C: coletor de extrato; E: extrator; PI1: indicador pressão do extrator; TI1: indicador temperatura entrada do extrator; TI2: indicador temperatura saída do extrator; V3, V4: Válvulas de bloqueio e reguladora de pressão respectivamente.

Fonte: Adaptado de Lasta (2017).

O leito de extração foi conformado da seguinte maneira: camada de algodão (espessura ≈ 10 mm), esferas de vidro com diâmetro médio 3 mm ($V \approx 10$ mL), camada de algodão (espessura ≈ 10 mm), amostra (5 g), camada de algodão (espessura ≈ 10 mm).

Ensaio preliminares mostraram que a pressão não influenciou no rendimento global da extração, assim fixou-se a pressão de extração em 100 bar e as temperaturas de extração foram: 45, 60 e 73 °C. A vazão de solvente usada foi de 3 mL min^{-1} , o tempo de extração total foi de 30 min.

3.3 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS

Todos os extratos obtidos aplicando as diferentes técnicas de extração foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, e a atividade antioxidante mediante as metodologias de captura de radical ABTS e radical DPPH.

3.3.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

A metodologia aplicada no presente trabalho para a quantificação de compostos fenólicos totais foi a proposta por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), adaptada por Kosar, Dorman e Hiltunen (2005) usando o reagente Folin-Ciocalteu.

A metodologia está baseada na transferência de elétrons a partir dos grupos hidroxila dos compostos fenólicos num meio básico para os ácidos fosfomolibdênio/fosfotúngstico contidos no reagente Folin-Ciocalteu, essa transferência produz a formação de um produto de cor azul que pode ser quantificado mediante espectrofotômetro (GARCIA, et al., 2017; PARDAU, 2016).

Brevemente, os extratos foram diluídos até uma concentração de 10 mg mL^{-1} . Preparou-se meio reacional em tubos eppendorf (capacidade 1,5 mL) com água destilada (0,6 mL), o extrato diluído (10 μL), solvente usado na extração (10 μL) e o reagente Folin-Ciocalteu (50 μL). Agitou-se e deixou-se em repouso durante 1 minuto, e foi adicionada solução de carbonato de sódio 20 % m/v (150 μL) e finalmente foram adicionados 190 μL de água e agitou-se novamente.

O meio reacional foi deixado em repouso durante 2 h, ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Finalmente a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (800 XI, Femto, São Paulo, Brasil), no comprimento de onda de 760 nm.

Os valores de absorvância média encontrados para cada amostra foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico (Apêndice I, Figura A-I 1), previamente determinada, na qual são relacionadas a absorvância com a concentração de ácido gálico, obtendo-se os respectivos valores em equivalente de ácido gálico (EAG) para cada mL de diluição.

Os resultados finais de compostos fenólicos totais (CFT) foram expressos em mg EAG g⁻¹ extrato através da Equação 4.

$$CFT \left(\frac{mg \text{ EAG}}{g \text{ extrato}} \right) = \frac{EAG \left(\frac{mg \text{ EAG}}{L \text{ solução}} \right)}{D_{ext} \left(\frac{g \text{ extrato}}{L \text{ solução}} \right)} \quad (9)$$

Onde,

EAG = equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg EAG L⁻¹ solução);

D_{ext} = diluição dos extratos (10 g extrato L⁻¹ solução).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.3.2 Atividade antioxidante

Para o presente estudo escolheu-se as metodologias ABTS e DPPH por implicar em baixo custo e ampla utilização principalmente em pesquisas (ALAM; JAHAM; RAFIQUZZAMAN, 2013; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

3.3.2.1 Método de captura do radical ABTS

Para determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), utilizou-se a metodologia descrita por Re et al. (1999), adaptada por Nenadis et al. (2004).

Brevemente, preparou-se uma solução de radical ABTS⁺ mediante a reação de uma solução de 140 mM de persulfato de potássio (88 µL) com uma solução de ABTS 7 mM (88 µL). Essa solução é armazenada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 16 h. Após este período, o radical é diluído em etanol até atingir uma absorvância de 0,7 nm ± 0,05 medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm.

A solução estoque de extrato é diluída até uma concentração de 1 mg mL⁻¹, usando os mesmos solventes aplicados na extração (etanol, etanol/água (1:1 v/v), água).

Com a solução estoque foram preparadas diluições (1, 0,5, 0,25 e 0,1 mg mL⁻¹), usando água destilada e uma alíquota de 30 µL de cada diluição é transferida para tubos de ensaio (em triplicata) contendo 3 mL do radical ABTS⁺ e é feita a homogeneização dos tubos em agitador tipo vortex. Depois de 6 minutos de repouso em escuro, a absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm.

A atividade antioxidante da amostra, pode ser obtida substituindo, na equação da reta gerada a partir dos valores das absorbâncias, o valor da absorbância equivalente à concentração de 1000 µmol L⁻¹ do padrão Trolox (Apêndice I, Figura A-I 2). Esse último valor é obtido a partir curva padrão que relaciona a absorbância e concentração de Trolox.

3.3.2.1. Método de captura do radical DPPH

Utilizou-se a metodologia proposta por Mensor et al. (2001) para avaliar a capacidade de inibição do radical Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

Foram preparadas diluições do extrato até obter concentrações de 500, 250, 125, 50, 25, 10 µg mL⁻¹, usando o mesmo solvente da extração (etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v), água). Foi preparada também uma solução de estoque de DPPH 0,3 mM usando etanol P.A. e mantida em frasco âmbar.

O meio reacional foi preparado misturando 1 mL do radical DPPH e as diferentes diluições do extrato mantendo sempre um volume total de 3,5 mL. Como controle negativo usou-se apenas a mistura de solvente com o radical DPPH e para branco uma mistura de solvente com diluição do extrato.

Os tubos contendo o meio reacional foram homogeneizados em agitador tipo vortex, incubados à temperatura ambiente protegidos da luz durante 30 min. Depois as absorbâncias foram lidas usando espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante percentual foi calculada mediante a Equação 10 para cada concentração (em triplicata) e os resultados finais foram expressos em função do EC₅₀, valor corresponde à concentração mínima necessária de extrato para decrescer em 50 % a concentração inicial do radical DPPH.

$$AA (\%) = 100 - \left(\frac{[Abs_{amostra} - Abs_{branco}]}{Abs_{controle}} * 100 \right) \quad (10)$$

Onde, AA(%): atividade antioxidante percentual; Abs_{amostra}: absorvância da amostra; Abs_{branco}: absorvância do branco; Abs_{controle}: absorvância do controle.

Com cada replicação se gerou uma equação de uma reta. Ao substituir o valor de Y por 50 (relativo a 50 % de atividade antioxidante), obteve-se o valor do EC₅₀ parcial (Equação 11).

$$Y = AX + B \therefore X = \frac{Y-B}{A} \therefore X = \frac{50-B}{A} \quad (11)$$

Onde, Y = atividade antioxidante percentual; X = concentração de extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$); A = coeficiente angular da reta; B = coeficiente linear da reta.

Calculando a média dos EC₅₀ parciais obteve-se o EC₅₀ total.

3.3.3 Análise estatística

Os resultados de rendimento global de extração, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente por análise unidirecional de variância (ANOVA), para a verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas usou-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) e para avaliar a correlação entre variáveis verificou-se o coeficiente de correlação de Pearson, mediante o uso do software STATISTICA 10.

3.3.4 Perfil químico dos extratos

3.3.4.1 Análise mediante cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS)

As análises mediante GC-MS foram efetuadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

Os extratos analisados foram obtidos mediante técnicas Soxhlet e maceração usando solventes hexano, acetato de etila e etanol, bem como os extratos obtidos mediante técnicas ESC e ESC/etanol. O

equipamento utilizado foi um GC-MS Agilent GC 7890A acoplado a um detector MS Agilent 5975C. Usando uma coluna capilar HP-5MS (Agilent) de sílica fundida (30 m de comprimento, 250 μm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura do filme, composta de 5 % de fenilmetilpolisiloxano) conectada a um detector quadrupolo operando em modo EI a 70 eV. Hélio foi adotado como gás carreador a uma vazão de 0,8 mL min^{-1} . A configuração de temperaturas foi: injetor 280 °C e interface 240 °C, com uma razão de split de 10:1. O volume de amostra injetado foi de 1 μL com um auto injetor de amostras Agilent GC Sampler 80. A configuração do programa de temperaturas do forno iniciou em 80 °C durante 1 min, depois aumentou a uma taxa de 10 °C min^{-1} até atingir 190 °C, posteriormente reduziu-se a taxa de aquecimento para 5 °C min^{-1} até atingir 300 °C e manteve-se nessa temperatura durante 15 min. A identificação dos diferentes compostos presentes nos extratos foi baseada na comparação dos seus espectros de massa com os existentes da *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2011).

3.3.4.2 Análise mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, baseados na metodologia descrita por Agostini et al. (2017).

Os extratos obtidos foram solubilizados em metanol (pureza CLAE) ou água deionizada Milli-Q, segundo o solvente usado na extração, centrifugados, filtrados com membrana hidrofílica PVDF 0,22 μm e membrana PTFE 0,20 μm e posteriormente diluídos 1:4 e 1:16 com água ou metanol dependendo de cada amostra.

Foi usado um equipamento CLAE (20-AD, Shimadzu, Japão) equipado com injetor automático e detector de arranjo de diodos SPD-M-20^a, acoplado a um espectrômetro de massas (Esquire 6000, Bruker, Stuttgart, Alemanha), com fonte de ionização por electrospray (MS-ESI) e coluna 5 μm 4.6 mm x 250 mm (Inertsil ODS-3, GL Sciences, Japão).

A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A - água acidificada com 0,3 % de ácido fórmico, solvente B - metanol acidificado com 0,3 % de ácido fórmico.

O sistema de bombeamento da fase móvel foi do tipo gradiente, com 0 % do solvente B de 0 a 16 min, 30 % de B em 16 a 21 min, 35 %

de B em 21 a 25 min, 40 % de B em 25 a 41 min, 60 % de B em 41 e mantendo por 2 min, retornando à condição inicial em 2 min e mantendo pelo restante do tempo. A vazão padrão foi mantida a 1 mL min^{-1} e $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Usaram-se padrões em diferentes comprimentos de onda para a identificação e quantificação da cafeína e da teobromina (200 - 600 nm), ácido clorogênico e derivados (325 nm) e rutina (353 nm).

Os compostos foram identificados de acordo com o tempo de retenção, comprimento de onda máximo e a quantificação foi realizada utilizando o método de padronização externa, através da correlação entre as áreas do pico dos distintos cromatogramas com a do pico da curva padrão para cada composto.

3.3.5 Atividade antibacteriana e antifúngica

As análises de atividade antimicrobiana e antifúngica foram realizadas nos laboratórios do Curso de Farmácia - Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Vale Itajaí (UNIVALI).

3.3.5.1 Microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos avaliados foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, U.S.A), Centro de Referência Micológica (C) (CEREMIC- *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*, Rosario, Argentina) e *Control Lab* (CL 35) (Control Lab, Rio de Janeiro, Brazil).

Para determinar a atividade antibacteriana foram usadas três bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Bacillus subtilis* (ATCC 14579) e duas Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A atividade antifúngica foi avaliada usando fungos dermatófitos: *Epidermophyton floccosum* (C 114), *Microsporium canis* (C 112), *Microsporium gypseum* (C 115), *Rhizopus sp* (CL 35), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9972), *Trichophyton rubrum* (C 137), fungos filamentosos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934), *Rhizopus sp* (CL 35) e fungo leveduriforme: *Candida albicans* (ATCC 10231).

As bactérias foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton e os fungos em meio ágar Sabouraud dextrose 4%, o inóculo foi preparado mediante cultivo e remoção de bactérias/fungos esporulados do meio ágar e preparou-se uma suspensão com 10 mL água estéril, a suspensão foi ajustada até obter uma concentração final de 1×10^6 - 5×10^6 células mL^{-1} .

3.3.5.2 Concentração inibitória mínima CIM

A CIM dos extratos foi determinada mediante o método de diluição em ágar segundo o CLSI (2009) com algumas modificações (GASPARETTO et al, 2017). Diluições dos extratos foram preparadas em tubos desde $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ até $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Depois foi inoculado, mediante alça calibrada de μL , em cada tubo o equivalente de $1,5 \times 10^6$ células mL^{-1} para as bactérias CLSI (2009) e $1-5 \times 10^5$ células mL^{-1} para os fungos CLSI (Espinel-Ingroff e Pfaller, 1995). Os tubos foram incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 h para bactérias e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 - 15 dias para fungos. Após o período de incubação, mediante a verificação visual do crescimento microbiano, foram realizadas as leituras do CIM. Para a interpretação dos resultados foi considerada CIM a menor concentração que apresentou a inibição total do crescimento microbiano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho. Para realizar a comparação dos resultados obtidos, foram usadas outras espécies do gênero *Ilex* e/ou outras matérias primas, pois, informações sobre FG são escassas ou inexistentes. Contudo, deve se lembrar de que esse tipo de comparação tem limitações e pode ser até subjetiva devido à variabilidade dos resultados dependendo de fatores como: técnicas de extração/concentração, técnicas de análise, processamento da matéria-prima, época de colheita, idade de planta, etc.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

As FG secas e moídas utilizadas no presente trabalho foram caracterizadas em termos de umidade, cinzas, lipídeos, fibra bruta, proteína bruta, carboidratos totais, cafeína, diâmetro médio de partícula e densidade real (Tabela 11).

Tabela 11– Caracterização das FG, secas e moídas.

Propriedade	média ± desv. pad.
Umidade	5,51 ± 0,05
Cinzas *	6,8 ± 0,2
Lipídeos *	11,8 ± 0,1
Fibra *	17,11 ± 0,4
Proteína *	17,57 ± 0,07
Carboidratos totais *	46,8 ± 0,2
Cafeína *	2,27 ± 0,05
Diâmetro médio de partículas [mm]	0,652
Densidade real [g.cm ⁻³]	1,382 ± 0,002

* Medido em % em massa (base seca).

A umidade das amostras de FG usadas no presente estudo apresentaram valores inferiores entre 7 - 12 % quando comparadas com Pardau (2016), que reportou umidade entre 5,9 - 6,25 %.

Quando comparada com dados de umidade reportadas para folhas de *I. paraguariensis*, a umidade obtida está acima do reportado por Esmelindro et al. (2002) com valores de umidade entre 2 - 3 % e dentro da faixa de umidade reportada por Braghini (2014) com valores entre 3 - 6 %.

Quando comparada a umidade de outras matérias primas usadas para extração no LATESC, os resultados obtidos no presente estudo estão dentro da faixa de umidade reportada (ANDRADE, 2015; De OLIVEIRA, 2015; LASTA, 2017; MAZZUTTI, 2016; COELHO, 2015). A umidade presente na amostra deve ser levada em conta, pois pode influenciar o processo de extração, favorecendo ou dificultando-a, dependendo das interações da umidade (água) com o soluto, solvente e a matriz (MEIRELES, 2009). A presença de umidade pode afetar também a estabilidade das amostras frente a microrganismos/fungos ou enzimas.

Os resultados de teor de cinzas obtidos para FG obtidos nesse trabalho ($6,8 \pm 0,2$) foram 11 % inferiores aos reportados pela *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017) e similares aos reportados para *I. paraguariensis* por Esmelindro et al. (2002), Esmelindro et al. (2004), Esmelindro et al. (2005) e Braghini (2014) com valores entre 5,1 % e 6,6 %.

O teor de lipídeos para FG está 48 % acima dos valores reportados para FG (7,96 %) pela *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017), e acima do reportado para a *I. paraguariensis* (3 - 9 %) (BRAGHINI, 2014; ESMELINDRO et al., 2002; ESMELINDRO et al., 2005; NABECHIMA, 2010).

O teor de fibra bruta para FG é duas vezes inferior aos valores reportados para FG (36,98 %) pela *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017), porém está dentro da faixa reportado para a *I. paraguariensis* com valores entre 8 e 19 % (BRAGHINI, 2014; ESMELINDRO et al., 2002; NABECHIMA, 2010).

O teor de proteína obtido foi 1,2 vezes maior ao reportado pela *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017) e maior também quando comparado com os valores reportados para *I. paraguariensis*, (BRAGHINI, 2014; ESMELINDRO et al., 2002; NABECHIMA, 2010), porém 30 % inferior aos reportados para *I. latifolia* T. (FAN et al., 2014). A quantificação elevada do teor de proteínas pode ser devida à presença da cafeína, pois a cafeína é um composto constituído por nitrogênio que pode incrementar o resultado da análise de proteína bruta quantificada como nitrogênio total.

O teor de carboidratos totais foi 1,4 vezes menor com relação ao valor reportado para FG (64,1 %) pela *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017), porém superior (9 vezes) quando comparado com a *I. paraguariensis*, (BRAGHINI, 2014; ESMELINDRO et al., 2002; NABECHIMA, 2010). Valores elevados de proteína e carboidratos

podem afetar o processo de extração de compostos bioativos, pois se forem solubilizados podem dificultar processos de isolamento/separação e também reagir com os compostos extraídos, diminuindo seu potencial biológico (MEIRELES, 2009).

Os valores obtidos de concentração de cafeína no presente estudo, quando comparados aos valores reportados para teores de cafeína em FG, são maiores, por exemplo, Holmstdt e Lindgren (1972) apud Lewis et al. (1991) reportaram 1,8 %, Lewis et al. (1987) apud Lewis et al. (1991) reportaram 1,7 % e a *Universidad Regional Amazónica IKIAM* (2017) reportou 1,9 %, a variação pode ser devido a época do ano da colheita, região de colheita ou variações dentro da própria espécie.

O teor de cafeína quando comparado com os reportados para erva mate (*I. paraguariensis*), também são 1,4 a 4 vezes superiores aos valores reportados por Esmelindro et al. (2002), Hao et al. (2012) e Schinella et al. (2009), mas 12 % inferiores quando comparados ao melhor resultado reportado por Braghini (2014). Quando comparado o teor de cafeína das FG com os teores de cafeína para café, os valores das FG são superiores aos reportados para café Arábica, com valores entre 0,8 % – 1,4 % e dentro da faixa dos valores reportados para café Robusta 1,7 – 4,0 b.s. (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

O diâmetro médio das partículas foi de 0,558 mm, dentro da faixa de dados reportados para outras matérias-primas pesquisadas no LATEC que variam entre 0,21-0,57 mm (ANDRADE, 2015; De OLIVEIRA, 2015; LASTA, 2017; MAZZUTTI, 2016; COELHO, 2015). O tamanho de partícula é um fator relevante no processo de extração, pois deve ser adequado para disponibilizar o soluto bem como favorecer a transferência de massa, sem provocar entupimento de equipamento, aparecimento de caminhos preferenciais ou problemas de separação do solvente.

4.2 RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO

O rendimento das diferentes técnicas de extração foi calculado e é apresentado a seguir.

4.2.1 Técnicas convencionais

O rendimento da extração das diferentes técnicas convencionais foi dependente da temperatura de extração e da polaridade do solvente (Tabela 12).

Tabela 12. Rendimento global da extração de FG obtida mediante técnicas convencionais.

Técnica extração	Solvente	Rendimento* Y (%)	Temperatura de extração** [°C]
Soxhlet	Hexano	5±0,3 ^e	54±3
	Acetato etila	16,1±0,6 ^{cd}	59±4
	Etanol	20±4 ^{bc}	61±2
	Mistura etanol/água (1:1 v/v)	34±2 ^a	73±1
	Água	39,4±0,2 ^a	79±1
Maceração	Hexano	5,38±0,01 ^e	18±3
	Acetato etila	9±1 ^{de}	
	Etanol	11±1 ^{de}	
	Mistura etanol/água (1:1, v/v)	20,8±0,4 ^{bc}	
	Água	26±3 ^b	

* Letras iguais significam que estatisticamente não existe diferença entre as médias para um nível de confiança 95 % ($p < 0,05$).

** Temperatura medida no solvente em contato com a amostra. Para o caso da técnica Mac é a temperatura ambiente média durante o período de extração.

Quando a técnica de extração é mantida a temperatura constante (maceração), observa-se que solventes polares (água, mistura etanol/água (1:1 v/v), etanol) apresentaram os maiores rendimentos, pois eles têm maior afinidade com os compostos extraíveis presentes nas FG.

