

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ERVA BALEEIRA (*Cordia
verbenacea* D.C.) POR DIFERENTES TÉCNICAS: MEDIDA DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA, MODELAGEM MATEMÁTICA E
DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FASES**

ELIANE MARIA ZANDONAI MICHIELIN

**Florianópolis – SC
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ERVA BALEEIRA (*Cordia
verbenacea* D.C.) POR DIFERENTES TÉCNICAS: MEDIDA DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA, MODELAGEM MATEMÁTICA E
DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE FASES**

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

ELIANE MARIA ZANDONAI MICHIELIN

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Florianópolis – SC
2009**

É preciso saber viver

Quem espera que a vida
Seja feita de ilusão
Pode até ficar maluco
Ou morrer na solidão
É preciso ter cuidado
Pra mais tarde não sofrer
É preciso saber viver!...

Toda pedra do caminho
Você pode retirar
Numa flor que tem espinhos
Você pode se arranhar
Se o bem e o mal existem
Você pode escolher
É preciso saber viver!...

É preciso saber viver!
É preciso saber viver!
É preciso saber viver!
Saber viver!...

Composição: Roberto Carlos

A ousadia tem força, poder e magia.

Goethe.

Aos meus pais, Olides e Teresinha
e irmãs Zoleide e Fabiana,
por todo o amor, dedicação e incentivo.
Ao meu esposo Landell, pelo seu carinho,
compreensão e apoio que foram fundamentais
para a realização deste trabalho e à minha
filha Luiza, amores da minha vida.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pela amizade, orientação, incentivo e contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Haiko Hense pelos ensinamentos e apoio técnico para realização dos experimentos.

À Profa. Maria Ângela Almeida Meireles pelas valiosas contribuições.

À Profa. Rozangela Curi Pedrosa pelas análises antioxidantes realizadas e pelo conhecimento compartilhado durante a avaliação desta tese.

Ao Prof. Artur Smânia pelas análises antimicrobianas realizadas

Ao Prof. José Vladimir de Oliveira, Prof. Elton Franceschi e Prof. Marcos Lúcio Corazza (URI Campus de Erechim) pela parceria na realização dos experimentos de equilíbrio de fases.

Aos amigos do LATESC que participaram desta caminhada Aziza, Leandro, Fernanda, Sibebe, Natália, Érika e em especial ao Jeferson e a Ana Augusta pela parceria neste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pelo apoio e suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	18
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 <i>Objetivos Específicos</i>	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 <i>Fitomedicamentos – Plantas medicinais</i>	28
3.2 <i>Cordia verbenacea DC. – erva baleeira</i>	30
3.3 <i>Radicais livres</i>	33
3.4 <i>Antioxidantes</i>	35
3.5 <i>Polifenóis</i>	37
3.6 <i>Plantas medicinais como antiinflamatórios</i>	38
3.7 <i>Atividade Antimicrobiana</i>	39
3.8 <i>Fluidos Supercríticos</i>	40
3.9 <i>Extração Supercrítica</i>	41
3.9.1 <i>Processo de Extração Supercrítica em Leito Fixo</i>	42
3.9.2 <i>Mecanismos de Transporte de Sólidos</i>	43
3.9.3 <i>Curvas de Extração</i>	45
3.9.4 <i>Inversão das Isotermas de Rendimento</i>	46
3.9.5 <i>Utilização de Co-solventes</i>	47
3.10 <i>Modelos Matemáticos</i>	48
3.11 <i>Equilíbrio de Fases</i>	52
3.11.1 <i>Critérios do equilíbrio de fases</i>	52

3.11.2 Equações de Estado Cúbicas para Modelagem Termodinâmica	54
3.11.3 Regras de Mistura	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 <i>Matéria-Prima</i>	58
4.2 <i>Caracterização da matéria-prima e leito de partículas</i>	58
4.2.1 Determinação do teor de Umidade e Voláteis	58
4.2.2 Distribuição Granulométrica	59
4.2.3 Densidade real e Densidade aparente	60
4.2.4 Densidade do solvente	60
4.3 <i>Unidades de extração supercrítica (ESC)</i>	60
4.3.1 Unidade de Extração 1:	61
4.3.2 Unidade de Extração 2:	63
4.4 <i>Determinação do rendimento global de óleo (X_0)</i>	65
4.4.1 Experimentos Cinéticos – Curvas de Extração	66
4.5 <i>Emprego de co-solvente (CS)</i>	67
4.6 <i>Determinação Experimental da Solubilidade</i>	68
4.7 <i>Medidas Experimentais do Equilíbrio de Fases</i>	68
4.7.1 Aparato experimental	69
4.7.2 Procedimento Experimental	72
4.8 <i>Extração com Solventes Orgânicos</i>	73
4.8.1 Extração soxhlet	73
4.8.2 Hidrodestilação	74
4.8.3 Maceração seguida de partição Líquido-Líquido	74
4.9 <i>Avaliação da Atividade Antioxidante</i>	75
4.9.1 Determinação do índice de fenólicos totais (FT)	75
4.9.2 Método DPPH	76
4.9.3 Método ABTS	77
4.9.4 Formação e monitoramento do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	79
4.9.5 Proteção contra a peroxidação lipídica <i>in vitro</i> (TBARS)	79
4.10 <i>Avaliação da Atividade Antibacteriana</i>	80
4.10.1 Método de difusão em ágar	80
4.10.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	81
4.11 <i>Análise cromatográfica acoplada com espectrometria de massas CG-EM</i>	82

4.12	<i>Análise Estatística</i>	83
4.13	<i>Modelagem Matemática</i>	83
4.14	<i>Resumo dos Ensaios</i>	84
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1	<i>Resultados Prévios</i>	88
5.2	<i>Rendimento global, composição química e atividade antibacteriana de extratos de Cordia verbenacea obtidos por diferentes métodos</i> ¹	90
5.2.1	Introdução	91
5.2.2	Material e Métodos	92
5.2.3	Resultados	93
5.2.4	Conclusão do Artigo 1	114
5.3	<i>Avaliação da Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos de Erva baleeira Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração</i> ¹	116
5.3.1	Introdução	117
5.3.2	Material e Métodos	117
5.3.3	Resultados	118
5.3.4	Conclusão do Artigo 2	130
5.4	<i>Modelagem Matemática da Cinética de Extração de Erva Baleeira</i>	132
5.4.1	Introdução	132
5.4.2	Material e Métodos	133
5.4.3	Resultados	134
5.4.4	Conclusão do Artigo 3	147
5.5	<i>Avaliação do Equilíbrio de Fases a Alta Pressão para os Sistemas formados por dióxido de carbono, α-humuleno e trans-cariofileno</i> ¹ ..	149
5.5.1	Introdução	150
5.5.2	Material e Métodos	151
5.5.3	Resultados	152
5.5.5	Conclusão do Artigo 4	162
6	CONCLUSÕES	164
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	166
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