Quando comparado o rendimento obtido com o solvente água (índice de polaridade 9) frente ao solvente hexano (índice de polaridade 0), o rendimento é 5 vezes maior para a água. E o rendimento aumentou com a polaridade do solvente, sugerindo o caráter polar dos compostos presentes nas FG. Porém, esse elevado rendimento pode estar relacionado ao elevado teor de carboidratos e proteínas (Tabela 10) que podem ter sido solubilizadas e extraídas em solventes polares produzindo esse elevado rendimento.

A temperatura em associação com a polaridade do solvente permitem obter rendimentos de extração até 8 vezes maior quando comparados os solventes dentro da mesma técnica (Soxhlet) e 1,5 vezes maiores quando comparadas as técnicas Soxhlet e maceração.

O maior rendimento foi obtido com água, tanto na técnica Soxhlet como maceração, 39,4 e 26 %, respectivamente, sendo para ambos os casos 2 vezes maior do que o obtido para o etanol. Estes

resultados sugerem que o solvente mais apropriado visando rendimento é a água, porém, a água como solvente implica maior demanda energética e tempo para sua remoção do extrato. Esse limitante pode ser reduzido quando se usa como solvente a mistura etanol/água (1:1 v/v) que apresenta um rendimento sem diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com a água para ambos os processos Soxhlet e maceração de 32,4 e 19,6 respectivamente, com a vantagem de que é mais fácil sua remoção do extrato, pois apresenta menor ponto de ebulição.

Quando comparados os rendimentos obtidos para extração de FG com técnicas convencionais, os resultados são maiores do que os reportados para *I. paraguariensis*, usando decocção de folhas durante 20 minutos, obteve-se rendimento de 13 % (ANESI; FERRARO; FILIP, 2005) e similares aos reportados por Isolabella et al. (2010), com rendimento de 32,7 % para decocção de folhas de *I. paraguariensis* durante 10 minutos e posterior liofilização.

O incremento das taxas de rendimento global da extração com o aumento da temperatura e a polaridade também foi observado por Batistella (2017) que usou folhas de beterraba e obteve os melhores rendimentos usando água como solvente na técnica Soxhlet (59,8 %) e na técnica de maceração (6,7 %); também Mazzutti (2016) obteve o rendimento máximo de 18,9 % na técnica Soxhlet usando solvente metanol na extração de folhas de *Plantago* e De Oliveira (2015) melhorou o rendimento da extração de sementes de maracujá (9 %) quando usou solvente etanol-água aplicando a técnica maceração.

4.2.2 Técnicas a alta pressão

4.2.2.1 ESC com CO₂

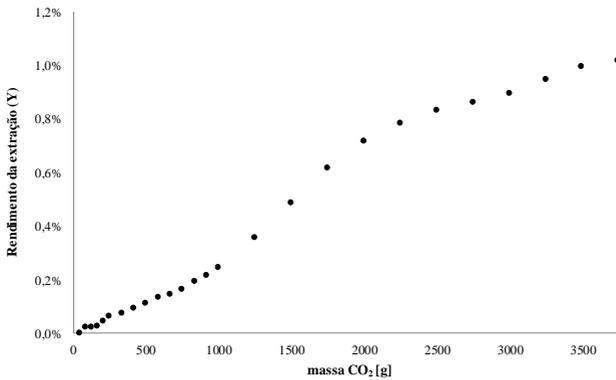
Para avaliar o comportamento da ESC de FG realizou-se a curva de extração (Figura 18). As condições do experimento foram: Pressão: 200 bar, temperatura: 45 °C, vazão mássica de CO₂: 0,5 kg h⁻¹, tempo: 7 h 30 minutos.

A curva de extração mostra que os compostos presentes nas FG são pouco solúveis em CO₂ supercrítico, pois após aproximadamente 7 horas e 30 minutos de extração foi obtido apenas um rendimento máximo de 1,8 %. As diferentes etapas da ESC não foram facilmente identificáveis para essas condições.

Esse comportamento também foi observado por Esmelindro et al. (2004) que obtiveram rendimentos entre 0,2 - 1 % quando realizaram curvas de extração com CO₂ a 30 °C e 175 bar, para folhas de *I.*

paraguariensis de árvores de diferente idade e com diferente incidência de luz. Também Esmelindro et al. (2005) reportaram curvas de extração com comportamento similar quanto aplicaram CO_2 para extração de folhas de *I. paraguariensis*, usando temperaturas de 15 - 55 °C e pressões de 100 - 200 bar. O melhor rendimento (2 %) foi obtido para 35 °C, 200 bar e 0,2 kg $\text{CO}_2 \text{ h}^{-1}$.

Figura 18. Curva de extração de FG mediante ESC com CO_2 , P: 200 bar, T: 45 °C, e vazão mássica CO_2 de 0,5 kg h^{-1} .



Jacques et al. (2007) também reportaram curvas de extração com baixo rendimento para folhas de *I. paraguariensis* usando CO_2 , em temperaturas de 20 a 40 °C e pressões entre 100 - 250 bar, o maior rendimento (2,1 %) foi obtido com 250 bar e 40 °C e 600 g de CO_2 (0,1 kg de $\text{CO}_2 \text{ h}^{-1}$).

O rendimento de extração de FG com CO_2 supercrítico em diferentes combinações de pressão e temperatura, mediante um planejamento experimental fatorial completo 3^2 , mantendo constante a vazão mássica de CO_2 em 0,5 kg h^{-1} , e tempo de extração em 3 h (Tabela 13), varia entre 0,9 e 3,1 %, similar aos resultados reportados por Jacques et al. (2007) que estudaram o rendimento de ESC de folhas de *I. paraguariensis* em condições de extração (pressão e temperatura) similares às usadas neste estudo.

O maior rendimento, 3,1 %, é obtido para as condições de maior pressão 250 bar. Esse valor é 1,4 vezes maior ao melhor rendimento

para ESC de folhas de *I. paraguariensis* reportado por Esmelindro et al. (2005) obtido a 35 °C, 250 bar, 1,2 kg CO₂.

Tabela 13. Rendimento global da extração de FG mediante CO₂ supercrítico aplicando planejamento experimental fatorial completo 3², vazão mássica CO₂ de 0,5 kg h⁻¹.

Pressão [bar]	Temperatura [°C]	Densidade CO ₂ [kg/m ³]	Rendimento* Y (%)
150	45	741,97	1,9±0,1 ^{de}
200	45	812,69	2±0,1 ^d
250	45	857,14	2,1±0,02 ^{de}
150	60	604,09	1,5±0,1 ^d
200	60	723,68	2,33±0,01 ^{ce}
250	60	786,55	2,7±0,3 ^{bc}
150	75	463,33	0,9±0,1 ^a
200	75	626,23	2,3±0,2 ^{ce}
250	75	711,61	3,1±0,2 ^b

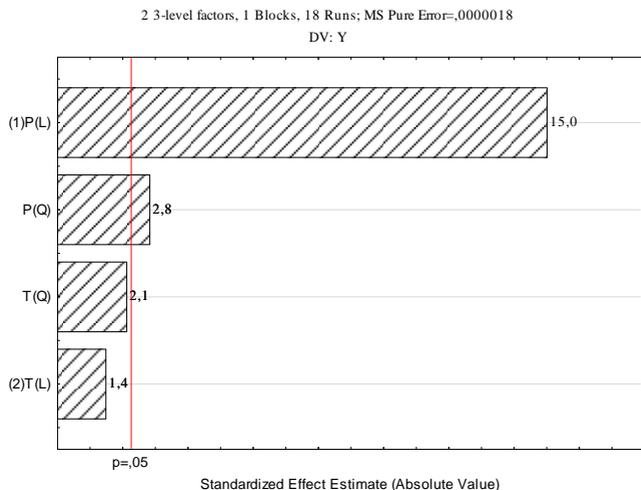
* Letras iguais significam que estatisticamente não existe diferença entre as médias para um nível de confiança 95 % (p<0,05).

Quando foram avaliados os fatores com maior influencia para o rendimento da ESC usando o diagrama de Pareto (Figura 19), observou-se que unicamente a pressão apresentou efeito positivo e significativo para o rendimento global (Y).

Porém o fato que o fator temperatura não aparecer como relevante segundo análise de Pareto (Figura 19) deve ser interpretado com cuidado, pois a variável de resposta (Y %) obtida entre os limites escolhidos de temperatura (-1, +1) pode produzir um efeito de anulação devido ao comportamento retrógrado (diminuição da solubilidade com o incremento da temperatura) observado nas isotermas de extração (Figura 20).

Assim, mediante os dados de rendimento foram construídas as isotermas de rendimento global (Figura 20). Essas curvas permitem observar a influência da pressão e a temperatura na ESC de FG.

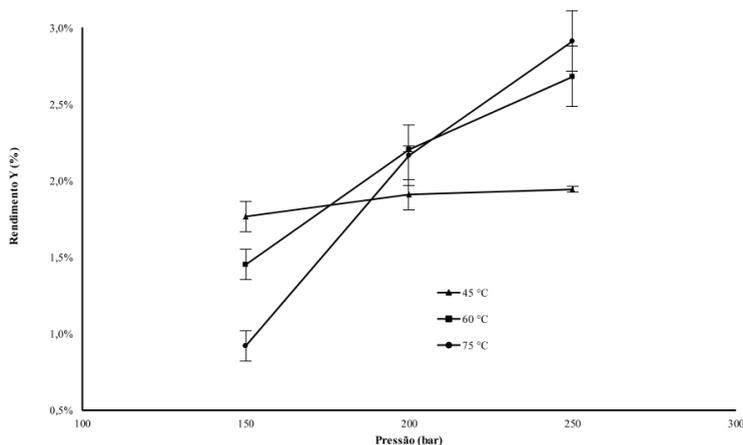
Figura 19. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO₂, mediante planejamento experimental fatorial completo 3², para um nível de confiança de 95 %.



O ponto de cruzamento das isoterma acontece na vizinhança da pressão de 200 bar. À direita do ponto de cruzamento, mantendo a pressão constante, o rendimento da extração aumenta com a temperatura, porém para pressões abaixo do ponto de cruzamento das isoterma, o efeito contrário é observado. Isso ocorre devido a dois efeitos opostos que a temperatura produz na solubilidade do soluto e nas propriedades do CO₂. O primeiro é o incremento da pressão de vapor do soluto, favorecendo sua solubilidade no CO₂ e, portanto, aumentando o rendimento da extração, o segundo ocorre devido ao aumento da temperatura, que diminui a densidade do CO₂ e conseqüentemente seu poder de solvatação.

O efeito do incremento do poder de solvatação com a pressão é observado, por exemplo, na isoterma de 75 °C, que para pressão de 250 bar obteve-se o maior rendimento (3,1 %) enquanto o efeito oposto foi obtido para a pressão de 150 bar onde foi obtido o menor rendimento (0,9 %).

Figura 20. Isotermas de rendimento da ESC de FG com CO₂ aplicando planejamento experimental fatorial completo 3², vazão mássica de CO₂: 0,5 kg h⁻¹.



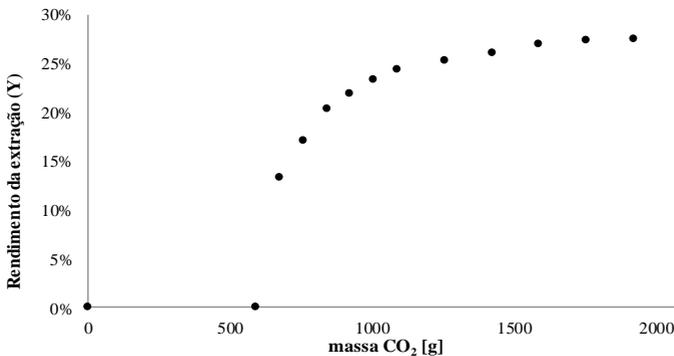
Quando a temperatura for mantida constante, a elevação da pressão melhorou o rendimento da extração, isso se deve ao fato de que a densidade do CO₂ supercrítico aumenta, logo, ocorre o aumento do poder de solvatação e mais soluto é transferido para o CO₂ favorecendo o processo de extração. Por exemplo, utilizando isoterma de 75 °C houve um incremento de 3,4 vezes no rendimento global da extração, quando ocorre a variação da pressão de 150 bar para 250 bar. Contudo, este efeito não foi observado na isoterma correspondente a 45 °C (perto da temperatura crítica do CO₂ 31 °C) que não apresentou incremento significativo do rendimento quando incrementada a pressão, possivelmente devido à baixa solubilidade dos compostos presentes nas FG para essa combinação de pressão e temperatura. Incrementos de pressão junto com elevadas temperaturas apresentam os melhores rendimentos de extração, porém elevadas temperaturas poderiam degradar compostos sensíveis.

Mesmo que a densidade do CO₂ supercrítico possa ser modificada aplicando elevadas pressões, ele ainda apresenta caráter não polar e compostos polares ou com elevada massa molecular são pouco solúveis. Isso é demonstrado pelos baixos rendimentos obtidos na extração, pois os compostos presentes nas FG apresentam pouca solubilidade em CO₂, contudo isso pode ser corrigido mediante a adição de cossolventes.

4.2.1.2 ESC com adição de cossolvente

Como os melhores rendimentos obtidos nas técnicas de extração convencionais foram com o solvente água, realizou-se a curva de extração de ESC com água como cossolvente para avaliar o comportamento da FG usando esse cossolvente em condições de pressão 150 bar, temperatura 45 °C, vazão mássica de CO₂ 0,5 kg h⁻¹, 7 % cossolvente (m/m CO₂), durante 4 h (Figura 20).

Figura 21. Curva de extração de FG mediante ESC com cossolvente água (7 %, m/m), P: 150 bar, T: 45 °C, vazão mássica CO₂ de 0,5 kg h⁻¹ e tempo 4 h .



A solubilidade dos compostos presentes nas FG foi aprimorada com o uso de cossolvente, e o rendimento da extração atingiu um rendimento global de extração máximo de 27 %, isso é, oito vezes o maior rendimento obtido com ESC usando apenas CO₂. Porém, o uso de cossolventes requer processos adicionais para obter extratos livres de solvente, isso implica maior demanda energética e principalmente de tempo.

A Tabela 14 mostra o efeito da adição de cossolventes (etanol, mistura etanol-água e água), pressão e temperatura no rendimento global de extração da ESC mediante um planejamento experimental 2³. As condições dos experimentos foram: Pressão: 150 - 250 bar, temperatura: 45 - 75 °C, vazão mássica de CO₂: 0,5kg h⁻¹, % cossolvente: 7 % (m/m CO₂), tempo: 3 h.

Tabela 14. Rendimento global da extração de FG aplicando ESC junto com diferentes cossolventes (7 % m/m) e diferentes condições de pressão e temperatura, vazão mássica CO₂ de 0,5 kg h⁻¹.

Cossolvente	Pressão [bar]	Temperatura [°C]	Rendimento* Y [%]
Água	150	45	27±2 ^a
Água	250	45	29±2 ^a
Água	150	75	29±2 ^a
Água	250	75	32±2 ^a
Etanol	150	45	4,3±0,3 ^b
Etanol	250	45	3,4±0,5 ^b
Etanol	150	75	3,6±0,4 ^b
Etanol	250	75	6±0,1 ^b
Mistura etanol/água (1:1, v/v)	200	60	29,3±0,7 ^a

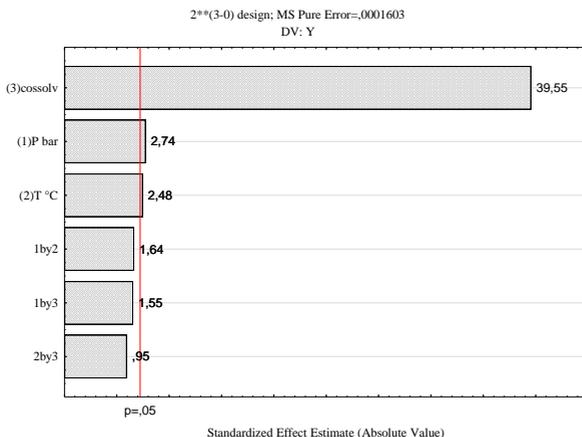
* Letras iguais significam que estatisticamente não existe diferença entre as médias para um nível de confiança 95 % (p<0,05).

Quando foram avaliados os fatores com maior influencia para o rendimento da ESC com cossolvente mediante o diagrama de Pareto (Figura 22), observou-se o principal fator com maior efeito positivo no rendimento global como sendo o cossolvente, seguido da pressão e finalmente da temperatura.

Observou-se que quanto mais polar for o cossolvente maior é o efeito positivo no rendimento. Assim, para o cossolvente água (polaridade 9,0) foram obtidos os melhores resultados com rendimentos entre 27 % - 32 %, seguidos do rendimento obtido com o cossolvente etanol-água (polaridade 7,1) com rendimentos de 29,3 % e finalmente o cossolvente etanol (polaridade 5,2) com rendimentos entre 4,3 % - 6 %.

Esses resultados concordam com o reportado por Solana et al. (2014) que avaliaram a influência de vários cossolventes (água, etanol, metanol) na ESC de rúcula e o melhor resultado foi obtido com água. Os resultados apresentados por Chang et al. (2001) mostraram o incremento do rendimento na ESC quando usado o cossolvente etanol-água para extração de folhas de chá Oolong (*Camellia sinensis*).

Figura 22. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO₂, mediante planejamento experimental fatorial completo 3², para um nível de confiança de 95 %.



Casas et al. (2007) utilizaram 5 % de cossolvente (água, DMSO e etanol) para a extração de compostos bioativos mediante ESC de girassol e obtiveram os melhores rendimentos (20 %) com água, mostrando assim que a água é um ótimo cossolvente, desde que seja em baixas concentrações para que o CO₂ possa permanecer em condições supercríticas e para facilitar o pós processamento, para que seja energeticamente eficiente.

Não houve diferença estatística significativa entre o rendimento obtido quando utilizado cossolvente etanol-água (200 bar, 60 °C) e somente água (250 bar, 45 °C), isso é importante, pois o cossolvente etanol-água demanda menor quantidade de energia e tempo para sua remoção quando comparado com o cossolvente água. Mas a escolha dependerá não apenas do rendimento e sim do tipo de compostos e a atividade biológica obtida dos mesmos.

4.2.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)

Testes preliminares foram conduzidos para avaliar o efeito da pressão na ELP com pressões de 0, 100, 150 e 200 bar e temperaturas de 45, 60 e 73 °C.

No presente estudo a pressão não influenciou o rendimento da ELP, isso, porque como indicam Plaza e Turner (2015) e Osorio-Tobón

e Meireles (2013), a principal função da elevada pressão na ELP é manter o solvente em estado líquido quando são usadas temperaturas de extração acima da temperatura de ebulição do solvente. Assim, optou-se por fixar seu valor em 100 bar para os demais experimentos.

A máxima temperatura de extração foi fixada em 73 °C devido a que o equipamento de ELP atualmente usado no LATESC não atinge maiores temperaturas.

A Figura 23 mostra as curvas de rendimento para ELP de FG usando solventes de diferente polaridade: etanol, mistura etanol-água e água.