9 APÊNDICES.....	187
<i>APÊNDICE I – Modelos Matemáticos</i>	187
9.1 Modelo de Sovová (1994)	187
9.2 Modelo Logístico – Martínez <i>et al.</i> (2003).....	193
9.3 Modelo de TAN e LIOU (1989).....	195
9.4 Modelo de Goto <i>et al.</i> (1993)	197
9.5 Modelo de Difusão – Crank (1975).....	199
9.6 Modelo de Esquível <i>et al.</i> (1999)	200
9.7 Modelo VTII - Brunner (1994).....	200
<i>APÊNDICE II – Dados experimentais das curvas de extração</i>	203
<i>APÊNDICE III – Curvas de calibração</i>	205
<i>APÊNDICE IV– Artigos produzidos a partir dos dados experimentais gerados neste trabalho</i>	206
<i>APÊNDICE V- Cromatogramas dos extratos de erva baleeira</i>	232

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto do creme Acheflan.	30
Figura 2: Erva baleeira com detalhe da floração.	31
Figura 10: Diagrama Esquemático do Aparato Experimental. Fonte: (LANZA, 2004).	70
Figura 12: Pistão utilizado na célula de equilíbrio (LANZA, 2004).....	72
Figura 13: ESC de erva baleeira a 150 bar, 40°C e vazão de 3,0 g/min	90
Figura 15: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC de erva baleeira em função de T e P.....	96
Figura 16: Superfície de resposta para o X_0 da ESC de erva baleeira para as pressões de 200 e 300 bar em função da temperatura.....	97
Figura 17: Efeito da concentração e do tipo de co-solvente no rendimento da ESC de erva baleeira.	100
Figura 18: CG-EM do extrato de erva baleeira obtido com CO ₂ supercrítico a 50°C e 300 bar.....	105
Figura 21: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por ESC.	129
Figura 22: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por soxhlet.	129
Figura 23: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por maceração.	129
Figura 24: Influência da pressão no rendimento para ESC de erva baleeira à 50°C.....	136
Figura 25: Influência da temperatura e da vazão de CO ₂ no rendimento de erva baleeira.....	137
Figura 26: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos para a condição de 200bar e 50°C.	140
Figura 27: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos para a condição de 200bar e 30°C.	140
Figura 28: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos: influência da pressão no rendimento para ESC à 50°C.	141
Figura 29: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos: influência da vazão no rendimento para ESC à 150 bar e 40°C.	141
Figura 30: Pressão versus fração molar do CO ₂ para demonstrar o diagrama (P-x-y) do sistema binário CO ₂ + α -humuleno a 303 K (+ EVL, ▲ ELL, △ EVLL); 313 K (■ EVL); 323 K (● EVL);	

333 K (◆ EVL) e 343 K (* EVL). Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.	158
Figura 31: Pressão versus fração molar do CO ₂ para demonstrar o diagrama (P-x-y) do sistema binário CO ₂ + <i>trans</i> -cariofileno a 303 K (+ EVL, ▲ ELL, △ EVLL); 313 K (■ EVL); 323 K (● EVL); 333 K (◆ EVL) e 343 K (* EVL). Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.	159
Figura 33: Pressão versus fração molar de CO ₂ para comparar o diagrama P-x-y a 343 K dos sistemas binários CO ₂ + <i>trans</i> -cariofileno (○) e CO ₂ + α-humuleno (△) e sistema ternário CO ₂ + α-humuleno + <i>trans</i> -cariofileno (□) (cariofileno/humuleno razão = 2,4 : 1,0 wt/wt), Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.	161
Figura 34: Diagrama de equilíbrio de fases: simulação a elevadas pressões com a EDE de P-R para o sistema CO ₂ + <i>trans</i> -cariofileno.	161
Figura 35: Diagrama de equilíbrio de fases: simulação a elevadas pressões com a EDE de P-R para o sistema CO ₂ + α-humuleno.	162
Figura 36: Curva padrão de ácido gálico utilizada na análise do conteúdo de fenólicos dos extratos de erva baleeira.	205
Figura 37: Curva padrão de Trolox utilizada na análise da atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos de erva baleeira.	205
Figura 38: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC com CO ₂ + 5% de etanol como co-solvente.	232
Figura 39: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC com CO ₂ + 5% de acetato de etila como co-solvente.	232
Figura 40: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 100 bar e 30 °C.	233
Figura 41: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 200 bar e 30 °C.	233
Figura 42: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por extração soxhlet com etanol.	234
Figura 43: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por extração soxhlet com acetato de etila.	234
Figura 44: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.	235

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos níveis das variáveis para as extrações supercríticas.	66
Tabela 2: Resumo dos ensaios realizados com erva baleeira.....	84
Tabela 3: Valores de X_0 obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de erva baleeira.	93
Tabela 4: Rendimento global (X_0) da ESC de erva baleeira em função das diferentes concentrações de co-solventes empregados.....	99
Tabela 5: Rendimento global das extrações convencionais de erva baleeira.	101
Tabela 6: Propriedades dos solventes.....	102
Tabela 7: Componentes identificados nos extratos de erva baleeira com seus respectivos tempos de retenção e porcentagem de área.	105
Tabela 8: Teste de difusão em ágar para os diferentes extratos de erva baleeira.	111
Tabela 9: Valores de MIC para a erva baleeira determinados pelo método de microdiluição.....	113
Tabela 10: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de erva baleeira através do método DPPH e comparação com os padrões rutina e quercetina.	119
Tabela 11: Atividade antioxidante pelo método ABTS de extratos de erva baleeira.....	122
Tabela 12: Atividade antioxidante pelo método do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$).....	124
Tabela 13: Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira através da medida da proteção a lipoperoxidação.	126
Tabela 14: Conteúdo de fenólicos totais (FT) expressos em equivalentes a ácido gálico (GAE) para os extratos de erva baleeira.	127
Tabela 15: Caracterização do leito de partículas de erva baleeira.	134
Tabela 16: Solubilidades para erva baleeira.....	138
Tabela 17: Parâmetros cinéticos do processo de ESC de erva baleeira e viscosidade dinâmica do CO_2.....	139
Tabela 18: Parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) dos modelos para a ESC de erva baleeira.....	143
Tabela 19: Constantes críticas e fator acêntrico para os compostos estudados.	152
Tabela 20: Composição normalizada (porcentagem de área) para o extrato supercrítico obtido a 300 bar e 50°C.....	152