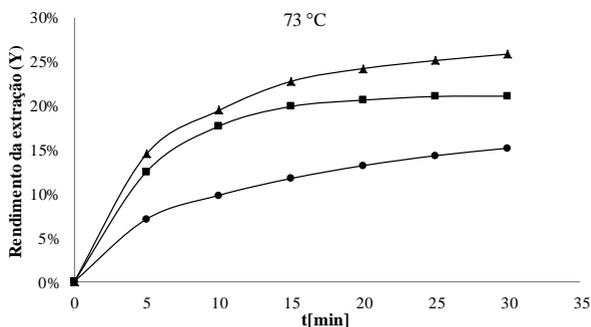
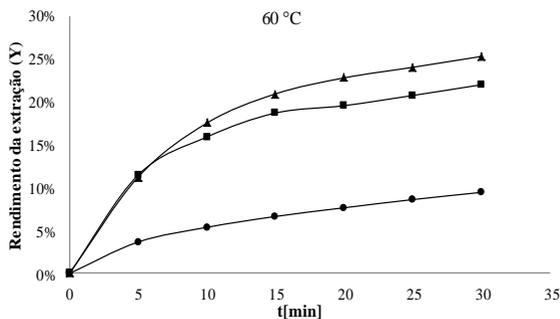
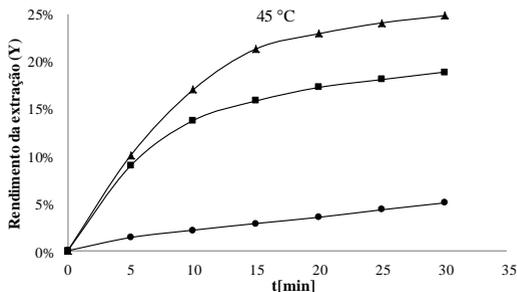
Para o caso do solvente etanol (Figura 23), a temperatura teve um efeito positivo no rendimento, as curvas de rendimento foram completamente diferentes para cada temperatura (45, 60 e 73 °C) mostrando que os compostos presentes nas FG apresentaram maior solubilidade no etanol quanto maior foi a temperatura de extração. Esse efeito positivo pode ser explicado devido a que o incremento da temperatura diminui a viscosidade do solvente, permitindo a penetração do solvente na matriz e também incrementa a solubilidade do soluto no solvente. Outro efeito positivo do incremento da temperatura é que elevadas temperaturas reduzem as interações entre a matriz e soluto permitindo a difusão do soluto e a extração do mesmo (BELANDRIA et al., 2016; MACHADO et al., 2015 apud VIGANÓ et al., 2016).

Quando usada à mistura etanol-água (Figura 23) como solvente, a temperatura também teve um efeito positivo quando foi incrementada de 45 a 60 °C, porém incrementando de 60 a 73 °C não apresentou efeito nenhum no rendimento global. Esse fenômeno também foi observado nas curvas de rendimento com solvente água (Figura 23), em todas as temperaturas (45, 60 e 73 °C), isso é, a temperatura não influenciou no rendimento obtido. Isso pode ser devido a que foi atingida a fase dominada pelo fenômeno de difusão.

O rendimento obtido para a ELP de FG mediante um planejamento experimental fatorial completo 3², variando o tipo de solvente e temperatura, mantendo constante a vazão mássica de solvente em 3,3 g min⁻¹, e tempo de extração em 30 min (Tabela 15), varia entre 5,7 e 25 %.

Figura 23. Curvas de rendimento de extração da técnica ELP de FG, usando solventes: etanol (●), mistura etanol/água (1:1 v/v) (■) e água (▲) em

temperaturas de 45, 60 e 73 °C, P: 100 bar, durante 30 minutos e vazão mássica de solvente 3,3 g min⁻¹.



O maior rendimento foi obtido com solventes mais polares (água e mistura etanol/água), os menores rendimentos foram obtidos com etanol.

O melhor rendimento obtido com água (25 %) foi 1,6 vezes maior ao melhor rendimento obtido com etanol (16,2 %). Também, não houve

diferença estatística com um nível de confiança de 95 %, entre os rendimentos obtidos com água e mistura etanol-água.

O melhor rendimento da ELP (25 %) obtido com água foi maior quando comparado com as técnicas convencionais, porém menor quando comparado com o melhor rendimento da técnica ESC e cossolvente água (15 % inferior). A principal vantagem da ELP foi o reduzido tempo de extração, pois em apenas 30 minutos obteve-se 85 % do rendimento obtido com a ESC com cossolvente água durante 3 h.

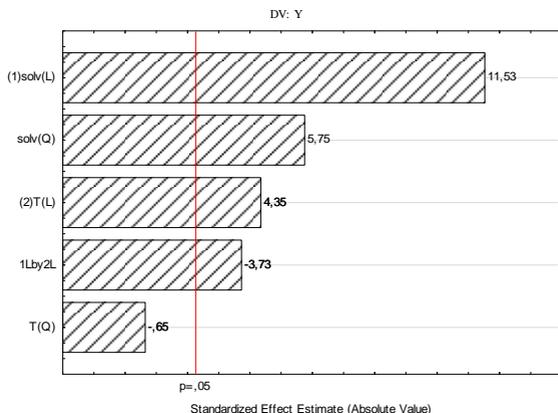
Tabela 15. Rendimento global da extração de FG aplicando técnica ELP, usando solventes etanol, mistura etanol/água (1:1 v/v) e água com temperaturas de 45, 60 e 73 °C e vazão mássica de solvente 3,3 g min⁻¹.

Solvente	Pressão [bar]	Temperatura [°C]	Rendimento* Y [%]
Água	100	45	25±2 ^a
Água	100	60	23,5±0,3 ^{ab}
Água	100	73	25±3 ^a
Etanol/Água (1:1, v/v)	100	45	21±1 ^{ab}
Etanol/Água (1:1, v/v)	100	60	24±4 ^{ab}
Etanol/Água (1:1, v/v)	100	73	26±2 ^a
Etanol	100	45	5,7±0,5 ^c
Etanol	100	60	10,4±0,6 ^{cd}
Etanol	100	73	16,2±0,2 ^{bd}

* Letras iguais significam que estatisticamente não existe diferença entre as médias para um nível de confiança 95 % (p<0,05).

Quando foram avaliados os fatores com maior influência para o rendimento da ELP usando o diagrama de Pareto (Figura 24), observou-se que o tipo de solvente e temperatura foram significativos, porém com maior impacto positivo na variável de resposta (Y) foi o tipo de cossolvente.

Figura 24. Diagrama de Pareto dos principais efeitos obtidos para ESC de FG com CO₂, mediante planejamento experimental fatorial completo 3², para um nível de confiança de 95 %.



Quando comparado com outros trabalhos, o melhor rendimento obtido (26 %) foi 1,1 vezes maior ao rendimento obtido mediante PLE de folhas de erva-mate (23,1 %) usando metanol (103 bar, 100 °C, 1 min) (JACQUES et al., 2006), porém 1,75 vezes inferior ao melhor rendimento reportado por Villanueva et al. (2015), quando usaram água (100 bar, 200 °C, 20 min) para extrair cafeína e catequinas a partir de chá (*Camellia sinensis*) mediante técnica ELP. Também 3,2 vezes inferior ao rendimento obtido por Kotovicz e Zanoelo (2013) que obtiveram 80 % usando pulsos de PLE (3,4 bar, 100 °C, 7 h). Diferenças entre estudos podem ser atribuídas aos diferentes solventes, matéria prima, técnicas de extração e tempo de extração.

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de FG mediante técnicas de baixa e alta pressão são apresentados a seguir.

4.3.1 Técnicas convencionais

Quando avaliado o teor de CFT para técnicas convencionais (Tabela 16), no caso da técnica de maceração, em que a temperatura utilizada é constante, o teor de CFT aumenta com o incremento da polaridade do solvente. Assim, o maior teor CFT é obtido com água (38 mg GAE g⁻¹) e o menor foi obtido para hexano (2,4 mg GAE g⁻¹). Pois, os compostos fenólicos são mais solúveis em solventes polares.

Tabela 16. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	CFT ^{*,**}
Soxhlet	Hexano	1	54	3,3 ± 0,1 ^h
	Acetato de etila	1	59	7,6 ± 0,1 ^f
	Etanol	1	61	22,3 ± 0,2 ^d
	Etanol/Água (1:1, v/v)	1	73	48 ± 1 ^b
	Água	1	79	63,1 ± 0,2 ⁿ
Maceração	Hexano	1	18	2,4 ± 0,05 ^h
	Acetato de etila	1	18	5,35 ± 0,03 ^g
	Etanol	1	18	5,7 ± 0,1 ^g
	Etanol/Água (1:1, v/v)	1	18	20,4 ± 0,3 ^e
	Água	1	18	38 ± 0,9 ^c

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas ($p < 0,05$).

** CFT expresso em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g^{-1} FG seca.

Quando a temperatura de extração varia, junto com a polaridade, o valor CFT aumenta na medida em que ocorre o incremento da temperatura. Assim, os maiores valores obtidos correspondem a água (63,1 mg GAE g^{-1}) e o menor valor foi para hexano (3,3 mg GAE g^{-1}). A temperatura tem um efeito significativo, porque reduz a viscosidade do solvente, favorece as interações soluto-solvente favorecendo a transferência de massa.

Comparando os melhores resultados entre as técnicas convencionais, a técnica Soxhlet supera a maceração em 1,6 vezes no valor de CFT com valores de 63,1 - 38 mg GAE g^{-1} , respectivamente. A maior temperatura de extração na técnica Soxhlet comparada com a técnica de maceração foi o fator que permitiu maior extração de CFT.

Entre os solventes, o etanol e mistura etanol/água apresentam bons rendimentos com CFT (50 - 80 % dos CFT obtidos com água), mas a principal vantagem que apresentam esses solventes é a menor demanda de tempo e energia para as posteriores etapas para sua remoção.

O valor máximo de CTF obtido com a técnica Soxhlet com solvente água (63,1 mg GAE g^{-1}) está em concordância com os resultados obtidos por García et al. (2017) que obtiveram um valor de 55 mg GAE g^{-1} para o caso de FG verdes, usando mistura metanol-água (70:30 v/v), Pardau (2016) que obteve 63 mg GAE g^{-1} para o caso FG

pretas³ e de 55 mg GAE g⁻¹ para o caso de FG verde, em ambos os casos usando metanol, e Jara et al. (2013) que reportaram um valor de 54 mg GAE g⁻¹ para extração com etanol e superiores aos valores reportados por Villacís-Chiriboga et al. (2018) que para FG novas (colhidas com 2 meses de idade) foi 33,4 mg GAE g⁻¹ e 21,42 mg GAE g⁻¹ para folhas velhas (colhidas com 6 meses de idade).

Porém, quando deixado por fora o valor máximo obtido com água na técnica Soxhlet, todos os resultados são inferiores se comparados com os reportados para o caso de FG escaldadas³: 107 mg GAE g⁻¹ (GARCÍA et al., 2017). Também a maioria dos resultados de CFT obtidos no presente estudo, são inferiores aos valores apresentados por Jara et al. (2013), que reportaram valores de CFT de 54 mg GAE g⁻¹ e 36 mg GAE g⁻¹ para extratos de FG obtidos com solvente etanol e acetato de etila respectivamente. Diferenças podem ser devido ao solvente usado, pré-tratamento das FG ou data da colheita.

Valores de CFT publicados para outras espécies do gênero *Ilex* (Tabela 17) são completamente diferentes, com valores na faixa entre 10 e 170 mg GAE g⁻¹ (AGUIAR et al., 2012; BAE et al., 2015; ESMELINDRO et al., 2005; LIU et al., 2009; PAGLIOSA et al., 2010; TURKMEN; SARI; SEDAT, 2006).

As diferenças podem ser atribuídas ao processamento das FG que influencia no tipo, quantidade e qualidade de compostos obtidos na extração (ESMELINDRO et al., 2002; ESMELINDRO et al., 2005; ISOLABELLA, 2010; NABECHIMA, 2010), bem como também região geográfica onde a amostra é coletada, época do ano, tempo de colheita e idade da planta, etc. (BLUM-SILVA et al., 2015; ESMELINDRO et al., 2005; PARDAU, 2017).

³ Pardau (2016) usa e identifica como folhas de guayusa pretas aquelas resultantes do processo de oxidação enzimática, bem como no caso do chá (*Camellia sinensis*), é um processo no qual agem enzimas principalmente a polifenoloxidase. As folhas de guayusa verdes são aquelas que não foram submetidas ao processo de oxidação enzimática. As folhas de guayusa escaldadas são aquelas resultantes do processo de inativação enzimática mediante calor (branqueamento).

Tabela 17. Teor de compostos fenólicos totais CFT (mg GAE g⁻¹) reportados para espécies Ilex e chá (*C. sinensis*).

Espécie vegetal	Partes usadas/ tratamento	Solvente	CFT	Fonte
<i>I. guayusa</i>	Folha verde	Etanol	54	Jara et al. (2013)
	Folha verde	Acetato de etila	36	
	Folha verde	Metanol	55	Pardau (2016)
	Folha preta	Metanol	62	
	Folha verde	Metanol/água (70:30, v/v)	55	Garcia et al. (2017)
	Folha escaldada	Metanol/água (70:30, v/v)	107	
	Folha nova (2 meses)	Acetona 70%	33	Villacís-Chiriboga et al. (2018)
Folha velha (6 meses)	Acetona 70%	21		
<i>I. paraguayensis</i>	Casca	Metanol	170	Pagliosa et al. (2010)
	Folha	Metanol	50	
	Casca	Água	120	Gullón et al. (2018)
	Folha	Água	70	
	Folha	Etanol	29-41**	Grujic et al. (2012)
		CO ₂ e cossolvente etanol	46-123**	
	Casca	Água	1,6*	Aguiar et al. (2012)
Folha	Água	10-31	Bae et al. (2015)	
Resíduo de folhas	Água, água acidificada, metanol, etanol, acetona	46-62		
<i>I. Kudingcha</i>	Folha	Água	50	Liu, et al. (2009)
<i>C. sinensis</i>	Folha verde	Metanol	194	Pardau (2016)
	Folha preta	Metanol	182	

* Reportado em [mg GAE mL⁻¹].

** Reportado em [mg CAE g⁻¹], CAE: equivalente de ácido clorogênico.

Também existem diferenças devido à diversidade metodológica aplicada nos diferentes estudos para a quantificação de compostos fenólicos o que pode induzir variações e faz difícil sua comparação direta (PARDAU, 2016).

4.3.2 Técnicas a alta pressão

4.3.2.1 ESC com CO₂

Os valores de CFT obtidos para a técnica ESC com CO₂ (Tabela 18) foram os menores entre as técnicas de extração (0,28 - 1,18 mg GAE g⁻¹), pois o CO₂ supercrítico possui características apolares e os compostos fenólicos presentes nos extratos de FG possuem afinidade por solventes polares.

Tabela 18. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica com CO₂.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	CFT ^{*,**}
ESC	CO ₂	150	45	0,81 ± 0,01 ^c
		200	45	0,9 ± 0,04 ^{de}
		250	45	0,93 ± 0,03 ^{de}
		150	60	0,63 ± 0,03 ^c
		200	60	0,62 ± 0,03 ^c
		250	60	1,18 ± 0,04 ^a
		150	75	0,28 ± 0,01 ^b
		200	75	0,96 ± 0,05 ^b
		250	75	0,84 ± 0,02 ^{de}

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** CFT expresso mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FG seca.

Valores baixos de CFT foram reportados por Castro-Vargas et al. (2010) que usaram ESC para extração de fenólicos de sementes de goiaba e obtiveram valores de 0,72 mg GAE g⁻¹. Contudo, compostos fenólicos podem ser extraídos aplicando a técnica ESC, principalmente o tipo de compostos fenólicos presente majoritariamente no gênero *Ilex*, isso é ácido cinâmico, ácido cafeico, ácido ferúlico, mediante a aplicação de elevadas pressões de até 500 bar, como foi reportado por Díaz-Reinoso et al. (2006), Murga et al. (2003) e Piantino et al. (2008).

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes nos CFT, mediante o diagrama de Pareto para a técnica ESC (Figura A-II 1, Apêndice II), observou-se que unicamente a pressão foi relevante.

4.3.2.2 ESC com adição de cossolvente

A utilização de cossolvente permitiu uma melhora notável no rendimento de CFT (Tabela 19), dependendo do cossolvente usado: cossolvente água obteve-se valores entre 28,3 - 43,2 mg GAE g⁻¹, com a mistura etanol-água foi possível alcançar 38,9 mg GAE g⁻¹ e por fim, com o etanol obteve-se 2,3 - 4 mg GAE g⁻¹.

O uso de etanol como cossolvente melhora o rendimento de CFT quando comparado com a ESC, porém é inferior (aproximadamente 11 vezes) quando comparado com o valor de CFT obtido com ESC e cossolvente água.

Tabela 19. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante ESC e cossolventes.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	CFT ^{*,**}		
ESC	CO ₂ - Água	150	45	28,3 ± 0,5 ^c		
		250	45	33,8 ± 0,3 ^b		
		150	75	39 ± 1 ^d		
		250	75	43,2 ± 1 ^a		
	CO ₂ - Etanol	150	45	2,97 ± 0,01 ^e		
		250	45	2,6 ± 0,1 ^e		
		150	75	2,3 ± 0,1 ^e		
		250	75	4 ± 0,4 ^e		
		CO ₂ - (Etanol/Água (1:1, v/v))		200	60	38,9 ± 0,8 ^d

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** CFT expresso mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FG seca.

Os CFT obtidos para ESC com cossolvente mistura etanol-água quando comparada com a água não apresentou diferença estatisticamente significativa.

O efeito positivo no rendimento de CFT, quando adicionado cossolvente à técnica ESC tem sido reportado para várias matérias-primas, por exemplo, Vieitez et al. (2018) usando 10 % etanol como cossolvente obtiveram 28,3 mg GAE g⁻¹ de extrato de folhas de erva-mate, Castro-Vargas et al. (2010) incrementaram o CFT usando cossolvente etanol com um valor de 131 mg GAE g⁻¹ de semente de goiaba. Espinosa et al. (2017) obtiveram valor máximo de CFT de 21,7 mg GAE g⁻¹ para ESC com 6 % de etanol casca de laranja, isso devido a que a adição de pequenas quantidades de cossolventes polares incrementam a polaridade, densidade da mistura supercrítica e também reduzem a interação entre matriz-composto facilitando sua extração (GRUJIC et al., 2012; SUN, 2010).

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes nos CFT, mediante o diagrama de Pareto para a técnica ESC com cossolvente (Figura A-II 2, Apêndice II), observou-se que foram relevantes principalmente o cossolvente, temperatura e pressão, isso devido a que como indicado anteriormente a polaridade do cossolvente foi o fator que mais influi na extração dos CFT.

4.3.2.3 Extração com líquido pressurizado (ELP)

Os valores de CFT obtidos para a técnica ELP (Tabela 20) estiveram entre os maiores entre as diferentes técnicas de extração aplicadas (3,5 - 47 mg GAE g⁻¹). Observou-se dependência entre os CFT e a polaridade do solvente usado, assim os melhores resultados (35 - 47 mg GAE g⁻¹) dentro da técnica ELP foram obtidos com o solvente mais polar, a água.

O solvente que apresentou menores valores de CFT foi etanol (3,5 - 13 mg GAE g⁻¹), isso devido à sua menor polaridade quando comparado com a água.

Tabela 20. Teor de compostos fenólicos totais CFT nos extratos de FG obtidos mediante líquido pressurizado.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	CFT ^{*,**}	
ELP	Etanol	100	45	3,5 ± 0,2 ^c	
		100	60	9,2 ± 0,5 ^{bc}	
		100	73	13 ± 1 ^b	
	Etanol - Água (1:1, v/v)	100	45	24 ± 1 ^a	
		100	60	38,4 ± 0,8 ^{de}	
		100	73	34 ± 2,2 ^e	
		100	45	47 ± 2 ^d	
		Água	100	60	35 ± 3 ^e
			100	73	46,3 ± 5 ^d

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** CFT expresso mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FG seca.

O efeito da polaridade de diferentes solventes aplicados na extração com a técnica PLE de compostos fenólicos tem sido descrita na literatura, por exemplo, Machado et al. (2015) reportaram a variação de CFT (2 - 7 mg GAE g⁻¹) para extratos de resíduos de amora (*Rubus fruticosus* L.) usando água, água acidificada e diferentes misturas de etanol com água. Também Viganó et al. (2016) reportaram a variação de CFT (0,8 - 3,2 mg GAE g⁻¹) para extratos de maracujá usando misturas de água e etanol em diferentes concentrações. Também Piñeiro et al. (2004) que usaram solventes como água, metanol, etanol e acetato de

etila para recuperar catequinas de chá (*Camellia sinensis*), e evidenciaram a dependência do teor de fenólicos em função do solvente usado.

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes nos CFT, mediante o diagrama de Pareto para a técnica ELP (Figura A-II 3, Apêndice II), observou-se que foram relevantes, principalmente o solvente e a temperatura, isso devido a que como indicado anteriormente a polaridade do solvente foi o fator que mais influi na extração dos CFT.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

A seguir apresentam-se os resultados obtidos da análise da atividade antioxidante para extratos obtidos a partir de FG mediante técnicas dos radicais ABTS e DPPH. As duas técnicas permitiram obter a AA de extratos hidrossolúveis e lipossolúveis. A comparação com outros resultados é limitada, pois pesquisas aplicando essas técnicas para extratos de FG são escassas.

4.4.1. ABTS

4.4.1.1 Técnicas convencionais

Valores de AA para extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais, variaram desde 7 - 358 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG. Quando comparadas as técnicas de extração, Soxhlet e maceração, os melhores resultados de AA são obtidos com a técnica Soxhlet (4,9 - 358 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG).

Tabela 21. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos por técnicas de extração convencionais.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	ABTS ^{1,2}
Soxhlet	Hexano	1	54	4,9 ± 0,1 ^g
	Acetato de etila	1	59	103,4 ± 0,5 ^d
	Etanol	1	61	117 ± 6 ^c
	Etanol /Água (1:1, v/v)	1	73	358 ± 7 ^a
	Água	1	79	29 ± 2 ^e
Maceração	Hexano	1	18	7 ± 1 ^g
	Acetato de etila	1	18	14,4 ± 0,4 ^g
	Etanol	1	18	62 ± 1 ^f
	Etanol /Água (1:1, v/v)	1	18	163,6 ± 0,9 ^b
	Água	1	18	54,2 ± 0,5 ^f
BHT				3814 ± 89

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas ($p < 0,05$).

** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG.

Quando avaliados os solventes, os melhores resultados de AA foram obtidos com solvente etanol-água em ambas as técnicas Soxhlet e maceração. Para a técnica Soxhlet foi obtido 358 ± 7 e para a técnica de maceração $163,6 \pm 0,9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG.

4.4.1.2 Técnicas a alta pressão

4.4.1.2.1 ESC com CO_2

A técnica ESC (Tabela 22) apresentou os menores valores de AA ($0,21$ - $4,72 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG).

Quando avaliadas as diferentes condições, o menor valor foi obtido para 150 bar e 75 °C, e o maior valor para as condições de 250 bar e 60 °C. Os baixos valores de AA podem estar relacionados com o tipo de compostos que estão sendo extraídos mediante ESC, esses compostos podem não apresentar propriedades antioxidantes.

Tabela 22. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	ABTS ^{1,2}
ESC	CO ₂	150	45	0,83 ± 0,01 ^c
		200	45	0,27 ± 0,01 ^{ef}
		250	45	0,22 ± 0,01 ^f
		150	60	0,45 ± 0,02 ^{def}
		200	60	1,25 ± 0,01 ^b
		250	60	4,72 ± 0,09 ^a
		150	75	0,21 ± 0,02 ^f
		200	75	0,59 ± 0,07 ^d
		250	75	1,1 ± 0,1bc
BHT				3814 ± 89

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$.

Baixos valores de AA para extratos obtidos mediante ESC têm sido reportados na literatura, por exemplo, Mazzutti (2016) obteve os menores valores de AA para extratos obtidos mediante ESC a partir de folhas de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*, também Oliveira (2015) ao avaliar os extratos obtidos a partir de semente de maracujá (*Passiflora edulis*).

Mediante a análise de Pareto (Figuras A-III 1, Apêndice III), os fatores que apresentaram maior influência na AA quantificada mediante ABTS, para a técnica ESC foram pressão e temperatura. Isso devido a que a essas variáveis definem as propriedades do solvente CO₂.

4.4.1.1.2 ESC com cossolventes

Quando adicionados cossolventes, os valores de AA foram aprimorados (Tabela 23), valores variaram entre 0,7 - 119 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$. Os melhores resultados foram obtidos com o cossolvente água (52 - 119 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$) e os menores com o cossolvente etanol (0,7 - 3 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$), isso sugere que os compostos com potencial antioxidante presentes nas FG são aqueles com características polares.

Tabela 23. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante ESC com cossolventes.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	ABTS ^{1,2}
ESC	CO ₂ / Água	150	45	52 ± 2 ^b
		250	45	85 ± 1 ^{cd}
		150	75	119 ± 0,7 ^a
		250	75	77 ± 4 ^{cd}
	CO ₂ / Etanol	150	45	1,5 ± 0,1 ^e
		250	45	2,4 ± 0,1 ^e
		150	75	0,7 ± 0,1 ^e
		250	75	3 ± 0,1 ^e
CO ₂ / (Etanol / Água (1:1, v/v))	200	60	71 ± 3 ^d	
BHT			3814 ± 89	

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas ($p < 0,05$).

** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG.

O efeito favorável da adição de diferentes cossolventes na AA avaliada mediante ABTS tem sido reportado na literatura, por exemplo, Lasta (2017) obteve incremento da AA quando usou cossolventes etanol e misturas de etanol – água, na extração de resíduos de beterraba (*Beta vulgaris* L.), contudo melhores resultados foram obtidos quando usado etanol. Quando usado apenas etanol, Oliveira (2015) teve efeito positivo para os extratos obtidos a partir de semente de maracujá (*Passiflora edulis*), bem como também Andrade (2015) para extratos obtidos a partir de (*Piper nigrum*).

Mediante a análise de Pareto (Figuras A-III 2, Apêndice III), os fatores que apresentaram maior influência na AA quantificada mediante ABTS, para a técnica de extração ESC com cossolvente, foram o cossolvente e temperatura. Isso devido à maior influência da polaridade do solvente na extração de compostos a partir de FG.

4.4.1.1.3 ELP

Os valores de AA obtidos para a técnica ELP foram dependentes do solvente usado (polaridade) e apresentaram valores entre 9 – 157 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG (Tabela 24).

Tabela 24. AA mediante método ABTS dos extratos de FG obtidos mediante ELP.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	ABTS ^{1,2}
ELP	Etanol	100	45	9 ± 0,3 ^b
		100	60	17 ± 2 ^b
		100	73	12 ± 3 ^b
	Etanol / Água (1:1, v/v)	100	45	65 ± 2 ^a
		100	60	135,4 ± 0,2 ^c
		100	73	155 ± 14 ^c
	Água	100	45	139 ± 6 ^c
		100	60	154 ± 8 ^c
		100	73	157 ± 1 ^c
BHT				3814 ± 89

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$.

Os melhores resultados foram obtidos quando usado solvente água com valores entre 139 – 165 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$, bons resultados quando usado como solvente a mistura etanol-água com valores entre 65 - 155 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$. Contudo os menores valores de AA foram os obtidos usando solvente etanol com valores entre 9 – 12 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}\text{FG}$. A AA para o caso da técnica ELP foi dependente da temperatura e quanto maior a temperatura de extração maior a AA.

Mediante a análise de Pareto (Figuras A-III 3, Apêndice III), os fatores que apresentaram maior influência na AA quantificada mediante ABTS, para a técnica de extração ELP foram solvente e temperatura.

Em geral, os resultados obtidos da avaliação de AA aplicando o método ABTS sugerem que as FG apresentam AA variável dependendo da técnica de extração empregada.

Os resultados de AA de extratos de FG obtidos são inferiores aos reportados por Pardau (2016) com AA de 455 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ para FG pretas e 519 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ para FG verdes, usando como solvente metanol (solvente tóxico). Pode-se atribuir a diferença ao solvente usado na extração, pré-processamento da folha (inativação enzimática, fermentação) data de colheita, características do solo, etc.

Observou-se que os valores de AA para o caso do solvente água, que apresentou os melhores resultados de rendimento de extração e para

o CFT, quando comparados com os valores de AA obtidos com a mistura etanol/água, apresentou valores entre 8 - 33 % menores (27 ± 2 e 51 ± 6 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG) para processos Soxhlet e maceração.

Esse comportamento pode ser explicado pela influência da polaridade do solvente no tipo de composto extraído e a AA avaliada depende do tipo de composto presente no extrato. A polaridade dos solventes usados varia de 5,2 para o etanol, 7,1 para etanol-água e 9 para água. Porém, pesquisas em outras espécies *Ilex* apresentaram melhores resultados de AA quando utilizado solvente metanol ou etanol puro, comparado com a água. Por exemplo, Thuong et al. (2009), usando extratos de *I. kudingcha*, reportaram resultados 2,5 vezes maior a AA obtida com metanol quando comparada à obtida com água. Bravo, Goya e Lecumberri (2007), usando extratos de *I. paraguariensis*, reportaram valores de AA iguais quando foram usados metanol e água como solventes.

Para outras espécies do gênero *Ilex*, dados reportados sobre AA são variados (Tabela 18), dependendo do processo de extração, solvente, composição da matriz vegetal, entre outras, apresentando valores desde 1,5 até 58 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$. O melhor resultado de AA com extrato de FG (358 ± 17 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ FG) é aproximadamente 6 vezes maior ao valor reportado para extrato aquoso de folhas de *I. kudingcha* (THUONG et al., 2009), e aproximadamente 188 vezes maior ao valor reportado de AA para extratos metanoicos de folha de *I. paraguariensis* (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2017).

Tabela 25. Atividade antioxidante (AA) reportada para espécies *Ilex* aplicando metodologia do radical ABTS.

Espécie vegetal	Partes usadas /tratamento	Solvente	ABTS	Fonte
<i>I. guayusa</i>	Folha verde	Metanol	519	Pardau (2016)
	Folha preta	Metanol	455	
<i>I. paraguariensis</i>	Folha	Água	1,5-1,7	Bravo, Goya e Lecumberri (2007)
	Folha	Metanol	1,5-1,8	
<i>I. kudingcha</i>	Folha	Água	23	Thuong et al. (2009)
	Folha	Metanol	58	

A mistura etanol - água, usada como cossolvente na ESC ou solvente nas técnicas Soxhlet, maceração e ELP, apresentou bons resultados de AA, por exemplo, quando usada como cossolvente na ESC (71 ± 3 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) e quando usada como solvente ($65 \pm 2 - 155 \pm$

14 $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) esses resultados concordam com os apresentados em outras pesquisas usando a mistura etanol - água como cossolvente, que também foram bons ou até melhores quando comparados com outros cossolvente ou com a ESC (ANDRADE, 2015; DE OLIVEIRA, 2015; LASTA, 2017), isso possivelmente devido ao fato que nas misturas de solventes, principalmente água com etanol ou metanol, o solvente menos polar (etano ou metanol) favorece a solubilidade do soluto, enquanto que o solvente mais polar (água) ajuda na dessorção do soluto do substrato (MUSTAFA; TURNER, 2011 apud MACHADO et al., 2015).

Quando avaliada a correlação linear entre CFT e AA, obteve-se um valor igual a 0,86 (Figura A-V 1, Apêndice V) mostrando uma correlação direta e positiva entre CFT e AA.

4.4.2 DPPH

A AA foi expressa mediante o valor IC50 que representa a concentração de extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$), necessária para inibir 50 % dos radicais DPPH. Os melhores resultados para AA foram para os menores valores de IC50, pois quanto menor for o valor de IC50, maior é a capacidade de inibição de radicais livres.

Para a comparação e análise dos resultados obtidos mediante método DPPH, se aplicou a classificação de AA segundo Reynertson; Basile; Kennelly (2005) que sugere que os extratos podem ser: muito ativos, se o valor de IC50 é menor do que $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderadamente ativos, para valores entre $50 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, levemente ativos, para valores entre $100 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e inativos, para valores maiores do que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.4.2.1 Técnicas convencionais

Os valores de IC50 para os extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais variaram entre $61,9 - 1981 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 26).

A maior AA (menor IC50) foi obtido para a técnica Soxhlet com solvente água com um valor de IC50 de $61,9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 26. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante técnicas convencionais.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	IC50*
Soxhlet	Hexano	1	54	1981 ± 30 ^a
	Acetato de etila	1	59	558 ± 5 ^c
	Etanol	1	61	153 ± 4 ^{de}
	Etanol / Água (1:1, v/v)	1	73	72 ± 1 ^e
	Água	1	79	61,9 ± 0,2 ^e
Maceração	Hexano	1	18	1149 ± 11 ^b
	Acetato de etila	1	18	494 ± 5 ^c
	Etanol	1	18	201 ± 66 ^d
	Etanol / Água (1:1, v/v)	1	18	79 ± 1 ^e
	Água	1	18	99 ± 3 ^e

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas ($p < 0,05$).

* IC 50 expresso como $\mu\text{g extrato mL}^{-1}$.

Os extratos moderadamente ativos foram obtidos mediante Soxhlet e maceração em ambos os casos usando solventes água e a mistura etanol/água (1:1 v/v) e os extratos com AA leve foram obtidos quando usado o solvente etanol.

No presente estudo a água foi o solvente que permitiu a melhor AA (menor IC50) com a técnica Soxhlet, esse resultado difere dos apresentados na literatura, por exemplo, usando etanol como solvente, Mazzutti (2016) obteve os menores valores de IC50 para extratos obtidos de folhas de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*, bem como Lasta (2017) para extratos obtidos a partir de resíduos de beterraba (*Beta vulgaris* L.), e também Andrade (2015) para extratos obtidos a partir de (*Piper nigrum*).

Também, Oliveira (2015) obteve menores valores de IC50 na técnica de maceração usando mistura etanol – água para extratos obtidos a partir de semente de maracujá (*Passiflora edulis*).

4.4.2.2 Técnicas a alta pressão

4.4.2.2.1 ESC com CO₂

Os extratos obtidos mediante ESC a partir de FG apresentaram valores de IC₅₀ superiores a 200 µg mL⁻¹ (Tabela 27), isso é não apresentaram AA.

Tabela 27. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante extração supercrítica com CO₂.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	IC ₅₀ [*]
ESC	CO ₂	150	45	5939 ± 31 ^d
		200	45	8187 ± 38 ^a
		250	45	4373 ± 29 ^f
		150	60	6264 ± 10 ^b
		200	60	5075 ± 74 ^e
		250	60	4419 ± 64 ^f
		150	75	6081 ± 1 ^d
		200	75	5500 ± 70 ^e
		250	75	5166 ± 7 ^e

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

* IC 50 expresso como µg extrato mL⁻¹.

Dados reportados na literatura também sugerem que extratos obtidos mediante ESC podem não apresentar AA quando avaliada mediante DPPH, por exemplo, Mazzutti (2016) obteve valores de IC₅₀ entre 744 – 1300 µg mL⁻¹ para extratos obtidos de folhas de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*, Lasta (2017) para extratos obtidos a partir de resíduos de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (> 1500 µg mL⁻¹), Andrade (2015) para extratos obtidos a partir de (*Piper nigrum*) (> 1000 µg mL⁻¹) e também Oliveira (2015) para extratos obtidos a partir de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) (3258 – 17323 µg mL⁻¹).

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes na AA, para a técnica ESC, avaliada mediante IC₅₀, o diagrama de Pareto (Figura A-IV 1, Apêndice IV), mostra que ambos fatores pressão e temperatura tiveram efeito negativo, isso é um aumento na pressão e na temperatura produz uma diminuição do IC₅₀ e portanto uma maior AA.

4.4.1.1.2 ESC com cossolventes

Os valores de IC50 para os extratos obtidos partir de FG mediante ESC com adição de diferentes cossolventes (Tabela 28) apresentaram AA em função do cossolvente usado. Assim quando usados solventes mais polares, isso é, água e mistura etanol – água, os extratos apresentaram AA leve. Porém quando usado etanol, os extratos não apresentaram AA.

Tabela 28. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos mediante ESC e cossolventes.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	IC50 ^a
ESC	CO ₂ - Água	150	45	168 ± 3 ^b
		250	45	160,9 ± 0,4 ^b
		150	75	115 ± 4 ^{ef}
		250	75	109 ± 4 ^f
	CO ₂ - Etanol	150	45	1836,1 ± 0,1 ^a
		250	45	1452 ± 1 ^c
		150	75	2765 ± 5 ^a
		250	75	1371 ± 24 ^d
CO ₂ / (Etanol / Água (1:1, v/v))		200	60	142 ± 7 ^{eg}

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

* IC 50 expresso como µg extrato mL⁻¹.

O efeito positivo na AA do etanol quando usado como cossolvente, tem sido reportado na literatura. Por exemplo, Mazzutti (2016) usando diferentes proporções de etanol (2,5; 5 e 10 %), aprimorou os valores de AA nos extratos obtidos de folhas de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*. Também, Lasta (2017) usando cossolvente etanol (10 %) na obtenção de extratos a partir de resíduos de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Andrade (2017) para obtenção de extratos a partir de (*Piper nigrum*) usando diferentes proporções de etanol (2,5; 5 e 7,5 %) e também Oliveira (2015) para extratos obtidos a partir de semente de maracujá (*Passiflora edulis*) com cossolvente etanol (5%). Porém todos os valores de IC50 nesses estudos foram maiores de 200 µg mL⁻¹, isso é os extratos não apresentaram AA.

Outros cossolventes também não tem permitido obter IC50 menores do que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, por exemplo, Mazzutti (2016) usou metanol (5%) e Lasta (2017) usou a mistura de etanol – água (90:10).

No presente estudo, os extratos obtidos com a mistura etanol – água como cossolvente, permitiram obter valores de IC50 menores a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, isso é os extratos apresentaram AA leve. Isso pode ser devido a que as proporções da água na mistura etanol – água no presente estudo (1:1, v/v) foram superiores às usadas por Lasta (2017), assim a água é o cossolvente que permite obter melhores valores de AA.

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes na AA, para a técnica ESC + cossolvente, avaliada mediante IC50, o diagrama de Pareto (Figura A-IV 2, Apêndice IV), mostrou que a pressão e principalmente o cossolvente tiveram efeito negativo, isso é um aumento na pressão e na polaridade do solvente produz uma diminuição do IC50 e portanto uma maior AA. A temperatura teve um efeito positivo no IC50, isso é afeta negativamente o valor de AA.

4.4.1.1.3 ELP

Os valores de IC50 para os extratos obtidos partir de FG mediante ELP com diferentes solventes (Tabela 29) apresentaram AA em função do solvente usado. Assim quando usados solventes mais polares, isso é, água e mistura etanol – água, os extratos apresentaram AA leve. Porém quando usado etanol, os extratos não apresentaram AA.

O efeito positivo na AA quando usada água como solvente na ELP foi reportado por Mazzutti (2016), reportou valores de IC50 entre $21 - 108 \mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos obtidos com água a partir de folhas de *Plantago major* e *Plantago lanceolata*, contudo Lasta (2017) obteve melhores resultados quando usado etanol ($58 - 65 \mu\text{g mL}^{-1}$) para extratos obtidos a partir de resíduos de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Diferenças podem ser devido ao tipo de composto presente em cada matriz.

Quando avaliados os fatores que se mostraram relevantes na AA, para a técnica ELP, avaliada mediante IC50, o diagrama de Pareto (Figura A-IV 3, Apêndice IV), mostrou que a temperatura e principalmente o solvente (polaridade) tiveram efeito negativo, isso é um aumento na polaridade e na temperatura do solvente produz uma diminuição do IC50 e portanto uma maior AA.

Tabela 29. Atividade antioxidante mediante método DPPH dos extratos de FG obtidos por líquido pressurizado.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	IC50 ^a
ELP	Etanol	100	45	813 ± 12 ^a
		100	60	693 ± 2 ^b
		100	73	594 ± 18 ^c
	Etanol / Água (1:1, v/v)	100	45	386 ± 1 ^d
		100	60	167 ± 9 ^f
		100	73	161 ± 2 ^f
	Água	100	45	175,4 ± 0,2 ^f
		100	60	131 ± 1 ^e
		100	73	165 ± 1 ^{ef}

* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

* IC 50 expresso como µg extrato mL⁻¹.

Quando comparados todos os extratos obtidos das diferentes técnicas, se observa que 4 % dos extratos apresentaram AA moderada, 32 % AA leve, 57 % não apresentam AA e nenhum dos extratos apresenta AA forte.

Quando comparados com os resultados obtidos para outras espécies *Ilex* (Tabela 30), os extratos de FG comparados com extratos de *I. paraguariensis* apresentam maior ou similar AA, pois Aguiar et al. (2012) e Boaventura (2013) reportaram valores de IC50 entre 120 - 127 µg mL⁻¹, menores quando comparadas com extratos aquosos de *I. brasiliensis*, com valores de IC50 de 8,6 µg mL⁻¹ e também menor ao valor obtido para *I. paraguariensis* 7,7 µg mL⁻¹ reportado por Schinella et al. (2009). Também maior AA quando comparada com extratos obtidos de *I. kudingcha* com vários solventes, pois, Liu et al. (2009) reportaram valores de IC50 entre 265 - 3156 µg mL⁻¹.