Tabela 21: Dados de equilíbrio de fases para o sistema binário formado por CO₂ + α-humuleno.	153
Tabela 22: Dados de equilíbrio de fases para o sistema binário formado por CO₂ + <i>trans</i>-cariofileno.....	155
Tabela 23: Dados de equilíbrio de fases para o sistema ternário formado por CO₂ + α-humuleno + <i>trans</i>-cariofileno (cariofileno:humuleno = 2,4:1,0 wt/wt composição).	157
Tabela 24: Parâmetros de interação binária para a EDE de P-R para os sistemas estudados.	160
Tabela 25: Tempo de extração e rendimento obtido nas curvas de extração.	203

NOMENCLATURA

T	Temperatura de extração, (°C);
P	Pressão de extração, (bar);
X	Razão mássica de soluto na fase sólida, ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
Y	Razão mássica de soluto na fase fluida, ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$);
t	Tempo, (s);
h	Coordenada axial, m;
H	Comprimento total do leito de extração, (m);
U	Velocidade superficial do solvente, (m/s);
u	Velocidade intersticial do solvente, (m^3/s);
ρ_s	Densidade da fase sólida, ($\text{kg}_{\text{sólido}}/\text{m}^3$);
ρ_f	Densidade da fase fluida ($\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$);
J (X,Y)	Taxa de transferência de, massa interfacial ($\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$);
O	Massa de soluto extraível, (g);
P	Massa de soluto de fácil acesso, (g);
k	Massa de soluto de difícil acesso, (g);
N	Massa de sólido inerte, (g);
X_0	Rendimento global da extração, (%);
x_0	Razão mássica inicial de soluto extraível, ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$);
x_p	Razão mássica de soluto de fácil acesso, ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$);
x_k	Razão mássica de soluto de difícil acesso, ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido inerte}}$);
k_{Y_a}	Coefficiente de transferência de massa na fase fluida, (s^{-1});
k_{X_a}	Coefficiente de transferência de massa na fase sólida, (s^{-1});
Y^*	Concentração de equilíbrio (solubilidade), ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$);
Y	Concentração normalizada de soluto na fase solvente;
Z	Parâmetro do período CER;
z	Coordenada adimensional;
z_w	Coordenada adimensional na posição entre extração rápida e lenta;
r	Concentração adimensional na fase sólida;
r_0	Concentração adimensional na fase sólida considerando c teor inicial de óleo;
τ	Tempo de residência do solvente no leito;
k	Parâmetro do modelo de Lack;
m_{extr}	Massa de extrato, (g);
CER	Índice referente à etapa de taxa constante de extração;
FER	Índice referente à etapa de taxa decrescente de extração;
t_{CER}	Duração da etapa de taxa constante de extração - CER, (s);
t_{FER}	Duração da etapa de taxa decrescente de extração-FER,(s);

Q_{CO_2}	Vazão média do solvente (kg/s);
W	Parâmetro para o período de taxa de extração lenta;
M_{CER}	Taxa de extração na etapa CER, (kg/s);
Y_{CER}	Razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER ($kg_{extrato}/kg_{CO_2}$);
$\Delta \bar{Y}$	Concentração média logarítmica na fase fluida, (g/g);
ΔX	Concentração média na fase sólida, (g/g);
S	Área de seção transversal do leito, (m^2);
ε	Porosidade total do leito de extração;
m_t	Massa total de sólidos na coluna de extração, (g);
m_0	Massa total inicial de soluto na coluna de extração, (g);
b	Parâmetro ajustável do modelo LM, (min^{-1});
t_m	Parâmetro ajustável do modelo LM, (min^{-1});
k_d	Parâmetro ajustável do modelo de dessorção – Constante de dessorção, (min^{-1});
D_{AB}	Coefficiente de difusão da segunda Lei de Fick, (m^2/min);
D	Coefficiente de difusão - modelo de difusão, (m^2/min);
ϕ	Relativo ao coeficiente global de transferência de massa – modelo de Goto;
k	Constante de equilíbrio de dessorção – modelo de Goto;
β	Porosidade da folha, necessário para o modelo de Goto;
b	Parâmetro ajustável- modelo de Esquível;
D_{ax}	Coefficiente de dispersão axial- modelo VTII;
β_F	Coefficiente de transferência de massa na fase fluida- modelo VTII;
k_{oG}	Coefficiente de transferência de massa global relacionado a fase fluida- VTII;
d_r	Densidade real das partículas, (g/cm^3);
d_a	Densidade aparente do leito, (g/cm^3);
r	Direção radial, (m);
n	Número inteiro;
δ	Espessura das partículas, (m);
ELL	Equilíbrio Líquido-Líquido;
ELV	Equilíbrio Líquido-Vapor;
ELLV	Equilíbrio Líquido-Líquido-Vapor;
σ	Desvio Padrão;
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazina;
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico);
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

GAE Equivalentes a ácido gálico;
MIC Concentração mínima inibitória.

RESUMO

A erva baleeira (*Cordia verbenacea*) é uma planta da Família das Borraginaceae, encontrada nas restingas marítimas de quase todo o litoral brasileiro, sendo mais comumente encontrada no trecho compreendido entre os Estados de Santa Catarina e São Paulo. Devido ao seu perfil de composição, a erva baleeira possui propriedades antiinflamatória e cicatrizante sendo indicada para o tratamento de reumatismo, artrite reumatóide, tendinite, dores lombares e musculares e nevralgias. Os compostos da classe dos sesquiterpenos encontrados em seus extratos como α -humuleno e trans-cariofileno são os principais responsáveis pela sua atividade antiinflamatória. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade dos extratos de erva baleeira obtidos a partir da tecnologia supercrítica através da comparação, em termos de rendimento de processo, composição dos extratos e atividade biológica, com os extratos obtidos a partir das técnicas convencionais de extração (maceração seguida de fracionamento com solventes orgânicos, extração soxhlet e hidrodestilação) e também com o uso de etanol e acetato de etila como co-solventes junto à ESC. Os extratos supercríticos de erva baleeira foram obtidos numa faixa de pressão de 100 a 300 bar e temperatura de 30, 40 e 50°C com densidade do solvente variando de 0,385 a 0,948 g/cm³ sendo o maior rendimento de 5,0% para a condição de extração de 300 bar e 50°C. Foram utilizados solventes orgânicos de diferentes polaridades na extração convencional como: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, acetona e misturas aquosas de 25 e 50% (etanol/água). O etanol e o acetato de etila foram utilizados nas concentrações de 2, 5 e 8% em massa como co-solventes na ESC, proporcionando rendimentos de até 8,6%. Foram identificados importantes compostos nos extratos de erva baleeira como α -humuleno, trans-cariofileno, espatulenol, cariofileno óxido, β -sitosterol e artemetina. Também foi avaliada, através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), método ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolna-6-ácido sulfônico), radical ânion superóxido e proteção contra a peroxidação lipídica a atividade antioxidante dos extratos obtidos com as diferentes tecnologias. O conteúdo de compostos fenólicos presente nos extratos foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu. A erva baleeira se mostrou uma importante fonte de compostos com atividade antioxidante com destaque para os extratos: fração acetato de etila da maceração, misturas aquosas etanol/água e extrato acetato de