Tabela 30. Atividade antioxidante (AA) reportada para espécies *Ilex* aplicando metodologia do radical DPPH.

Espécie vegetal	Partes usadas /tratamento	Solvente	IC50	Fonte
<i>I. guayusa</i>	Folha verde	Etanol	17,5	Jara et al. (2013)
	Folha verde	Acetato de etila	52,7	
	Folha verde	Metanol	115 ⁺	Pardau (2016)
	Folha preta	Metanol	199 ⁺	
	Folha verde	Metanol/água (70:30, v/v)	330 ⁺	Garcia et al. (2017)
	Folha escaldada	Metanol/água (70:30, v/v)	354 ⁺	
	Folha fermentada	Metanol/água (70:30, v/v)	197 ⁺	
	Folha nova (2 meses)	Acetona 70%	162 ⁺	Villacís-Chiriboga et al. (2018)
	Folha velha (6 meses)	Acetona 70%	125 ⁺	
<i>I. paraguayensis</i>	Folha	Água	7,7	Schinella et al. (2009)
	Casca	Água	120	Aguiar et al. (2012)
<i>I. brasiliensis</i>	Folha	Água	127	Boaventura et al. (2013)
	Folha	Água	8,6	Schinella et al. (2009)
<i>I. kudingcha</i>	Extrato aquoso	Acetato de etila	265	Liu et al. (2009)
	Extrato aquoso	n-Butanol	3156	
	Extrato aquoso	Água	892	

IC50 expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

* AA expressa em $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$.

Quando é avaliada a correlação entre CFT e IC50 (Figura A-V 2 Apêndice V), observa-se uma correlação negativa entre CFT e IC50, isso significa que quanto maior for o valor de CFT menor será o valor de IC50, resultando em maior AA, porém o valor de R^2 para o caso de ajuste de correlação foi baixo (0,43).

4.5 VARIAÇÃO DE CFT E AA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

A variação de CFT e AA (ABTS, e DPPH) em função do tempo de extração na técnica ELP (Tabela 31 e Figura 26), foi efetuada usando como solvente a mistura etanol/água (1:1 v/v) a 73 °C, que permitiu obter os melhores valores tanto em CFT como em AA.

Tabela 31. Variação de CFT, AA (ABTS e IC50) em função do tempo, para técnica ELP com solvente etanol/água (1:1 v/v) e 75 °C.

t [min]	CFT ^{*,**}	ABTS ^{***}	IC50 ^{*,****}
5	21 ± 0,3 ^a	76 ± 4 ^a	170 ± 3 ^a
10	8,2 ± 0,5 ^b	30 ± 1 ^b	155 ± 2 ^b
15	3,8 ± 0,4 ^c	28 ± 1 ^b	151 ± 1 ^b

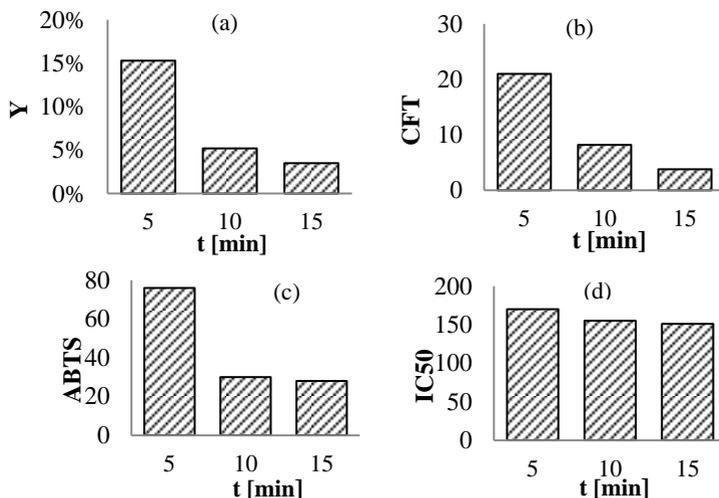
* Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

** CFT expresso como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FG seca.

*** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como μmol Trolox g⁻¹ FG.

**** IC 50 expresso como μg extrato mL⁻¹.

Figura 25. Variação de rendimento global de extração Y (a), CFT (b), AA (ABTS (c) e IC50 (d) em função do tempo, para técnica ELP com solvente etanol/água (1:1 v/v) e 75 °C.



CFT expresso como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FG seca.

Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) usando ABTS expressa como μmol Trolox g⁻¹ FG.

IC 50 expresso como μg extrato mL⁻¹.

Observou-se uma tendência decrescente para todos eles (Y, CFT, ABTS e IC50). A maior redução foi após os primeiros 5 min de extração, pois aproximadamente 60 % dos valores de Y, CFT e ABTS foram obtidos nos primeiros 5 min. Para a IC50, a redução foi mínima (aproximadamente 8 %), e pode ser devido ao fato que nos primeiros minutos foi extraído o soluto exposto na camada externa.

A partir das análises de AA, observou-se que todos os extratos de FG apresentaram AA quando avaliados mediante ABTS e um 32 % do total dos extratos apresentaram AA quando avaliados mediante DPPH. A AA depende das características/propriedades do solvente e do processo de extração aplicado, contudo é necessário analisar com mais detalhe os compostos presentes em cada extrato, pois o tipo de composto majoritário no extrato define o potencial aproveitamento/isolamento para aplicação em alimentos ou fármacos.

4.6 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS

A seguir apresentam-se os resultados obtidos da análise dos extratos de FG mediante técnica CG-MS e CLAE. As duas técnicas permitiram obter o perfil químico abrangendo, compostos leves e pesados. A comparação com outros resultados é limitada, pois pesquisas aplicando essas técnicas para extratos de FG são escassas.

4.6.1 Análise mediante cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS)

Na Tabela 32 são apresentados os compostos presentes nos extratos obtidos mediante técnicas Soxhlet e maceração usando solventes hexano, acetato de etila e etanol, bem como os obtidos mediante técnica ESC e ESC com cossolvente etanol. Foram escolhidos os compostos que apresentaram maior porcentagem relativa de área, isso é aqueles que estão presentes em maiores quantidades no extrato.

Os grupos de compostos presentes nos extratos foram: metilxantinas, terpenos e alcanos, esses grupos têm sido reportados em FG (BLUM-SILVA et al., 2015; CARPINTERO, N.; SALAZAR, M., 2014; COLÔMBIA, 2008; CHIANESE et al., 2018; DUEÑAS et al., 2013; FERREIRA et al., 2012; LEWIS et al., 1991; RADICE e VIDARI, 2007; RUSSO et al., 2009; WILSON e VERPOORTE, 2012) bem como em outras espécies do gênero *Ilex* (HAO et al., 2013; YI et al., 2016; YUAN et al., 2017) e principalmente na erva-mate (BLUM-

SILVA et al., 2015; ESMELINDRO et al., 2004; ESMELINDRO et al., 2005; ISOLABELLA et al., 2010; JACQUES et al., 2006 ; JACQUES et al., 2007; MURAKAMI et al., 2013; PAGLIOSA et al., 2010). Para todos os extratos no presente estudo, o composto com maior porcentagem de área relativa nos cromatogramas (Figura AVI.1 Apêndice VI) foi cafeína, seguido de esqualeno e α -amirina, exceto no caso dos extratos obtidos mediante técnicas convencionais como Soxhlet e maceração quando utilizado solvente hexano, nesse caso o composto majoritário foi o esqualeno e a cafeína ficou em segundo lugar.

Nas técnicas convencionais observou-se a seletividade em função da polaridade do solvente usado. Por exemplo, quando usado solvente hexano, para as técnicas Soxhlet e maceração, foram extraídos maior número de compostos, porém em menores quantidades quando comparados à extração com etanol e acetato de etila que permitiram principalmente a extração de cafeína.

Tabela 32. Perfil químico determinado mediante CG-MS dos extratos de FG obtidos aplicando técnicas Soxhlet e maceração utilizando solventes hexano, acetato de etila e etanol, técnica ESC e técnica ESC com cossolvente etanol.

RT (min)	Composto	Grupo	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	% área relativa																		
				Soxhlet			Maceração			ESC						ESC com cossolvente etanol						
				Hexano	Ac. etila	Etanol	Hexano	Ac. etila	Etanol	T:45			T:60			T:75			T:45		T:75	
						P:150	P:200	P:250	P:150	P:200	P:250	P:150	P:200	P:250	P:150	P:250	P:150	P:250				
14.71	Cafeína	M	194.1906	17.51	86.68	94.31	14.12	51.04	87.75	55.75	58.24	66.43	63.13	66.38	63.02	57.32	77.71	73.11	90.17	60.41	90.85	84.29
28.73	Esqualeno	T	410.718	23.11	8.45	4.43	35.38	n.d.	9.22	31.39	25.97	22.99	21.11	24.61	14.27	35.06	18.4	18.07	4.76	9.64	5.78	9.57
36.24	α -Amirina	T	426.7174	2.44	0.82	n.d.	2.65	3.46	n.d.	3.39	3.75	2.4	1.68	2.32	1.52	1.11	1.01	1.91	1.04	1.04	0.65	1.01
9.73	α -Guaiene	T	204.3511	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.73	n.d.	n.d.	n.d.	0.47	n.d.	0.22	0.17	0.12	n.d.	0.19	n.d.	0.32	n.d.	0.13
5.14	Undecano	A	156.3083	1.14	n.d.	n.d.	0.65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6.46	Dodecano	A	170.3348	1.9	n.d.	n.d.	1.59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7.79	Tridecano	A	184.3614	2.25	n.d.	n.d.	2.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9.09	Tetradecano	A	198.388	1.75	n.d.	n.d.	1.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9.88	Hexadecano	A	226.4412	n.d.	n.d.	n.d.	1.86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10.34	Pentadecano	A	212.4146	1.69	n.d.	n.d.	1.45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

RT: tempo de retenção

n.d: não detectado

M: metilxantinas

T: terpenos

A: alcanos

Para o caso das técnicas de alta pressão, observou-se uma elevada seletividade dependendo da pressão, temperatura e cossolvente aplicado. Por exemplo, na ESC se o objetivo for extrair cafeína, a combinação de pressão e temperatura que permitiu obter maior porcentagem relativa de área (66,3 %) foi 200 bar e 60 °C, mas se o objetivo for o esqualeno, as melhores condições foram 150 bar e 35 °C (35,06 %).

A influência da combinação de pressão, temperatura e cossolvente na seletividade da ESC pode ser observada nas isotermas de extração da cafeína (Figura A-VIII 1, Figura A-VIII 2, Apêndice VIII).

Para o caso da cafeína, o ponto de cruzamento ficou na vizinhança de 160 bar. À direita desse ponto mantendo uma pressão constante a solubilidade da cafeína no CO₂ supercrítico que aumenta com a temperatura.

À esquerda do ponto de cruzamento o comportamento é oposto, isso é, a solubilidade da cafeína diminui com o aumento da temperatura. Esse comportamento ocorre devido à predominância do efeito da pressão de vapor do soluto ou da densidade do solvente.

Esse comportamento na cafeína também foi observado por Saldaña et al. (1999) e Brunner (1994). A maior porcentagem relativa de área (77,7 %) foi obtida quando à pressão constante (200 bar) incrementa-se a temperatura até 75 °C.

A adição de etanol melhorou notavelmente a solubilidade/seletividade da cafeína, observou-se também que o ponto do cruzamento das isotermas deslocou-se para a vizinhança de 200 bar e houve novamente o comportamento retrógrado á direita e esquerda desse ponto.

Quando usado etanol como cossolvente, a maior solubilidade de cafeína foi observada para 250 bar e 75 °C (90,85 % área), assim como a 45 °C e 150 bar (90,17 % relativa de área). O comportamento favorável da adição de etanol para a remoção seletiva de cafeína foi reportado por SUN et al. (2010).

4.6.2 Análise mediante cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos analisados mediante técnica CLAE (Tabela 33) mostraram que os teores de cafeína, teobromina e ácido 5-cafeoilquínico variaram dependendo da técnica/condições ou solvente aplicado.

Tabela 33. Perfil químico determinado mediante CLAE dos extratos de FG obtidos aplicando técnicas Soxhlet, maceração, ESC e ELP usando cossolventes/solventes: etanol, mistura etanol/ água (1:1, v/v) e água.

Técnica	Solvente/ Cossolvente	Condições P[bar], T [°C]	Compostos [mg g ⁻¹ extrato] ^a		
			Cafeína	Teobromina	A5COQ
Soxhlet	Etanol	atm. ; 61	70 ± 1 ^a	1,07 ± 0,07 ^b	5 ± 1 ^a
	Etanol - Água	atm. ; 73	31 ± 17 ^b	0,73 ± 0,06 ^b	7 ± 4 ^a
	Água	atm. ; 79	30 ± 9 ^b	0,68 ± 0,08 ^b	7 ± 3 ^a
Maceração	Etanol	atm. ; 18	N.D.	N.D.	N.D.
	Etanol - Água	atm. ; 18	19,1 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,1 ^a
	Água	atm. ; 18	54 ± 16 ^b	0,93 ± 0,08 ^b	3,8 ± 0,8 ^a
ESC	CO ₂ / Água	150 ; 45	31 ± 27 ^b	0,99 ± 0,09 ^b	4 ± 2 ^a
		250 ; 45	61 ± 2 ^a	0,98 ± 0,02 ^b	1,2 ± 1,1 ^a
		150 ; 75	66 ± 17 ^b	1,0 ± 0,1 ^a	3 ± 1 ^a
		250 ; 75	30 ± 8 ^a	0,52 ± 0,03 ^b	1,2 ± 0,3 ^a
	CO ₂ / Etanol	150 ; 45	135 ± 64 ^a	1,5 ± 0,9 ^b	5 ± 3 ^a
		250 ; 45	61 ± 14 ^a	1,2 ± 0,7 ^a	4 ± 2 ^a
		150 ; 75	66 ± 1 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	1 ± 0,5 ^a
		250 ; 75	57 ± 6 ^a	1,4 ± 0,8 ^a	11 ± 5 ^a
	CO ₂ / (Etanol/ Água)	100 ; 60	28 ± 23 ^b	0,5 ± 0,2 ^b	1,3 ± 0,8 ^a
		100 ; 45	9 ± 9 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,5 ^a
ELP	Etanol	100 ; 60	95 ± 90 ^b	1,0 ± 0,6 ^a	1,9 ± 0,1 ^a
		100 ; 75	136 ± 64 ^a	2 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a
		100 ; 45	N.D.	N.D.	N.D.
	Etanol / Água	100 ; 60	51 ± 38 ^b	0,6 ± 0,3 ^b	4 ± 2 ^a
		100 ; 75	28 ± 28 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	3 ± 1 ^a
Água	100 ; 45	50 ± 36 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	4 ± 2 ^a	
	100 ; 60	62 ± 8 ^b	0,66 ± 0,01 ^b	5,4 ± 0,1 ^a	
		100 ; 75	53 ± 31 ^a	0,9 ± 0,5 ^a	4,5 ± 0,4 ^a

^a Tratamentos com letras iguais na mesma coluna, são considerados iguais entre si, ou seja, as médias não diferem estatisticamente entre elas (p<0,05).

ESC: extração supercrítica

ELP: extração por líquido pressurizado

A5COQ: ácido 5-cafeoilquinico

N.D.: Não detectado

Entre as metilxantinas, a cafeína apresentou maiores teores, variando entre 9 - 135 mg g⁻¹. O maior teor de cafeína foi obtido com a técnica ESC quando usado etanol como cossolvente a 100 bar e 75 °C e na técnica ELP a 45 °C. A teobromina apresentou valores entre 0,52 - 2 mg g⁻¹. O maior valor de teofilina foi obtido para a técnica ELP quando usado solvente etanol (100 bar, 75 °C).

O ácido 5-cafeoilquínico apresentou valores entre 0,9 – 11 mg g⁻¹. O melhor valor foi obtido para a técnica ESC/etanol (250 bar, 75 °C).

O elevado desvio padrão que alguns resultados apresentaram pode ser devido a que, para realizar a análise CLAE foi necessário coletar extratos de várias extrações, nas mesmas condições e com os mesmos solventes, para poder atingir a massa de extrato mínima necessária (0,5 g) para essa análise.

Para espécies *Ilex*, valores reportados na literatura (Tabela 34) de cafeína, teofilina e ácido 5-cafeoilquínico são variados e dependentes das técnicas, solvente e parâmetros de extração, além do pré-tratamento e idade das folhas. Porém, esses dados foram obtidos mediante diferentes técnicas de análise, alguns mediante CG-MS e outros mediante técnica CLAE. Nenhuma das pesquisas tem avaliado simultaneamente os três compostos: cafeína, teobromina e ácido 5-cafeoilquínico.

Por exemplo, a maioria dos teores de cafeína obtidos no presente estudo, foram inferiores quando comparados com os reportados por Esmelindro et al. (2004) para extratos obtidos mediante ESC (30 °C e 175 bar) a partir de folhas de erva mate. Deve-se considerar que as amostras usadas por esses autores foram obtidas em diferentes condições de intensidade de luz (alta e baixa), método de secagem (micro-ondas e vácuo), idade das folhas (6 meses 12 meses) e fases do processo da erva mate.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos reportados para extratos obtidos mediante infusão aquosa de folhas de erva-mate com idades entre 1 - 6 meses e analisados mediante CLAE (BLUM-SILVA et al, 2015), e também aos reportados por Jacques et al. (2008), que avaliaram extratos de folhas de erva-mate obtidos mediante ELP, para diferentes combinações de tempo de extração, massa de amostra, ciclos extração e aplicando solventes metanol e hexano.

Outros valores de cafeína reportados na literatura para extratos de erva-mate são apenas referenciais, pois diferem na técnica de análise. Por exemplo, extratos aquosos de folhas de erva-mate analisados mediante CLAE reportados por Boaventura et al. (2013) e Murakami et al. (2013) expressaram valores de cafeína em mg mL⁻¹.

Tabela 34. Teores de cafeína (C), teobromina (T) e ácido 5-cafeoilquínico (A5COQ) reportados para extratos de *I. guayusa* e outras espécies *Ilex*.

Espécie	Partes usadas /tratamento	Solvente	C	T	A5COQ	Fonte	
<i>I. guayusa</i>	Folha verde	Metanol-água (70:30, v/v)	n.a.	n.a.	24,1	Garcia et al. (2017)	
	Folha escaldada	Metanol-água (70:30, v/v)	n.a.	n.a.	26,5		
	Folha fermentada	Metanol-água (70:30, v/v)	n.a.	n.a.	7,5		
	Folha nova (2 meses)	Acetona 70%	n.a.	n.a.	7,6	Villacis - Chiriboga et al. (2018)	
	Folha velha (6 meses)	Acetona 70%	n.a.	n.a.	6,5		
<i>I. paraguariensis</i>	Folha	Água	12	n.a.	20	Schinella et al. (2009)	
	(intensidade de luz alta)		58,9	0,31	n.a.	Esmelindro et al. (2004)	
	(intensidade de luz baixa)		198,7	1,81	n.a.		
	Folha (6 meses)		350,9	4,14	n.a.		
	Folha (12 meses)	CO ₂ , 30°C, 17,5 MPa	42,3	0,11	n.a.		
	Folha (18 meses)		88,4	0,73	n.a.		
	Folha (24 meses)		105,5	0,39	n.a.		
	Folha (secagem por microondas)		159,4	1,38	n.a.		
	Folha (secagem vácuo)		65,9	0,4	n.a.		
	Folha crua		116	4,9	n.a.		
	Folha sapecada	CO ₂ , 35°C, 20 MPa	99	n.d.	n.a.		Esmelindro et al. (2005)
	Folha seca		88-130	1-3	n.a.		
	Folha armazenada		155-161	3,3-3,8	n.a.	Blum-Silva et al. (2015)	
	Folha (1 mês)		75,6	9,2	n.a.		
	Folha (2 meses)	Água	60,1	12,4	n.a.		
	Folha (6 meses)		31,9	4,9	n.a.		
	Folha	Água	0,89*	0,042*	0,105*		Boaventura et al. (2013)
	Folha	ELP, Hexano, 50 °C	0,03-0,9	n.a.	n.a.		Jacques et al. (2008)
		ELP, Hexano, 100 °C	0,9-8,3	n.a.	n.a.		
		ELP, Metanol 50 °C	0,2-2,5	n.a.	n.a.		
	ELP, Metanol 100 °C	0,8-6,0	n.a.	n.a.			
Folha (extrato)		1,3	0,05	n.a.	Murakami et al. (2013)		
Folha (concentrado)	Água	3,1	0,2	n.a.			
Folha	CO ₂ , 35°C, 10 MPa, 40% Etanol	n.a.	n.a.	16,6	GRUJIC et al. (2012)		
	CO ₂ , 35°C, 10 MPa, 50% Etanol	n.a.	n.a.	16,1			
	CO ₂ , 35°C, 10 MPa, 60% Etanol	n.a.	n.a.	15,2			
<i>I. brasiliensis</i>	Folha	Água	0	n.a.	14	Schinella et al. (2009)	

Todos os valores expressos em mg g⁻¹; * Valores expressos em mg mL⁻¹.
n.a. Não analisado.