etila da soxhlet que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes. A atividade antimicrobiana foi avaliada e os extratos supercríticos mostraram forte inibição antimicrobiana principalmente contra bactérias Gram-positivas com destaque para o extrato obtido com CO₂ puro a 30°C e 300 bar. Para a descrição da cinética de extração do sistema extrato de erva baleeira + CO₂ supercrítico foram empregados diferentes modelos de transferência de massa apresentados na literatura. O modelo de Sovová (1994) foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais e a convecção se mostrou como principal mecanismo de transferência de massa e a difusão como fator limitante. Foi investigado experimentalmente o comportamento de fases dos sistemas binários contendo α -humuleno + CO₂ e trans-cariofileno + CO₂ e do sistema ternário formado por α -humuleno + trans-cariofileno + CO₂, através do método estático sintético. Os resultados experimentais obtidos no estudo do equilíbrio de fases apresentaram transições de fases do tipo líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-líquido-vapor.

ABSTRACT

Cordia verbenacea is a plant from the Boraginaceae family, widely found along the southeastern coast of Brazil, especially between the states of Santa Catarina and São Paulo. Due to its composition profile, *Cordia verbenacea* presents anti-inflammatory and healing properties, being indicated for treatment of rheumatism, rheumatoid arthritis, tendonitis, muscle and back pain and neuralgia. The compounds from the sesquiterpene class present in *Cordia verbenacea* extracts, such as α -humulene and trans-caryophyllene, are the main responsible for its anti-inflammatory activity. Therefore, the aim of this study is to evaluate the quality of *Cordia verbenacea* extracts obtained by supercritical technology and compare, in terms of process yield, extracts composition and biological activity, with extracts obtained by conventional extraction techniques (maceration followed by fractionation with organic solvents, soxhlet extraction and hydrodistillation). The supercritical method was also improved by using ethanol and acetate ethyl as co-solvents. The supercritical extracts of *Cordia verbenacea* were obtained in a range of pressure from 100 to 300 bar and 30, 40 and 50°C of temperature with density of solvent varying from 0.385 a 0.948 g/cm³, being the largest extraction yield of 5.0% for the extraction condition of 300 bar and 50°C. The organic solvents of different polarity, used in conventional methods were: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, acetone and aqueous mixtures of 25 and 50% (ethanol / water). Ethanol and ethyl acetate were used in concentrations of 2.5 and 8% in mass as co-solvents in the supercritical extraction, providing yields up to 8.6%. Relevant compounds were identified in extracts of *Cordia verbenacea* as α -humulene, trans-caryophyllene, spathulenol, caryophyllene oxide, β -sitosterol and artemetin. The potential of the extracts were evaluated by the methods DPPH (2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl), ABTS (2,2'- azinobis - 3 - ethylbenzothiazoline 6 - ulfonate), superoxide anion radical and protection against lipid peroxidation, in order to detect the antioxidant activity of extracts obtained by the different extraction technologies. The content of phenolic compounds present in the extracts was determined by the method of Folin-Ciocalteu. *Cordia verbenacea* has showed itself an important source of compounds with antioxidant activity, especially for the ethyl acetate fraction (maceration), ethanol/water mixtures and ethyl acetate from soxhlet method which presented the highest antioxidant capacity. The antimicrobial activity was evaluated and the

supercritical extracts showed high antimicrobial inhibition, especially against gram-positive bacteria with emphasis to the extract obtained by CO₂ at 30°C and 300 bar. The kinetic description of the system *Cordia verbenacea* + supercritical CO₂ was performed by different mass transfer models, presented in literature. The Sovová (1994) model show the best adjustment with experimental data and the convection was indicated as the main mass transfer mechanism, with diffusion as a limiting factor. The phase behavior was investigated for the binary systems containing α -humulene + CO₂ and trans-caryophyllene + CO₂ and for the binary system formed by α -humulene + trans-caryophyllene + CO₂, through the static synthetic method. The experimental results obtained in the study of equilibrium phases showed transition of phases of the type liquid-vapour, liquid-liquid and liquid-liquid-vapour.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA Jr. *et al.* 2005).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA Jr. *et al.* 2005).

Dentre os inúmeros produtos naturais com atividade terapêutica comprovada destacamos a erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC.), planta nativa do Brasil e característica da Mata Atlântica, encontrada na parte litorânea de São Paulo à Santa Catarina. Esta planta é muito utilizada na medicina popular devido as suas propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes e também empregada para o tratamento de artrite, reumatismo, tendinite, dores musculares e contusões. Estudos indicam que esta planta contém substâncias antiinflamatórias cuja efetividade e reduzidos efeitos colaterais a colocam como uma alternativa segura e eficaz no tratamento tópico de inflamações. Tanto óleos essenciais como flavonóides, com atividade antioxidante e antiinflamatória, concentram-se nas folhas da erva baleeira que, dentre outras substâncias, contém em seus extratos o alfa-humuleno, um sesquiterpeno indicado como o princípio ativo da *C. verbenacea* responsável por sua ação antiinflamatória (CARVALHO *et al.* 2004, SERTIÉ *et al.* 2005). Além disto, ensaios farmacológicos dos extratos de erva baleeira obtidos por métodos convencionais confirmaram as propriedades medicinais como as ações anti-úlceras, antiinflamatória e cicatrizante (SERTIÉ *et al.* 2005, TICLI *et al.* 2005).

Métodos tradicionais de extração, incluindo a extração com solventes orgânicos e a hidrodestilação são bastante utilizados para a obtenção de extratos de diversas matrizes vegetais. Porém, essas

técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar a destruição de compostos termos sensíveis e, além disso, os solventes orgânicos utilizados podem ser prejudiciais à saúde (BE-JEN *et al.* 2004). Assim, a extração com fluido supercrítico tem sido considerada uma boa opção para a extração e fracionamento de produtos naturais.

A extração supercrítica (ESC) emprega gases pressurizados como solventes e se diferencia das outras técnicas pela produção de extratos isentos de solvente e sem degradação térmica, além de permitir o fácil controle da seletividade do processo, aspectos relevantes para as indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, suas principais áreas de atuação. A competitividade da área de compostos com atividade terapêutica que, para a conquista de mercados, se fundamenta na qualidade, disponibilidade e baixo custo, estimula o emprego de técnicas modernas de extração, como a extração supercrítica (ESC), que se destaca por minimizar danos ao meio ambiente e primar pela qualidade do produto, uma técnica que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (KHAJEH *et al.* 2004, CYGNAROWICZ *et al.* 1991).