No que tange à teobromina, os valores obtidos no presente estudo são semelhantes aos reportados na literatura, por exemplo, por Esmelindro et al. (2005) quando avaliaram a teobromina nas diferentes etapas de beneficiamento da erva mate. Também semelhantes aos resultados reportados por Esmelindro et al., (2004) para extratos obtidos com ESC (30 °C, 175 bar).

Para o composto fenólico ácido 5-cafeoilquínico, os valores obtidos no presente estudo são semelhantes aos valores reportados por Villacís-Chiriboga et al. (2018) para extratos obtidos a partir de FG jovens (2 meses de idade) e FG velhas (6 meses de idade). Porém os valores obtidos no presente estudo são inferiores aos reportados por Garcia et al. (2017) para extratos de FG verdes e escaldadas; contudo semelhante ao valor reportado pelos mesmos autores para o caso de FG fermentadas.

Os resultados de ácido 5-cafeoilquínico obtidos nesse trabalho também são menores quando comparados aos resultados reportados por GRUJIC et al. (2012) para extratos obtidos a partir de *Ilex paraguariensis*, obtidos mediante técnica ESC com etanol, (50-100 bar, 40 – 60 % etanol).

Diferenças entre estudos podem ser atribuídas aos diferentes solventes, matéria prima, técnicas de extração, tempo de extração, pré-tratamento da matéria prima.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Quando avaliada a atividade antimicrobiana mediante a concentração inibitória mínima (CIM⁴) dos extratos de FG (Tabela 24), observou-se que nenhum dos extratos obtidos apresentou atividade antibacteriana, até a concentração de 1000 µg mL⁻¹ (CIM > 1000).

Contudo, a maioria dos extratos apresentaram atividade antifúngica, com MIC igual a 1000 µg mL⁻¹, entretanto nenhum dos extratos apresentou atividade contra *A. fumigatus*, *Rhizopus sp* e *C. albicans* (CIM > 1000).

Os extratos de FG obtidos mediante técnica Soxhlet usando solvente acetato de etila e etanol, os extratos obtidos ESC (60 °C, 150 e 200 bar), a técnica ESC com cossolvente etanol (75 °C, 150 e 250 bar) e

⁴ Quanto menor for o valor de CIM, maior atividade antimicrobiana apresenta o extrato.

a técnica PLE usando etanol a 45 °C apresentaram a melhores resultados de atividade antifúngica (CIM = 250 µg mL⁻¹) contra o *T. rubrum*.

Observou-se atividade antifúngica dos extratos principalmente contra *T. rubrum*, pois 86 % dos extratos apresentaram CIM entre 250 - 1000 µg mL⁻¹, contra *M. canis* onde 73 % dos extratos apresentaram CIM entre 500 - 1000 µg mL⁻¹, contra *T. mentagrophytes* onde 70 % dos extratos apresentaram CIM entre 500 - 1000 µg mL⁻¹, contra *M. gypseum* onde 54 % dos extratos apresentaram CIM entre 500 - 1000 µg mL⁻¹ e finalmente contra *E. floccosum* onde 11 % dos extratos apresentaram CIM igual a 1000 µg mL⁻¹. Esses microrganismos são fungos dermatófitos que podem se desenvolverem na pele, unhas e cabelo, e tem apresentado resistência aos antifúngicos.

As técnicas ESC, maceração e Soxhlet apresentaram melhores resultados de atividade antifúngica. Para o caso da maceração 45 % dos extratos obtidos com esta técnica apresentaram CIM entre 250 - 1000 µg mL⁻¹, para a ESC 44 % dos extratos obtidos com esta técnica apresentaram CIM entre 250 - 1000 µg mL⁻¹ e a técnica Soxhlet 43 %. Apenas 18% dos extratos obtidos com a técnica ELP apresentaram atividade antifúngica.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com os reportados por Ruiz e Roque (2009) que reportaram atividade antifúngica contra *Microsporium canis* para os extratos obtidos a partir de FG usando metanol / água. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo diferem dos apresentados por esses mesmos autores que acharam atividade antifúngica contra *Candida albicans* para os extratos de FG obtidos com etanol / água e metanol.

Também para outras espécies Ilex, tem sido reportada atividade antibacteriana. Por exemplo, para extratos de erva mate, contra *Escherichia coli*, *S. aureus* (HAO et al., 2013), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Helicobacter pylori*. Para o caso do extrato aquoso de erva-mate tem sido reportada atividade antifúngica contra *Malassezia furfur* (YI et al., 2016), porém para os extratos obtidos no presente estudo não foi detectada atividade para bactérias representantes dos grupos Gram positivo e Gram negativo.

As diferenças podem ser atribuídas às diferentes metodologias aplicadas na determinação de atividade antimicrobiana. Por exemplo, Ruiz e Roque (2009) usaram extratos em concentrações 1000 vezes superiores. Também as diferenças podem ser atribuídas aos diferentes

solventes e técnicas de extração usados em cada estudo, bem como a região geográfica e tempo de colheita das folhas.

Tabela 35. Concentração mínima inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra fungos e bactérias para extratos de FG obtidos com diferentes técnicas de extração.

Técnica	P (bar)	T (°C)	Solvente/ Cossolvente	Fungos							
				<i>A. fumigatus</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	
Soxhlet	1	54	Hexano	≧ 1000	≧ 1000	500	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	1000	
	1	59	Acetato Etíla	≧ 1000	1000	500	≧ 1000	≧ 1000	1000	250	
	1	61	Etanol	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	1000	250	
	1	73	Etanol/Água	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	1000	500	
	1	79	Água	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
Maceração	1	18	Hexano	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
	1	18	Acetato Etíla	≧ 1000	≧ 1000	500	500	≧ 1000	500	1000	
	1	18	Etanol	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	
	1	18	Etanol/Água	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	500	1000	
	1	18	Água	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
ESC	150	45	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
	200	45	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	500	
	250	45	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	1000	500	
	150	60	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	1000	250	
	200	60	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	1000	250	
	250	60	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	500	500	≧ 1000	1000	1000	
	150	75	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	> 1000	1000	
	200	75	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	1000	500	≧ 1000	1000	1000	
	250	75	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	1000	1000	
	250	75	CO ₂	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	1000	1000	
ESC / cossolvente	150	45	CO ₂ /água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	500	
	250	45	CO ₂ /água	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
	150	75	CO ₂ /água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
	250	75	CO ₂ /água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	1000	
	150	45	CO ₂ /etanol	≧ 1000	1000	500	1000	≧ 1000	1000	1000	
	250	45	CO ₂ /etanol	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	500	
	150	75	CO ₂ /etanol	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	1000	250	
	250	75	CO ₂ /etanol	≧ 1000	1000	500	1000	≧ 1000	500	250	
	200	60	CO ₂ /etanol/água	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	1000	1000	
	ELP	100	45	Etanol	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	≧ 1000	1000	250
		100	60	Etanol	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	> 1000	500
		100	75	Etanol	≧ 1000	≧ 1000	500	1000	≧ 1000	> 1000	500
100		45	Etanol/Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
100		60	Etanol/Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
100		75	Etanol/Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
100		45	Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	1000	
100		60	Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
100		75	Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
100		75	Água	≧ 1000	≧ 1000	≧ 1000	1000	≧ 1000	> 1000	> 1000	
-			Caféina	1000	500	250	500	≧ 1000	500	-	
			Cet	8	0,5	8	8	8	8	4	
			Cip	-	-	-	-	-	-	-	

Cet: Cetoconazol

Cip: Ciprofloxacino

Embora tenha sido reportada atividade antimicrobiana, citotoxicidade e atividade mutagênica da cafeína (ANAYA; CRUZ-ORTEGA; WALLER, 2006; HAO et al., 2013), não foi detectada atividade antimicrobiana para a cafeína pura, e não houve correlação entre os teores de cafeína e a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, maiores teores de cafeína não apresentaram o mesmo comportamento obtido para a cafeína pura, por exemplo o maior valor de cafeína foi obtido para ESC usando etanol como cossolvente (150 bar e 45 °C) que apresentou atividade moderada contra *M. canis* e para o caso da cafeína que apresentou boa atividade antifúngica contra *E floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

Isso provavelmente devido a que foram outros compostos presentes nos extratos de FG, os responsáveis pela atividade antifúngica. Esses outros compostos não foram identificados/detectados mediante as análises aplicadas no presente trabalho.

De maneira geral, quando comparados os resultados obtidos nas variáveis de saída (rendimento (Y %), CFT, atividade antioxidante (ABTS, DPPH), análise GC-MS (% área correspondente à cafeína, esqualeno e α -amirina), análise CLAE (teor de compostos: cafeína, teobromina e ácido 5-cafeoilquínico) e atividade antifúngica), para os extratos de FG obtidos mediante as diferentes técnicas de extração, (Tabela 36), observou-se que solventes/cossolventes polares apresentaram melhores resultados no que tem a ver com Y, CFT e atividade antioxidante.

Os maiores rendimentos (Y %) foram obtidos para técnicas Soxhlet e ESC com cossolvente água, devido à elevada solubilidade dos compostos presentes nas FG em solventes polares.

Os extratos obtidos de FG quando usados solventes/cossolventes apolares apresentaram melhores resultados no que tem a ver com atividade antifúngica.

Tabela 36. Resumo dos resultados obtidos para extratos de FG aplicando diferentes técnicas de extração.

Técnica extração	Solvente	P [bar]	T [°C]	Y	CFT	AA		CG-MS			CLAE			A. antif.	
						ABIS	IC50	Caf	Esq.	α -Amirina	Caf	Teo	A5COQ		
Sx	Hexano	1	54	○	○	○	○	○	⊗	⊗				⊗	
	Acetato de etila	1	59	○	○	○	○	●	○	○				●	
	Etanol	1	61	○	○	⊗	⊗	●	○	○				○	
	Etanol + Água (1:1, v/v)	1	73	●	⊗	●	●	○	○	○	○	○	○	○	
	Água	1	79	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	
Mac	Hexano	1	18	○	○	○	○	○	●	⊗				○	
	Acetato de etila	1	18	○	○	○	○	●	○	●				⊗	
	Etanol	1	18	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	⊗	
	Etanol + Água (1:1, v/v)	1	18	○	○	⊗	●	○	○	○	○	○	○	⊗	
	Água	1	18	⊗	⊗	○	●	○	○	○	○	○	○	○	
ESC	CO2	150	45	○	○	○	○	○	○	●	●			○	
		200	45	○	○	○	○	⊗	⊗	○	○			○	
		250	45	○	○	○	○	⊗	⊗	○	○			○	
		150	60	○	○	○	○	⊗	⊗	○	○			○	
		200	60	○	○	○	○	⊗	⊗	○	○			○	
		250	60	○	○	○	○	⊗	⊗	○	○			○	
		150	75	○	○	○	○	○	●	○	○			○	
		200	75	○	○	○	○	○	○	○	○			○	
250	75	○	○	○	○	○	○	○	○			○			
ESC	CO2 + Água	150	45	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		250	45	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		150	75	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		250	75	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	CO2 + Etanol	150	45	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○
		250	45	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		150	75	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		250	75	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CO2 + (Etanol + Água (1:1, v/v))	200	60	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
ELP	Etanol	100	45	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	60	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	73	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	Etanol - Água (1:1, v/v)	100	45	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	60	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	73	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	73	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	Água	100	45	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	60	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		100	73	⊗	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

● Bons resultados.

⊗ Resultados intermediários.

○ Resultados baixos.

Observou-se elevada seletividade para o caso da técnica Soxhlet, quando usados solventes: acetato de etila e etanol, e para as técnicas ESC e ESC com cossolvente etanol.

A técnica ELP apresentou resultados intermediários de rendimento (Y %), CFT, atividade antioxidante (ABTS, DPPH) e baixa atividade antifúngica.

5 CONCLUSÕES

As FG mostraram ser uma fonte de cafeína, pois apresentaram maiores teores quando comparadas com outras espécies *Ilex*, e similares aos reportados para café.

Extratos de FG obtidos mediante técnicas de extração convencionais, Soxhlet e maceração, apresentaram bons resultados de rendimento global de extração, porém requerem longos períodos de extração.

A técnica de extração Soxhlet usando solvente água foi a melhor opção para obter elevados rendimentos na extração de FG.

A técnica Soxhlet, usando solvente acetato de etila ou etanol, permitiu obter extratos ricos em cafeína.

A técnica ESC com CO₂ apresentou os menores rendimentos globais de extração, porém apresentou elevada seletividade, permitindo obter extratos ricos em cafeína e/ou esqualeno.

O rendimento da técnica ESC de FG foi aprimorada quando foram usados cossolventes polares.

Quando usado cossolvente etanol na técnica ESC, a seletividade foi aprimorada, pois permitiu obter extratos ricos em cafeína.

A técnica ELP permite obter resultados, de rendimento de extração, tão bons quanto os melhores obtidos em técnicas tradicionais (Soxhlet e maceração) em tempos de extração curtos.

O maior rendimento de CFT para extratos de FG foi obtido com a técnica Soxhlet usando solvente água.

A técnica ESC não foi apropriada para obter extratos fenólicos a partir de FG, pois apresentou os menores valores de rendimento de CFT.

As técnicas ESC e ELP quando usados solventes/cossolventes do tipo polar, principalmente água, apresentaram elevados teores de CFT nos extratos obtidos a partir de FG.

Extratos de FG mostraram ser fontes de compostos com propriedades antioxidantes, principalmente os obtidos com solvente/cossolvente água e mistura etanol/água, pois os extratos mostraram AA quando avaliados mediante técnica dos radicais ABTS e DPPH.

Extratos de FG apresentaram boa atividade antifúngica para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis*, especialmente os extratos obtidos mediante técnica ESC e ESC/cossolvente.

Os principais constituintes do perfil químico dos extratos de FG avaliado mediante técnica GC-MS foram cafeína, esqualeno e α -amirina.

Os principais constituintes do perfil químico dos extratos de FG avaliado mediante técnica CLAE foram cafeína, teobromina e ácido 5-cafeoilquínico.

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar outras técnicas de extração, por exemplo, infusão, hidrodestilação, percolação, etc. para avaliar e comparar os resultados de a atividade biológica dos extratos obtidos.
- Otimizar mediante planejamento experimental os fatores temperatura, tempo, tipo de solvente, visando a obtenção de extratos com elevados CFT ou atividade antioxidante.
- Otimizar mediante planejamento experimental os fatores temperatura, tempo, concentração de cossolvente para a técnica extração ESC visando cafeína, esqualeno ou α -amirina.
- Testar outros solventes na técnica ELP, por exemplo, acetato de etila e misturas de etanol – água, em diferentes concentrações para avaliar as respostas: rendimento, compostos fenólicos e atividade antioxidante.
- Verificar a presença de outros compostos nos extratos obtidos de folhas de guayusa como, por exemplo, saponinas, teofilina, etc.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de folhas de guayusa mediante outras técnicas de análise, por exemplo, ORAC, FRAP, beta caroteno, etc.
- Avaliar outras atividades biológicas que poderiam apresentar os extratos obtidos a partir de FG, por exemplo, proteção solar, citotoxicidade, etc.
- Avaliar a atividade biológica *in vivo* dos extratos obtidos a partir de FG.
- Avaliar a atividade biológica de extratos obtidos a partir de FG submetidas a diferentes técnicas/processos de pré-tratamento, por exemplo, sapecado, secagem por micro-ondas, etc. e compará-las com outras espécies *Ilex*.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, F.; MICHELON, F.; GOMES, V.; BERTOLAZZI, S.; SCHWAMBACH, J.; MOURA, S. Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L.. **Scientia Chromatographica**, v. 9, p. 180-193, 2017.

AGUIAR, A.; SCHWINDEN E.; CASTANHO, R.; NEGRÃO, A.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J.; OGLIARI, P.; SANTOS, R. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

ALAM, N.; JAHAM, N.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALVARADO, E. **Guía técnica del cultivo de guayusa**. Quito: GIZ Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit, 2016. 102p.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry letters**, v. 10, p. 48-53, 2014.

ANAYA, A.; CRUZ-ORTEGA, R.; WALLER, G. Metabolism and Ecology of Purine Alkaloids. *Frontiers in Bioscience*, v. 11, p. 2354-2370, 2006.

ANDRADE, K. **Extração e Microencapsulamento de Extratos de Interesse Biológico Provenientes de Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.) e de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius* R.)**. 2015. 164f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459-464, 2005.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000

ANVISA. Resolução - RDC n° 360, de 23 de dezembro 2003. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, 2003.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. ed. Maryland: [s.n.].

ASHIHARA, H.; YOKOTA, T.; CROZIER, A. Purine Alkaloids, Cytokinins, and Purine-Like NeurotoxinAlkaloids. In: RAMAWAT, K.; MÉRILLON, J. **Natural Products, Phytochemistry, Botany andMetabolism of Alkaloids,Phenolics and Terpenes**. Heidelberg: Springer, 2013. p. 953-977.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.; RAHMAN, M.; SHARIF, K.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N.; OMAR, A. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

BAE, I.; HAM, H.; JEONG, M.; KIM, D.; KIM, H. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, 2015.

BAILEY, C.; DAY, C. Traditional Plant Medicines as Treatment for Diabetes. **Diabetes Care**, v.12, p. 553-564, 1989.

BANCO CENTRAL DEL ECUADOR-BCE. Sistema de información macroeconómica. Base de datos de comercio exterior. Quito, 14octubre 2015. Disponível em: <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/788>. Acesso em: 30agosto 2017.

BELANDRIA, V.; OLIVEIRA, P.; CHARTIER, A.; RABI, J.; OLIVEIRA, A.; BOSTYN, S. Pressurized-fluid extraction of cafestol

and kahweol diterpenes from green coffee. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 145-152, 2016.

BELITZ, H.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th edition, Berlin: Springer-Verlag, 2009. 1114p.

BENNETT, B. Hallucinogenic plants of the Shuar and related indigenous groups in Amazonian Ecuador and Peru. **Brittonia**, v. 44, n. 4, p. 483-493, 1992.

BIANCO, A.; SERRILLI, A.; VENDITTI, A.; PETITTO, V.; SERAFINI, M. Endemic Plants of Italy and Their Peculiar Molecular Pattern. In: RAHMAN, A. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 50, p. 215-244, 2016.

BLUM-SILVA, C.; CHAVEZ, V.; SCHENKEL, E.; COELHO, G.; REGINATTO, F. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 1-6, 2015.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.; COTTICA, S.; RODRIGUES, D. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1. ed. Curitiba: Appris, 2015. p.141.

BRAGHINI, F.; DE CARLI, C.; BONSAGLIA, B., DOS SANTOS, J.; DE OLIVEIRA, D.; TRAMUJAS, J.; BENEDETTI, I. Composição físico-química de erva-mate, antes e após simulação do Chimarrão. **Pesq. agrop. gaúcha**, v. 20, p. 7-15, 2014.

BOAVENTURA, B.; MURAKAMI, A.; PRUDÊNCIO, E.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F.; AMANTE, E.; AMBONI, R. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686-692, 2013.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its

antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. 2nd edition, Berlin: Springer-Verlag, 1994. 396p.

BRUNNER, G. Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. **J. Supercrit. Fluids** v. 47, p. 373–381, 2009.

CAF Banco de Desarrollo de América Latina, Noticias. CAF promueve la producción de guayusa para el desarrollo local en la Amazonia ecuatoriana. **Noticias CAF**, Caracas, 08junio 2011. Disponible em: <https://www.caf.com/es/actualidad/noticias/2011/06/caf-promueve-la-produccion-de-guayusa-para-el-desarrollo-local-en-la-amazonia-ecuatoriana->. Acceso em: 28março 2016.

CARANQUI, J.; HUMANTE, A. **Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (*Ilex guayusa* Loes) del Cantón Pastaza**. Herbario Escuela Superior Politecnica Del Chimborazo, Fundacion Runa Tarpuna, 2010.

CARPINTERO, N.; SALAZAR, M. Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto alcohólico foliar de Guayusa, *Ilex guayusa* Loes (Aquifoliaceae). **Tesis**, Msc- UPS- Quito 2014.

CASSEL, E.; VARGAS, R.; BRUN, G.; ALMEIDA, D.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v.100, p. 656-661, 2010.

CASTRO-VARGAS, H.; RODRÍGUEZ-VARELA, L.; FERREIRA, S.; PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 319-324, 2010.

CHANG, C.; WU, S.; YANG, P. High-pressure carbon dioxide and co-solvent extractions of crude oils from plant materials. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, p. 187-191, 2001.

Chankuap. ***Ilex Guayusa: manual de buenas prácticas de recolección para la cosecha de hojas***. Macas: Fundación Chankuap, 2014. 23p.

CHAIEB, I. Saponins as Insecticides: a Review. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 5, p. 39-50, 2010.

CHIANESE, G.; GOLIN-PACHECO, S.; TAGLIALATELA-SCAFATIA, O.; COLLADO, J.; MUNOZ, E.; APPENDINO, G.; POLLASTRO, F. Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté. **Food Research International**, v. x, p. x-x, 2018.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute 2009. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard M07-A10**. CLSI, Pennsylvania, 2015.

COELHO, M. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca do umbu (*Spondias tuberosa arruda*) obtidos por diferentes técnicas**. 2015. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COLÔMBIA. Ministerio de la Protección Social y Departamento de Farmacia. **Vademécum colombiano de plantas medicinales**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2008. 307p.

CONTERO, F.; ABDO, S.; VINUEZA, D.; MORENO, J.; TUQUINGA, M.; PACA, N. Estrogenic activity of ethanolic extracts from leaves of *Ilex guayusa* Loes and medicago sativa in *rattusnorvegicus*. **Pharmacology On Line**, v. 2, p. 95 - 99, 2015.

CUENCAHIGHLIFE. Ecuador's 'super tea' is gaining international popularity; it contains 50 % more anti-oxidants than green tea and as much caffeine as coffee. **CuencaHighLife**, Cuenca, 14 octubre 2015. Disponível em: <https://cuencahighlife.com/ecuadors-super-tea-is-gaining-international-popularity-it-contains-50-more-anti-oxidants-than-green-tea-and-as-much-caffeine-as-coffee/>. Acesso em: 28 março 2016.

De la TORRE, NAVARRETE, H.; MIRIEL, P.; MACÍA, J.; BASLEV, H. La etnobotánica en el Ecuador. In: **Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador**. Quito: Verbo, 2008. V. 1, p. 266-278.

De OLIVEIRA, D. **Aplicação de Tecnologias Supercrítica e Convencionais para o Reaproveitamento dos Resíduos do Processamento do Maracujá (*passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2015. 205f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DICKAU, R.; REDWOOD, S.; COOKE, R.A 4,000-year-old shaman's stone cache at Casita de Piedra, western Panama. **Archeological Anthropological Science**, V5 n 4, 2012.

DUEÑAS, J.; LOGAN, H.; STIMOLA, M.; MONTAGNINI, F.; HUMANATE, A.; MELICAN, N. Runa guayusa – desarrollo de un sistema de cultivo agroforestal de *Ilex guayusa* Loes. **Primer encuentro de bosques, recursos genéticos forestales y agroforestería**, Quito, 11-13 nov-2013.

DUEÑAS, J.; JARRET, C.; CUMMINS, I.; LOGAN-HINES, E. Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. **Economic Botany**, v20, p. 1-7, 2016.

EDWARDS, A.; BENNETT, B. Diversity of Methylxanthine content in *Ilex cassine* L. and *Ilex vomitoria* Ait.: Assessing sources of the North American stimulant Cassina. **Economic Botany**, v. 59, p. 275-285, 2005.

ENNEKING, D.; WINK, M. Towards the elimination of anti-nutritional factors in grain legumes, **Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century**, v. 34, p. 671-683, 2000.

ESMELINDRO, M.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; de OLIVEIRA, D. Efeitos do processamento na erva-mate. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, p. 193-204, 2002.

ESMELINDRO, A.; GIRARDI, J.; MOSSI, A.; JACQUES, R.; DARIVA, C. Influence of Agronomic Variables on the Composition of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*) Extracts Obtained from CO₂ Extraction at 30 °C and 175 bar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1990-1995, 2004.

ESMELINDRO, A.; TONIAZZO, G.; LOPES, D.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO₂ extraction at high pressures. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 588-592, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER M. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P.; BARON, E.; PFALLER, M.; TENOVER, F.; YOLKEN, R. **Manual of Clinical Microbiology**, 6th ed. Washington, ASM Press, V. 1, p. 1405-1414, 1995

ESPINOSA-PARDO, F.; MAYUMI, V.; MACEDO, G.; MACEDO, J.; MARTINEZ, J. Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 1-10, 2017.

ESPINOSA-PARDO, F.; MAYUMI, V.; ALVES MACEDO, G.; ALVES MACEDO, J.; MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 1-10, 2017.

EVANS, R. Fifteen years of study of psychoactive snuffs of south America: 1967-1982- a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 17 - 32, 1984.

FAN, J.; WU, Z.; ZHAO, T.; SUN, Y.; YE, H.; XU, R.; ZENG, X. Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 990-997, 2014.

FERREIRA, M.; GENDRON, F.; MC-CLURE, K.; KINDSCHER, K. North American bioactive plants for human health and performance. **Global Journal Research Medicinal Plants & Indigenous Medicine.**, v. 1, p. 568–582, 2012.

FRANKEL, E.; MEYER, S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal Science food agricultural**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

GARCIA, A.; BAENAS, N.; BENITEZ, A.; STINCO, C.; MELENDEZ, A.; MORENO, D.; RUALES, J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Accepted manuscript, March 2017.

GASPARETTO, A.; BELLA CRUZ, A. WAGNER, T.; BONOMINI, T.; CORREA, R.; MALHEIROS, A. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 256-263, 2017.

GHOSH, S.; JHA, S. Colchicine -an Overview for Plant Biotechnologists. In: RAMAWAT, K.; MÉRILLON J. **Bioactive Molecules and Medicinal Plants**, p. 1-24, 2008.

GIL-CHÁVEZ, J.; VILLA, J.; AYALA-ZAVALA, F.; HEREDIA, B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 5-23, 2013.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Catalogação na Câmara Brasileira do Livro, 1983.

GONZÁLEZ, J. Se exporta a EE.UU. guayusa para bebida energizante. **El Universo**, Guayaquil, 18 novembro 2013, notícias. Disponível em: <<http://www.eluniverso.com/noticias/2013/11/18/nota/1747491/se-exporta-eeuu-guayusa-bebida>>. Acesso em: 29 fevereiro 2016.

GRUJIC, N.; LEPOJEVIC, Z.; SRDJENOVIC, B.;VLADIC, J.; SUDJI, J.. Effects of Different Extraction Methods and Conditions on the Phenolic Composition of Mate Tea Extracts. **Molecules**, v. 17, p. 2518-2528, 2012.

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M.; HERRERA, R.; LABIDI, J.; GULLÓN, P. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 398-405, 2018.

HAO, D.; GU, X.; XIAO, P.; ZHANGUO, L.; XU, L.; PENG, Y. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, v3, p. 8-19, 2013.

HASSAS-ROUDSARI, M.; CHANG, P.; PEGG, R.; TYLER, R. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. **Food Chemistry**, v. 114, p. 717-726, 2009.

HE, H.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and Purification of Squalene from Amaranthus Grain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 368-372, 2002.

HOPKINS, W.; HÜNER, N. **Introduction to Plant Physiology** 4th edition, New Jersey: John Wiley&Sons, 2009. 523p.

IMBAQUINGO, O. El té de guayusa se exporta a EE.UU. El Comercio, Quito, 28 agosto 2010, negocios. Disponível em: <<http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/guayusaexportaeuu.html>>. Acesso em: 29 fevereiro 2016.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JARA, A.; RODRIGUEZ, Y.; CORNEJO, J.; CAZAR, M.; GUTIERREZ, M.; ASTUDILLO, L. Antioxidant activity and total phenolics of plants used in traditional medicine in Ecuador. **In**

Proceedings of The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 1–30 November 2013; Sciforum Electronic Conference Series, Vol. 17, 2013.

JACQUES, R.; FREITAS, L.; FLORES, V.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; CARAMÃO, E. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2780-2784, 2006.

JACQUES, R.; SANTOS, J.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; CARAMÃO, E. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 354-359, 2007.

JAAKOLA, L. e HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1239-1247, 2010.

JACQUES, R.; DOS SANTOS, L.; FLORES, V.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, V.; CARAMÃO, E. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2780-2784, 2006.

JOHN, B.; SULAIMAN, C.; SATHEESH, G.; REDDY, V. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 406-408, 2014.

KOSAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R.. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidante characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, p. 525-533, 2005.

KOTOVICZ, V.; ZANOELO E. Hydrostatic pressure cycling extraction of soluble matter from mate leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 656-665, 2013.

KREMR, D.; BAJER, T.; BAJEROVÁ, P.; SURMOVÁ, S.; VENTURA, K. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review. **Quimica Nova**, v. 39, p. 530-532, 2016.

KRIEGER, D.; KALMAN, D.; FELDMAN, S.; ARNILLAS, L.; GOLDBERG, D.; GISBERT, O.; NADER, S. The Safety, Pharmacokinetics, and Nervous System Effects of Two Natural Sources of Caffeine in Healthy Adult Males. **Clinical and Translational Science**, v. 9, p. 246-251, 2016.

KUMORO, A., HASANA, M., SINGH, H. Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. **Science Asia**, v. 35, p. 306-309, 2009.

LATTANZIO, V. Phenolic Compounds: Introduction. In RAMAWAT, K.; MÉRILLON, J. **Natural Products, Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. New York: Springer, 2012. p.1543-1581.

LASTA, H. **Potencial antioxidante dos extratos dos resíduos de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) obtidos a alta e baixa pressão**. 2017. 163f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LEAN, M.; ASHIHARA, H.; CLIFFORD, M.; CROZIER, A. Purine Alkaloids: A Focus on Caffeine and Related Compounds in Beverages. In CROZIER, A.; ASHIHARA, H.; BARBERÁN, F. **Teas, cocoa and coffee, Plant secondary metabolites and health**. Chichester: JohnWiley& Sons, 2012. p. 953-977.

LEWIS, W.; KENNELLY, E.; BASS, G.; WEDNER, H.; ELVIN-LEWIS, M.; FAST, D. Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 25 - 30, 1991.

LIU, L.; SUN, Y.; LAURA, T.; LIANG, X.; YE, H.; ZENG, X . Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. **Food Chemistry**, v. 112, p. 35-41, 2009.

LUTHRIA, D.; BISWAS, R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Food Chemistry**, v.105, p. 325–333, 2007.

LUTZ, A. Óleos E Gorduras. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, p. 589–625, 2008.

MACHADO, A.; PASQUEL-REÁTEGUI, J.; FERNÁNDEZ, G.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Journal of Food Research International**, v. 77, p. 675-683, 2015.

MARTELLI, F.; NUNES, F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciencia e Cultura**. 2014, vol.66, n.3, p. 54-57, 2014.

MAZZUTTI, S. **Extração de compostos com importância biológica provenientes de *Plantago major* e *Plantago lanceolata* através de técnicas ambientalmente seguras**. 2016. 168f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MEIRELES, A. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications**. Boca Raton: CRC Press-Taylor&Francis Group, 2009. 486p.

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

MURAKAMI, A. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)** 2010. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MURGA, R.; SANZ, M.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, p. 239-245, 2003.

MURKOVIC, M. Phenolic compounds. Em CABALLERO, B. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Baltimore: Elsevier Academic Press 2003, p.4507-4514.

NABECHIMA, G. **Inativação térmica das enzimas polifenoloxidase e peroxidase em forno esteira e efeitos sobre a cor da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**, 2010. 212f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

National Institute of Standards and Technology - NIST. **Mass Spectral Library and NIST Mass Spectral Search Program**. Gaithersburg, v. 11, 2011.

OSORIO-TOBÓN, F.; MEIRELES, A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. **Food and Public Health**, v. 3, p. 289-303, 2013.

PAGLIOSA, C.; VIEIRA, M.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; BERTELO, A.; AMANTE, E.; CASTANHO, R. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PARDAU, M. **Antioxidant activity and nitric oxide scavenging abilities of *Ilex guayusa* compared with *Camellia sinensis* and *Aspalathus linearis* teas**. 2016.132 p. Dissertation Msc. (Faculty of Health Sciences Department of Anatomy), University of Pretoria- South Africa, Pretoria.

PATIÑO, V. Guayusa, a neglected Stimulant from the Eastern Andean Foothills. **Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial III: fibras, medicinas, misceláneas**. Livro tomo III, 1963, Cali, Imprenta Departamental, p 108-114.

PERES, V.; SAFFI, J.; MELECCHI, M.; ABAD, F.; JACQUES, R.; MARTINEZ, M.; OLIVEIRA, E.; CARAMÃO, E. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 115-118, 2006.

PIANTINO, C.; AQUINO, F.; FOLLEGATTI-ROMERO, L.; CABRAL, F. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from

Baccharis dracunculifolia. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.

PIÑEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 19-23, 2004.

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

POPA, O.; BABEABU, N.; POPA, I.; NITA, S.; DINU-PÂRVU, C. Review: Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-16, 2015.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RADICE, M.; VIDARI, G. Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. **La Granja**, v. 6, p. 3-11, 2007. Universidad Politecnica Salesiana, Università degli Studi di Pavia- Itália.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REDDY, L.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1412-1426, 2009.

RENGIFO, E.; CERRUTI, T. **Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana - Estudio de su uso y cultivo**. Iquitos: Imprenta del Ejército-Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), 1997. p. 322.

REYNERTSON, K.; BASILE, M.; KENNELLY, E. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-36, 2005.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROSA, P.; PARAJÓ, J.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DIAZ-REINOSO, B.; SMITH, R.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.; PETERS, C.; GOTO, M.; LICAS, S.; MEIRELES, A. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry. In: MEIRELES. **Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications**. Boca Raton: CRC Press-Taylor&Francis Group, 2009. p. 290-218.

RUIZ, J.; ROQUE, M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. **Ciencia e Investigación**, v. 12, n. 1, p. 41-47, 2009.

RUSSO, E. Headache treatments by native peoples of the Ecuadorian Amazon: a preliminary cross-disciplinary assessment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 193 - 206, 1992.

SALDAÑA, M.; MOHAMED, R.; BAER, M.; MAZZAFERA, P. Extraction of Purine Alkaloids from Maté (*Ilex paraguariensis*) Using Supercritical CO₂. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SALDAÑA, M.; ZETZL, C.; MOHAMED, R.; BRUNNER, G. Extraction of Methylxanthines from Guarana Seeds, Mate Leaves, and Cocoa Beans Using Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 4820-4826, 2002.

SALIM, A.; CHIN, W.; KINGHORN, A. Drug Discovery from Plants. In: RAMAWAT, K.; MÉRILLON J. **Bioactive Molecules and Medicinal Plants**. Berlin: Springer, 2008. p. 1-24.

SCHAICH, K.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 111-145, 2015.

SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; LINDE, M. Saponinas. Em SIMÕES, et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Sexta edição. Florianópolis: Editora da UFSC 2007. p. 711-740.

SCHENKEL, E.; MONTANHA, J.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from maté, *Ilex paraguariensis*. In: BACK,N.; COHEN, I.; KRITCHEVSKY, D.; LAJTHA, A.; PAOLETTI, J. **Saponins used in food and agriculture**. Heidelberg: Elsevier, 2014. p. 95-130.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.; TOURNIER, H.; PRIETO, J.; SPEGAZZINI, E.; DEBENEDETTI, S.; MOSCA, S. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International**, v. 42, p. 1403-1409, 2009.

SCHULTES, R. *Ilex guayusa* from 500 A.D. to the present. In: WASSÉN, H. **A Medicine-man's Implements and Plants in a Tiahuanacoid Tomb in Highland Bolivia**, Göteborg: Etnologiska Studier, 1972. v. 32, p.115-138.

SCHULTES, R. Discovery of an ancient guayusa plantation in Colombia. **Botanical Museum leaflets, Harvard University**, v. 27, n. 61, p. 143-153, 1979.

SCHULTES, R. Antiquity of the Use of New World Hallucinogens. In: NICHOLS, D. **The Heffter Review of Psychedelic Research**. Novo México: The Heffter Research Institute, 1998. v. 1, p. 1-2.

SINGLENTON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOLANA, M.; BOSCHIERO, I.; DALL'ACQUA, S.; BERTUCCO, A. Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by

supercritical CO₂ technology using different co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 245-251, 2014.

SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ, G.; ROS, P.; LINCK, V. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Em SIMÕES, et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento** Sexta edição. Florianópolis: Editora da UFSC 2007. p.289-326.

SOUMYANATH, A. Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants. v.6. Boca Raton: CRC Press, 2006. 314p.

SUN, Q.; HUA, S.; YE, J.; LU, J.; ZHENG, X.; LIANG, Y. Decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1161-1168, 2010.

SWANSTON-FLATT, S.; FLATT, P.; DAY, A.; BAILEY, C. Traditional dietary adjuncts for the treatment of diabetes mellitus. **Proceedings of the nutrition society**. v50, p. 641-651, 1991.

TAVARES, J; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. Em SIMÕES, et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento** Sexta edição. Florianópolis: Editora da UFSC 2007. p.519-535.

TAYLOR, L. **Supercritical Fluid Extraction**. New York; John Wiley & Sons, 1996. 181p.

THUONG, P.; SU, N.; NGOC, T.; HUNG, T.; DANG, N.; THUAN, N.; BAE, K.; OH, W. Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 139-145, 2009.

TURKMEN, N.; SARI, F.; SEDAT, Y. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 99, p. 835-841, 2006.

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM. **Substantial equivalence application for the approval of guayusa leaf tea (*Ilex guayusa* Loes.) for use as a dry leaf infusion**. Napo, 2017, 27p.

VÁSQUEZ, S. Guayusa: un sembrío local de venta global. El Telégrafo, Guayaquil, 26 junho 2011, economia. Disponível em: < <http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/guayusaunsembrionalocaldev entaglobal.html>>. Acesso em: 16 dezembro 2015.

VEGGI, P.; CALVACANTI, R.; MEIRELES, A. Production of phenolic-rich extracts from Brazilian plants using supercritical and subcritical fluid extraction: Experimental data and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 131, p. 96-109, 2014.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2008. 320p.

VIEITEZ, I.; MACEIRAS, L.; JACHMANIÁN, I.; ALBORÉS, S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58-64, 2018.

VIGANÓ, J.; BRUMER, I.; DE CAMPOS BRAGA, P.; DA SILVA, J.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.; REYES, F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. **Journal of Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 382-390, 2016.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J.; GARCÍA-RUIZ, A.; BAENAS, N.; MORENO, D.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.; STINCO, C.; JERVES-ANDRADE L.; LEÓN-TAMARIZ, F.; ORTIZ-ULLOA, J.; RUALES, J. Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of Guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 98, p. 1927-1934, 2018.

VILLANUEVA, D.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate + water mixtures. **Food and Bioproducts Processing**, V. 96, p. 106-112, 2015.

WASSEN, H.A Medicine-man's Implements and Plants in Tihuanacoid Tomb in Highland Bolivia. **American Anthropologist**, v. 76, p. 472-474, 1974.