A ESC tem sido extensivamente empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado a partir de plantas e diversos produtos naturais, tanto na área acadêmica como industrialmente, especialmente para os setores de alimentos, fármacos e de cosméticos (QUISPE-CONDORI *et al.* 2005; ZANCAN *et al.* 2002). A *Cordia verbenacea* tem despertado um grande apelo recentemente, mas a carência de dados experimentais de ESC, é um fator limitante para o emprego desta tecnologia visando a agregação de valor de produtos obtidos a partir de matérias-primas notadamente importantes da flora Brasileira.

Enfatizamos ainda que o Brasil, surpreendentemente ainda exporta plantas medicinais para serem processadas no exterior para, na sequência, importar os produtos processados de maior valor agregado. Assim, buscando aumento de competitividade na área de fármacos, o objetivo deste trabalho é a obtenção de extrato de erva baleeira empregando-se a tecnologia supercrítica e comparando-a com as técnicas convencionais de extração nos aspectos quantitativos e qualitativos, uma etapa fundamental para o desenvolvimento de produtos e processos. A validação da ESC como alternativa viável para a obtenção de extrato de *Cordia verbenacea* está associada a observação da qualidade em termos de concentração de compostos com destacada atividade biológica.

Desta forma, aliado à importância da técnica de extração na qualidade do produto, citamos a necessidade de estudos que garantam a eficiência e reprodutibilidade da operação de extração, assegurando a presença seletiva dos componentes-alvo, i. e., compostos com bioatividade como o alfa-humuleno. O conteúdo de alfa-humuleno pode variar com a fonte de erva baleeira utilizada como matéria-prima, com a maturidade da planta, região de colheita e com o processo de extração, afetando substancialmente sua biodisponibilidade e conseqüentemente a ação de preparados industriais. Assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas de extração para a erva baleeira que viabilizem a obtenção de extratos padronizados, representa um avanço tecnológico na área.

Os resultados das extrações com solventes orgânicos podem também fornecer indicativos para o emprego de determinados solventes como coadjuvantes na extração supercrítica, ou seja, empregar um solvente orgânico como co-solvente de extração (junto com o CO₂), permitindo assim a extração seletiva de determinados compostos da mistura e visando o aumento da ação biológica dos extratos, tanto em termos de atividade antioxidante como antibacteriana, lembrando que muitos compostos com atividade antioxidante, como flavonóides, são substâncias polares e para tanto o emprego de co-solventes em tecnologia supercrítica se faz necessário para possibilitar a sua adequada extração da matriz sólida.

A modelagem matemática de curvas de ESC é empregada com o objetivo de reproduzir dados experimentais existentes, e a partir deles ajustar parâmetros com os quais seja possível simular processos de extração em outras escalas e condições operacionais. Desta forma, também é objetivo deste trabalho estudar o fenômeno de transferência de massa mediante a aplicação de modelos matemáticos que correlacionem, através de diferentes mecanismos de transferência de massa, as curvas de extração obtidas experimentalmente com as curvas de extração obtidas pelos modelos.

Para o projeto da extração com fluido supercrítico são necessárias várias informações como as propriedades da matéria-prima, concentração de soluto na matriz vegetal, e as relações termodinâmicas e de transferência de massa entre o soluto e o solvente. Dentre as relações termodinâmicas, é de fundamental importância o conhecimento do equilíbrio de fases, nas condições de operação (temperatura e pressão), que fornecem dados sobre a solubilidade e a seletividade dos solutos no solvente supercrítico.

Assim, este estudo também visa investigar experimentalmente o

comportamento de fases dos compostos com atividade biológica comprovada presentes nos extratos de erva baleeira. Desta forma, serão avaliados os sistemas binários envolvendo dióxido de carbono+ α -humuleno, dióxido de carbono+trans-cariofileno e o sistema ternário formado por dióxido de carbono+ α -humuleno+trans-cariofileno. De forma a coletar dados para fornecer subsídios para a separação da mistura complexa que é o extrato de *Cordia verbenacea*.

Este trabalho está estruturado em capítulos. No capítulo 2 foram descritos os objetivos deste trabalho, no capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica que traz os embasamentos teóricos relacionados à análise dos resultados. O capítulo 4 trata da metodologia utilizada na condução dos experimentos. Os resultados são abordados no capítulo 5 sob a forma de artigos. São apresentados os resultados sobre a comparação entre as diferentes técnicas de extração empregadas em termos de rendimento, composição dos extratos e avaliação das propriedades farmacológicas, bem como a modelagem da cinética de extração e os dados de equilíbrio de fases, as conclusões são apresentadas no capítulo 6.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar o emprego do processo de extração supercrítica (ESC) na obtenção de extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC.). Este estudo visa avaliar a composição dos extratos obtidos por ESC e compará-los com os obtidos por extração com solventes orgânicos e mediante a técnica a alta pressão com o emprego de diferentes co-solventes. Os extratos obtidos foram analisados quanto a atividade antioxidante e antimicrobiana a fim de validar e comparar as técnicas de extração empregadas.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliação de rendimento de processo, ou rendimento em componentes alvo, como também da seletividade da tecnologia empregada para os compostos com atividade terapêutica, observada mediante avaliação do perfil de composição dos extratos;
- ✓ Determinação das condições ótimas de extração (pressão, temperatura, vazão, tipo e quantidade de co-solvente) empregando-se o CO₂ supercrítico como solvente;
- ✓ Avaliação do efeito do co-solvente no rendimento e na composição dos extratos;
- ✓ Obtenção de extratos a partir da extração convencional: extração por maceração seguida de partição líquido-líquido, soxhlet e hidrodestilação;
- ✓ Comparação dos rendimentos de extração entre diferentes técnicas;
- ✓ Comparação da composição dos extratos entre diferentes técnicas;
- ✓ Avaliação do ajuste de diferentes modelos de transferência de massa para a descrição das curvas de extração;
- ✓ Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante dos extratos de erva baleeira obtidos pelas diferentes técnicas utilizando o ensaio de captação do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), ânion superóxido, ABTS e proteção a lipoperoxidação;
- ✓ Quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu;
- ✓ Determinação da atividade antibacteriana;

- ✓ Determinação do equilíbrio de fases através do método estático dos sistemas binários envolvendo CO_2 + α -humuleno, CO_2 +trans-cariofileno e do sistema ternário formado por CO_2 + α -humuleno+trans-cariofileno, visando dar suporte ao desenvolvimento de operações de fracionamento;
- ✓ Modelagem termodinâmica do equilíbrio de fases empregando a equação de estado de Peng-Robinson.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fitomedicamentos – Plantas medicinais

A medicina popular têm utilizado vários extratos de plantas para o tratamento das mais diversas patologias, entretanto ainda são poucos os ensaios biológicos que confirmam este efeito. Para tanto, estudos científicos devem ser conduzidos no sentido de confirmar a ação de fármacos e produtos naturais que produzam melhores e duradouros resultados (YUNES, 2001).

O Brasil se configura como o país com a maior biodiversidade do mundo, sendo esta praticamente inexplorada cientificamente (SIMÕES *et al.* 2001). É importante ressaltar que no Brasil, dos quase seis mil produtos farmacêuticos disponíveis entre fármacos e fitofármacos, poucos foram desenvolvidos por indústrias nacionais. No entanto investe-se bilhões de dólares na importação da matéria-prima utilizada na produção de fármacos (BLOCK *et al.* 1998).

Entre as várias razões que proporcionam o rápido crescimento do mercado internacional e o interesse da população pelos medicamentos fitoterápicos, pode ser mencionada a preferência dos consumidores por terapias naturais; a preocupação em relação aos efeitos colaterais observados com os medicamentos sintéticos; crença errônea de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais; a tendência da população em acreditar que os medicamentos fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos de doenças quando os medicamentos sintéticos têm falhado; a tendência para a automedicação; a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos comprovando sua eficácia clínica, segurança e menor custo (CALIXTO *et al.* 2000).

Apesar de a biodiversidade brasileira apresentar expectativas animadoras para a química medicinal, a indústria fitofarmacêutica no Brasil não pode ser competitiva a nível internacional, devido à falta de investimentos consistentes para os ensaios de comprovação científica da atividade de diversas plantas usadas popularmente. Há falta de uma política definida, permanente e comprometida, e uma ausência de real integração interdisciplinar das diversas áreas do conhecimento (CECHINEL & YUNES, 2001).

Porém, através de parcerias entre laboratórios nacionais, grandes desafios começam a ser vencidos e começa a surgir a perspectiva de conquistas no mercado de fitoterápico. Em 2005, o Laboratório Aché

lançou o primeiro antiinflamatório fitoterápico, desenvolvido inteiramente no Brasil, obtido a partir do óleo essencial da planta *Cordia verbenacea* através da extração por arraste de vapor. O produto se apresenta na forma de creme com o nome comercial de Acheflan®. Consiste de um antiinflamatório tópico de grande efetividade nos processos reumáticos, nevralgias, artrite e de nível competitivo com os antiinflamatórios convencionais. Uma das grandes vantagens deste fitoterápico é não provocar lesões gástricas, afirmam Sertié e colaboradores (2005), responsáveis pela descoberta da atividade antiinflamatória desta planta. Patenteado no Brasil e no exterior, o novo produto pertence à classe dos fitomedicamentos, fármacos que têm em sua composição apenas substâncias ativas extraídas de plantas. Pela regulamentação da ANVISA, eles nunca podem estar misturados a princípios ativos sintéticos, vitaminas ou minerais. E as mesmas normas aplicadas para a produção de medicamentos devem ser seguidas para a de fitomedicamentos, como a comprovação de eficácia e de segurança. Em testes clínicos, o Acheflan® demonstrou ser tão eficaz e seguro para os casos de tendinite crônica e dor miofascial quanto o principal antiinflamatório do mercado, que tem como princípio ativo o diclofenaco dietilamônio (RAMOS *et al.* 2005).

Os estudos para o desenvolvimento de Acheflan® levaram sete anos e mais de R\$ 15 milhões de investimentos em pesquisa, e foram conduzidos em parceria com quatro importantes universidades do País (UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina, Unifesp-Universidade Federal de São Paulo, PUC-Campinas- Pontifícia Universidade Católica de Campinas e Unicamp-Universidade Estadual de Campinas). A pesquisa sofreu um grande avanço com a descoberta de que o α -humuleno e o trans-cariofileno são os responsáveis pela ação antiinflamatória, e não a artemitina como indicava a literatura (GREGÓRIO *et al.* 2005).

Após o sucesso do Acheflan®, hoje líder no segmento de antiinflamatórios tópicos sob prescrição médica, o Aché Laboratórios lança a versão Aerosol do medicamento, indicado para o tratamento de traumas, dores musculares e tendinites. O Acheflan Aerosol® chega ao mercado com diversas vantagens, entre elas a absorção mais rápida, de cerca de 30 minutos, e a praticidade do uso. Os estudos realizados mostram que os pacientes tratados com α -humuleno tiveram alívio mais rápido da dor e inflamação e um tratamento mais eficaz do que aqueles que

utilizaram o diclofenaco dietilamônico (GREGÓRIO *et al.* 2005). Na Figura 1 é apresentada uma foto do creme Acheflan.



Figura 1: Foto do creme Acheflan.
Fonte: (GREGÓRIO *et al.* 2005).

Assim, em conseqüência da expressiva demanda do mercado mundial de medicamentos fitoterápicos as pesquisas têm validado cientificamente muitas espécies vegetais (GRUWALD, 1998). O interesse das grandes empresas farmacêuticas por esse mercado certamente irá resultar a curto e médio prazo, em melhoria substancial da qualidade desses produtos, bem como na provável confirmação da eficácia clínica e da segurança dos mesmos, pelo fato delas possuírem larga experiência no desenvolvimento de medicamentos, sobretudo, por possuírem recursos para custear esses estudos (CALIXTO *et al.* 2000).

3.2 *Cordia verbenacea* DC. – erva baleeira

A família Borraginaceae possui cerca de 100 gêneros e 2000 espécies distribuídas por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais, sendo que o gênero *Cordia* L. é o melhor representado no Brasil (AKISUE *et al.* 1983).

Segundo os registros existentes, a *Cordia verbenacea* foi catalogada cientificamente em 1845, mas há certa confusão sobre as datas. Em 1819, foi realizada a identificação de uma planta chamada *Cordia curassavica*, mas até pouco tempo atrás algumas classificações consideravam as duas plantas como uma única espécie. A confusão acontece porque ambas as espécies são muito parecidas, mas somente a *Cordia verbenacea* tem propriedades antiinflamatórias (RAMOS *et al.* 2005).