WEJNEROWSKA, G.; HEINRICH, P.; GACA, J. Separation of squalene and oil from Amaranthus seeds by supercritical carbon dioxide. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 39-43, 2013.

WILSON, E.; VERPOORTE, R. Yerba Mate: Past, Present and Future of the Most Popular Herbal Tea of S. America. In: **Contributions to the quality control of two crops of economic importance: hops and yerba mate**. Leiden, 2012, p. 123-140.

WINK, M. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In: CORDELL, G. **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**, Volume 43. Boca Raton: Academic Press, 1993. p. 1-118.

WINK, M. Compartmentation of Secondary Metabolites and Xenobiotics in Plant Vacuoles. **Advances in Botanical Research**, v. 25, p. 141-169, 1997.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. **Annual Plant Reviews**, v. 3, p. 1-16, 1999.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. **Encyclopedia of plant and crop science**, v. 25, p. 915-919, 2004.

YI, F.; ZHAO, X.; PENG, Y.; XIA, P. Genus *Ilex* L.: Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Pharmacology. **Chinese Herbal Medicines (CHM)**, v. 8, p. 209-230, 2016.

YUAN, P.; PAN, S.; YANG, S.; LIU, Y.; XU, Q. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex cornuta* on myocardial ischemia injury. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, p. 904-104, 2017.

ZETZEL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE units for University Education and Comparative Research. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, v. 400, n. 600, p. 577–581, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Figura A-I 1. Curva analítica de ácido gálico padrão, com absorbância no comprimento de onda de 760 nm, para o cálculo de CFT nos extratos de folhas de guayusa (*Ilex guayusa* L.)

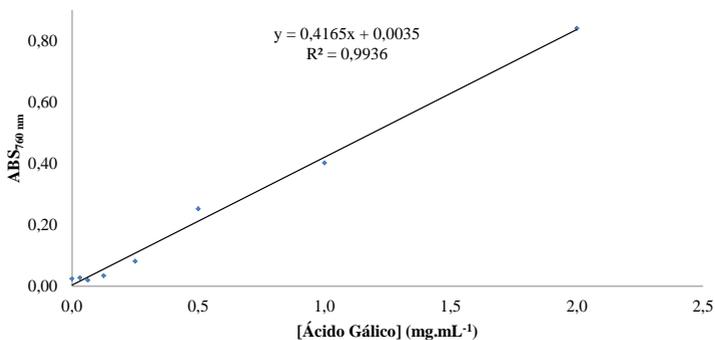
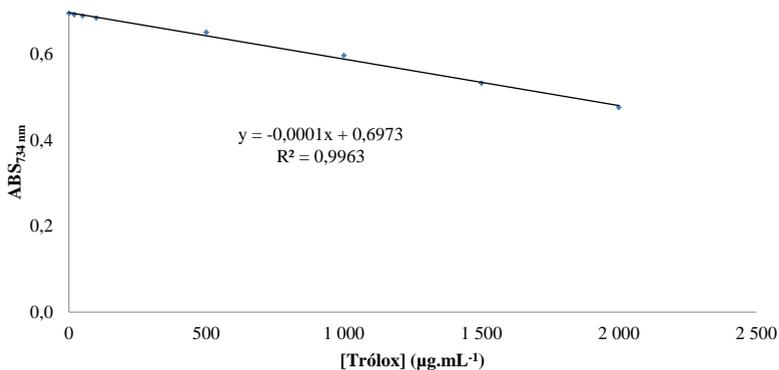


Figura A-I 2. Curva analítica de Trólox padrão, com absorbância no comprimento de onda de 734 nm, para o cálculo de AA nos extratos de folhas de guayusa (*Ilex guayusa* L.).



APÊNDICE II

Figura A-II 1. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ESC.

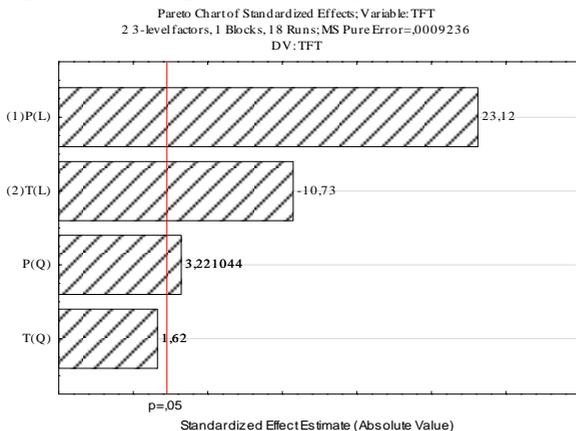


Figura A-II 2. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ESC com cossolvente.

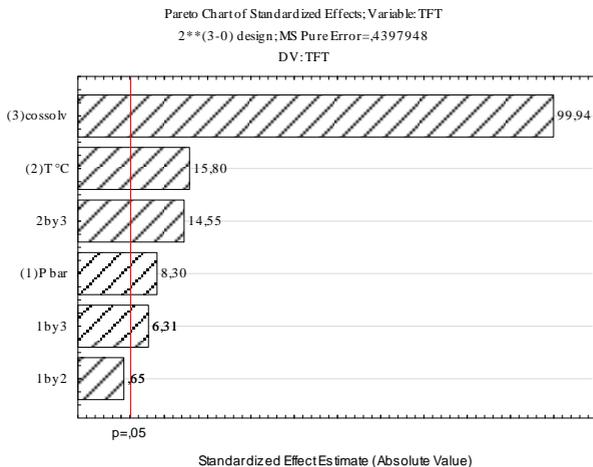
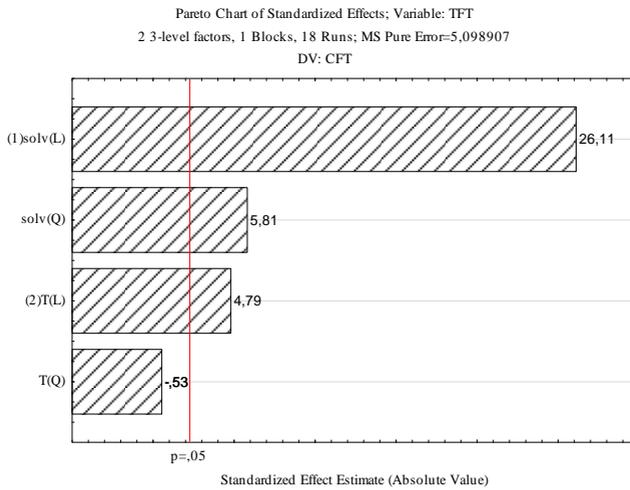


Figura A-II 3. Diagrama de Pareto para CFT na técnica ELP.



APÊNDICE III

Figura A-III 1. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica ESC.

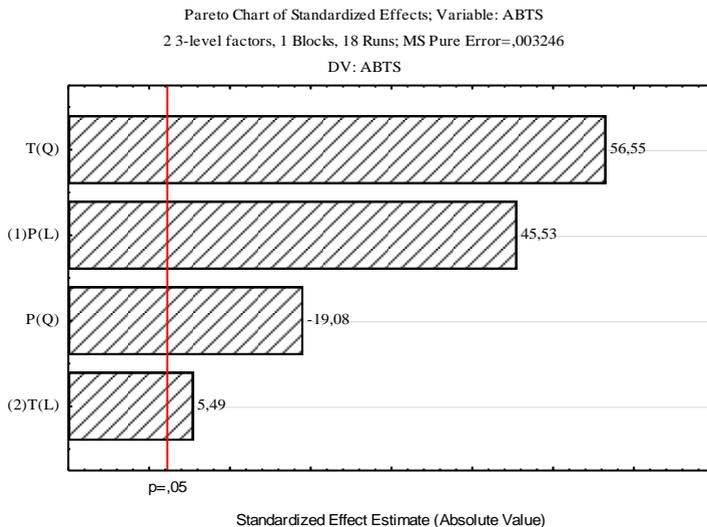


Figura A-III 2. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica ESC com cossolvente.

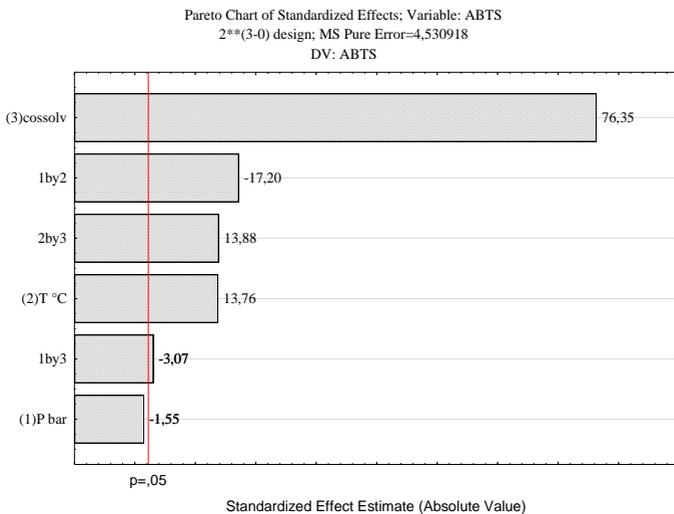
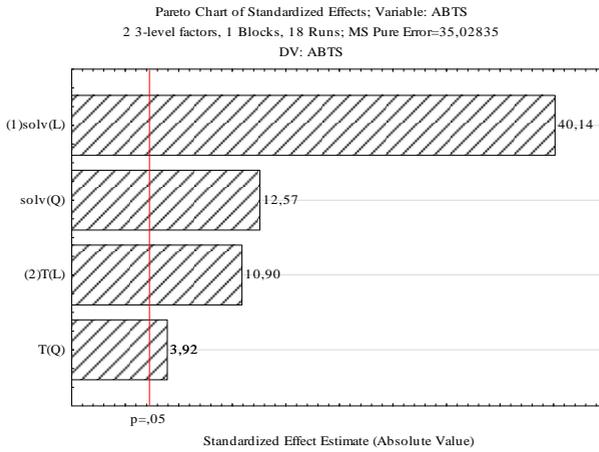


Figura A-III 3. Diagrama de Pareto para AA (ABTS) na técnica PLE.



APÊNDICE IV

Figura A-IV 1. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ESC.

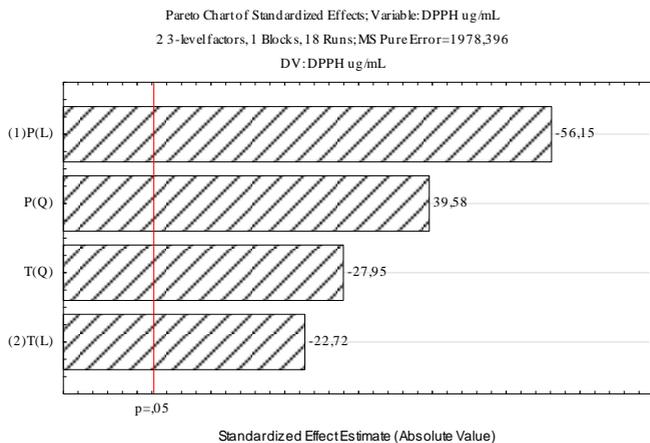


Figura A-IV 2. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ESC com cossolvente.

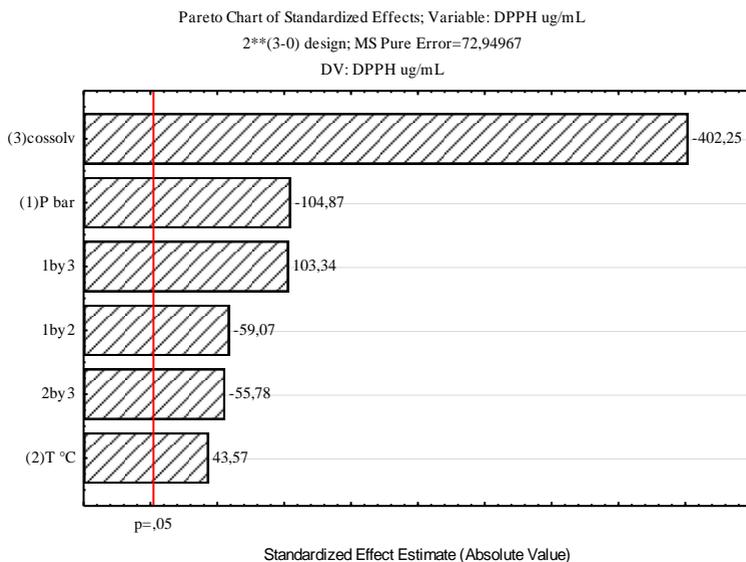
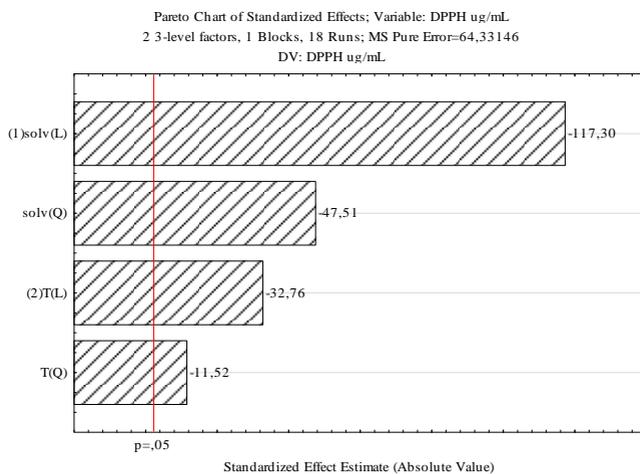


Figura A-IV 3. Diagrama de Pareto para AA (IC50) na técnica ELP.



APÊNDICE V

Figura A-V 1. Correlação linear entre CFT e AA (ABTS).

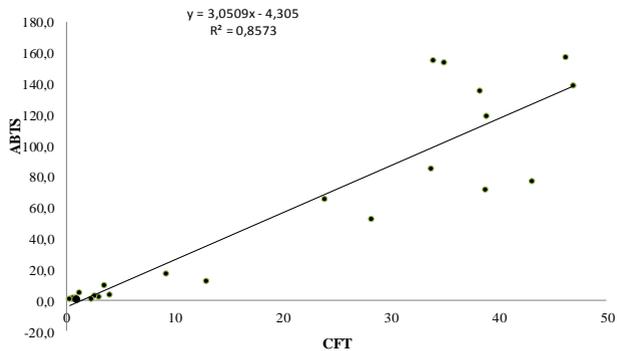
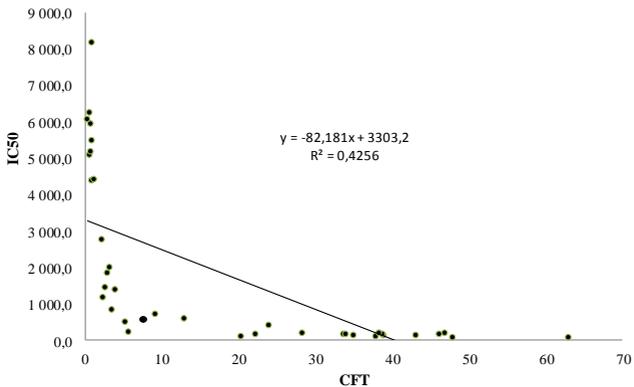
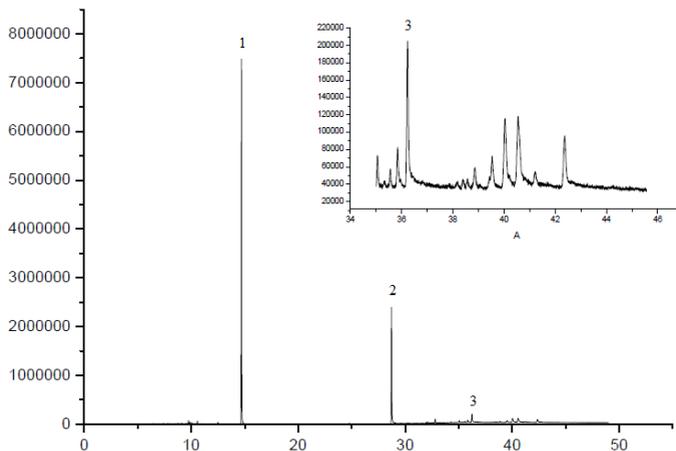


Figura A-V 2. Correlação linear entre CFT e AA (IC50).



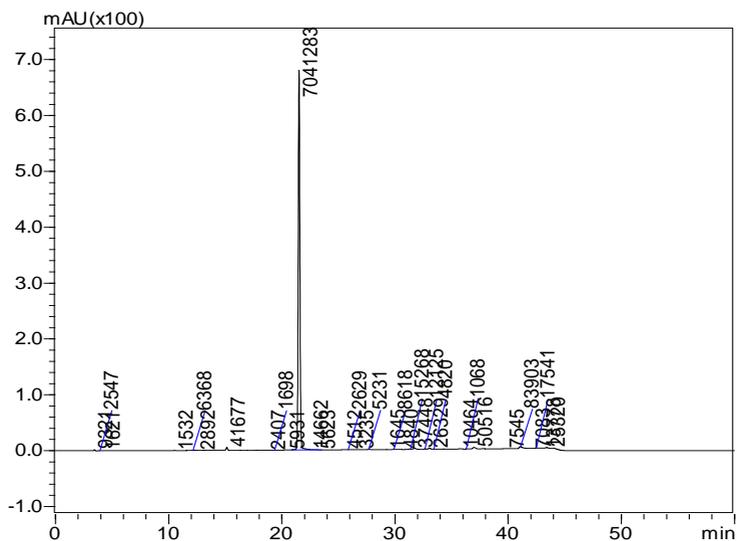
APÊNDICE VI

Figura A-VI 1. Cromatograma (GC-MS) do extrato de FG obtido mediante ESC (P 250, T 45 °C).



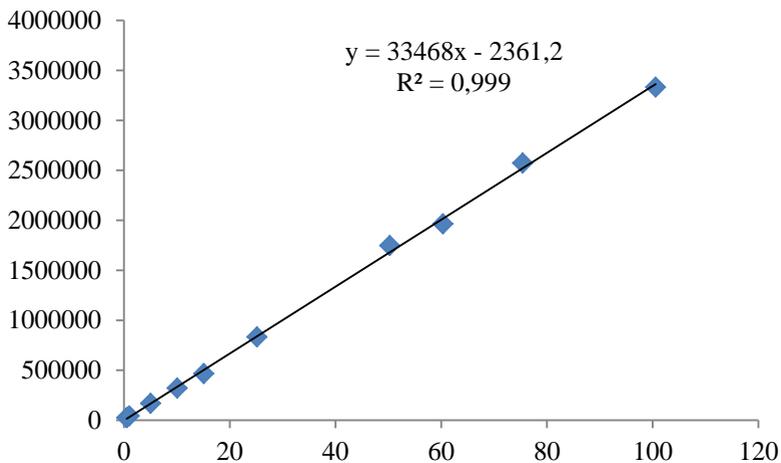
Picos: 1 cafeína, 2 esqualeno, 3 α -amirina

Figura A-VI 2. Cromatograma (CLAE) do extrato de FG obtido mediante ESC com etanol (P 150, T 75 °C).



APÊNDICE VII

Figura A-VII 1. Curva calibração cafeína (CLAE).



APÊNDICE VIII

Figura A-VIII 1. Isotermas da ESC para cafeína, expressa em porcentagem de área.

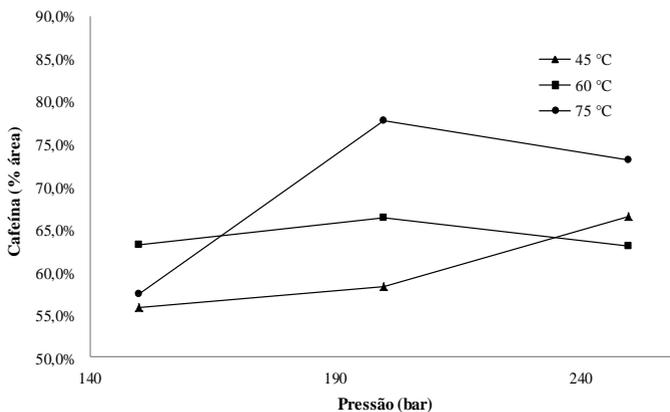


Figura A-VIII 2. Isotermas da ESC com adição de cossolvente etanol para cafeína, expressa em porcentagem de área.