A *Cordia verbenacea* DC. é uma planta da família das Borraginaceae, encontrada nas restingas marítimas de quase todo o

litoral brasileiro, sendo mais comumente encontrada no trecho compreendido entre os Estados de Santa Catarina e São Paulo. Popularmente recebe nomes como erva baleeira, catinga-de-barão, catinga-de-mulata, salicilina e maria-pretinha. Estudos indicam que esta planta contém substâncias antiinflamatórias cuja efetividade e reduzidos efeitos colaterais a colocam como uma alternativa segura e eficaz no tratamento tópico de inflamações. Tanto óleos essenciais como flavonóides, com atividade antioxidante e antiinflamatória, concentram-se nas folhas da erva-baleeira que, dentre outras substâncias, contém em seus extratos o α -humuleno, um sesquiterpeno indicado como o princípio ativo da *C. verbenacea* responsável por sua ação antiinflamatória (CARVALHO *et al.* 2004; SERTIÉ *et al.* 2005).

Ensaio farmacológico dos extratos de erva baleeira obtidos por métodos convencionais confirmaram as propriedades medicinais como as ações anti-úlceras, antiinflamatória e cicatrizante (SERTIÉ *et al.* 2005; TICLI *et al.* 2005). Esta planta é muito utilizada na medicina popular devido as suas propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes e também empregada para o tratamento de artrite, reumatismo, tendinite, dores musculares e contusões.

A erva baleeira é um arbusto que atinge entre 1,5 e 2 metros de altura, as folhas alcançam cerca de 10 cm de comprimento, são ásperas, com odor forte e persistente. A planta é muito ramosa, possui arquitetura esganhada e caótica e hastes revestidas por casca fibrosa (RAMOS *et al.* 2005). As inflorescências surgem nas extremidades dos ramos, em forma de espigas curvadas para baixo, com flores brancas e miúdas. Os frutos, quando maduros, são vermelhos e medem aproximadamente 0,4 cm. A Figura 2 apresenta uma foto da planta.



Figura 2: Erva baleeira com detalhe da floração.

Fonte: www.jardimdeflores.com.br.

Passos *et al.* (2007), realizaram hidrodestilação durante 4 h com um aparato do tipo Clevenger de folhas frescas de *Cordia verbenacea* coletadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Neste estudo foram investigadas as propriedades antiinflamatória e anti-alérgica do óleo essencial e também os princípios ativos. Os autores demonstraram que o óleo essencial quando administrado por via oral em modelo animal exibiu um pronunciado e durável efeito antiinflamatório, e também mostraram evidências convincentes de que este efeito está relacionado a presença de compostos como α -humuleno e trans-cariofileno.

Ticli *et al.* (2005), coletaram folhas de *Cordia verbenacea* em Ribeirão Preto- SP, e realizaram a maceração em clorofórmio seguida de metanol, e após filtração e evaporação obtiveram o extrato metanólico, que a análise por HPLC indicou como princípio ativo o ácido rosmarínico, que os autores consideraram como o responsável pela eficiência antiinflamatória da planta. O extrato metanólico inibiu o edema de pata induzido por *B. jararacussu*, indicando que a planta possui considerável potencial de atividade antiofídico. Este estudo foi o primeiro a reportar a presença de ácido rosmarínico na espécie *C. verbenacea* e os autores conferem a este composto a eficiência desta planta quanto as suas propriedades antiinflamatória e antimiotóxica contra veneno de cobra e toxinas isoladas.

Sertié *et al.* (2005), realizaram a maceração em etanol (70%) de folhas frescas de *C. verbenacea* coletadas no mês de março na Praia Grande em SP, o extrato foi avaliado em vários modelos animais, sendo testado tanto a administração tópica quanto oral para avaliar a atividade antiinflamatória e analgésica. A administração tópica do extrato inibiu o edema induzido por nistatina, sendo que a dose efetiva foi de 4,56 mg/kg. A administração oral do extrato inibiu o edema causado por miconazole, sendo que a dose de 1,24mg/kg produziu um efeito inibidor significativo.

Quispe-Condori *et al.* (2007), obtiveram extratos supercríticos com CO₂ de erva baleeira nas condições de 100 a 300 bar e de 30 a 40°C onde o maior rendimento de 4,25% foi obtido na condição de 300bar e 50°C. O extrato obtido por soxhlet com etanol apresentou rendimento de 8,13% e na hidrodestilação o rendimento foi de 0,55%. A atividade anti-cancerígena dos extratos supercríticos variou com as condições operacionais de temperatura e pressão. O efeito citostático (inibição do crescimento das células) foi observado para concentrações

de extrato maiores que 0,25 µg/mL. Os extratos apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra *M. tuberculosis*. O componente majoritário identificado em todos os extratos foi o β-cariofileno.

Quispe-Condori *et al.* (2008), quantificaram o conteúdo de β-cariofileno para comparar diferentes métodos de extração. O óleo volátil obtido por hidrodestilação apresentou a menor pureza de β-cariofileno (21,8%) enquanto que na fração obtida na ESC realizada a 60°C /80bar a pureza foi de 33,33%. O rendimento de β-cariofileno foi maior na condição de 60°C /200bar, mas no entanto a sua pureza menor do que a 60°C /80bar. A pureza do composto diminuiu drasticamente com o aumento da densidade do CO₂ pois, diminui a seletividade do processo.

Sertié *et al.* (1990, 1991), identificaram no extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea* alguns flavonóides como quercetina, artemetina e hidroxiartemetina, além de mucilagens, taninos e óleo essencial. Sertié *et al.* (1988), relataram que o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *C. verbenacea* exibiu atividade antiinflamatória, aliada a um importante efeito protetor da mucosa gástrica e uma toxicidade muito baixa quando administrado por via oral em camundongos.

3.3 Radicais livres

O oxigênio está relacionado a condições de vida aeróbia e como molécula que mantém o metabolismo e viabilidade celular. Também é responsável pela degradação química de inúmeras macromoléculas existentes no sistema biológico, e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). De todo o oxigênio disponível para a célula, 95 % se transforma em energia e 5 % em espécies de oxigênio reativas e tóxicas (DAVIES, 1994).

Nos átomos, os elétrons ocupam uma região no espaço conhecida como orbital. Cada orbital pode ter, no máximo, dois elétrons com spins em direções opostas. Para que uma molécula permaneça estável, é necessária a presença de elétrons pareados em sua órbita externa. Entretanto, essa falta de paridade forma uma molécula altamente instável, geralmente de vida média curta, o radical livre. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres são formados durante processos fisiológicos comuns, podendo as ERO's serem produzidas no citoplasma, nas

mitocôndrias durante o processo respiratório ou na membrana, e componentes celulares como, lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA são alvos do dano oxidativo mediado por ERO's (NORDBERG & ARNER, 2001).

As espécies reativas biológicas podem ser classificadas em espécies reativas de oxigênio (ERO's), como já foi mencionado, e espécies reativas de nitrogênio (ERN's), de acordo com as moléculas a partir das quais foram originadas. Exemplos de radicais livres derivados do oxigênio incluem os radicais superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^\cdot), hidroperóxil (HOO^\cdot), peróxil (ROO^\cdot) e alcóxil (RO^\cdot). Outras espécies reativas comuns do nitrogênio, (ERN's) produzidas no corpo humano incluem o óxido nítrico (NO^\cdot) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^\cdot). Radicais livres reagem rapidamente com outros compostos, tentando capturar os elétrons necessários para ganhar estabilidade. Geralmente os radicais livres atacam as moléculas estáveis mais próximas, seqüestrando seus elétrons. Quando a molécula que está sendo atacada perde seu elétron, ela própria torna-se um radical livre, iniciando uma reação em cadeia (GÓMEZ, 2003; KAUR *et al.* 2001).

Os radicais livres podem ser produzidos através de fontes endógenas e exógenas e esses são metabolizados no organismo pelo sistema antioxidante enzimático (por ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase) ou, também podem ser neutralizados através de substâncias antioxidantes não enzimáticas (como tocoferóis, ácido ascórbico e carotenos).

Os efeitos dos radicais livres sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas no organismo e ao envelhecimento precoce. Várias pesquisas têm demonstrado a participação dos radicais livres na etiologia de algumas patologias de elevada incidência na população ocidental. Assim, qualquer substância que demonstre ter a capacidade de neutralização destes radicais, torna-se um alvo importante, já que pode prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies reativas no organismo (CARBONARI, 2005).

Em sistemas alimentícios, os radicais livres podem atacar ligações insaturadas de moléculas lipídicas, proteínas, carboidratos, e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, off-flavors, e perda de valores nutritivos e vida de prateleira dos produtos (LOULI, 2004).

Para minimizar os efeitos associados à constante formação das ERO's, os organismos aeróbios foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar radicais livres antes do ataque às células e aos alvos biológicos. Antioxidantes neutralizam radicais livres doando um de seus próprios elétrons, finalizando a reação seqüestrando de elétrons. Assim eles são bem definidos como substâncias que são capazes de quelar ou estabilizar radicais livres (KAUR *et al.* 2001; ATOUI *et al.* 2005).

3.4 Antioxidantes

Uma substância é considerada antioxidante quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, é capaz de inibir ou retardar significativamente a oxidação deste substrato (RICE-EVANS *et al.* 1997). Antioxidantes também podem ser definidos como compostos naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que tem propriedades de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2003).

Compostos antioxidantes são usualmente empregados na indústria de alimentos para prevenir alterações indesejáveis devido a reações de oxidação. Os antioxidantes também desempenham um papel importante no metabolismo humano. Normalmente o corpo humano mantém um equilíbrio entre a quantidade de antioxidantes e iniciadores da oxidação (i.e. radicais livres) por produção simultânea de ambos, como resultado de processos metabólicos. Quando um desequilíbrio desses dois tipos de compostos se faz presente, um fenômeno conhecido como “estresse oxidativo” é induzido. Esse fenômeno acredita-se, seja uma importante parte do processo de envelhecimento natural, e desempenha um papel significante em alguns problemas de saúde como aterosclerose, reumatismo, câncer, mal de Parkinson, anemia (YEPEZ *et al.* 2002).

Há duas categorias básicas de antioxidantes: sintética e natural. Atualmente, existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, embora tenham que cumprir certos requisitos para seu uso em alimentos, sendo um deles a segurança para a saúde (GÓMEZ, 2003). Em geral, antioxidantes sintéticos são compostos com estruturas fenólicas que apresentam vários graus de substituição alquila, ao passo que antioxidantes naturais podem ser: compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides, e ácidos

fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas), ou carotenóides, bem como ácido ascórbico. Embora os antioxidantes sintéticos (butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT)) sejam efetivos, atualmente o uso de antioxidantes sintéticos é restrito em muitos países, devido aos seus possíveis efeitos indesejáveis à saúde humana (razões toxicológicas), tais como carcinogenicidade (ZHENG *et al.* 2001). Como resultado, há um grande interesse de se obter e utilizar antioxidantes de fontes naturais (FUKUMOTO *et al.* 2000; LEAL *et al.* 2003) porque eles são presumidamente seguros desde que originados de plantas (HRAS *et al.* 2002; LOULI, 2004).

Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutos, folhas e raízes. Esses compostos incluem flavonóides, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, fosfolipídios, ácidos orgânicos polifuncionais e também extratos de plantas (GÓMEZ, 2003; KAUR *et al.* 2001; RIBEIRO *et al.* 2001). Os mais importantes explorados comercialmente são os tocoferóis, ácido ascórbico e recentemente alguns extratos de plantas como alecrim, sálvia, chá verde, etc. (BANDONIENE *et al.* 2002; MATTEA *et al.* 2004). Entre os antioxidantes presentes nas frutas, vegetais e cereais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos principalmente a classe dos flavonóides.

Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e até o momento são conhecidos mais de 4200 flavonóides. São polifenóis derivados da γ -cromona (benzo - γ - pirano) com um fenil na posição 2. Os átomos de carbono dos núcleos A, B e C recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e seguidos de uma linha (') para o núcleo B conforme Figura 3 (ZUANAZZI *et al.* 1999).

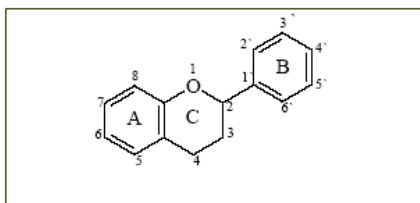


Figura 3: Núcleo fundamental dos flavonóides.

Os antioxidantes são compostos que contêm diferentes grupos químicos e têm diferentes estruturas e propriedades. Para extrair e manipular essas substâncias complexas, um solvente capaz de extrair diferentes grupos de compostos é necessário. O dióxido de carbono (CO₂) supercrítico parece ser o solvente ideal neste campo devido às condições de temperatura suaves empregadas no estágio da extração. Deste modo, a degradação térmica e a decomposição de compostos termolábeis são evitadas devido a operação ser realizada a baixas temperaturas e na ausência de luz e oxigênio prevenindo reações de oxidação. Este último ponto tem especial interesse para extração de compostos antioxidantes garantindo a conservação de suas propriedades biológicas (CORTESI *et al.* 1999; DÍAZ-REINOSO, *et al.* 2006).

3.5 Polifenóis

O potencial benéfico dos componentes fenólicos, presentes estruturalmente nos flavonóides, está primariamente relacionado à sua capacidade em seqüestrar espécies reativas de oxigênio (ERO's) nos sistemas biológicos (DRAGSTED *et al.* 1993). No entanto, a vasta gama de pesquisas realizadas com estes compostos têm apontado inúmeros efeitos biológicos, os quais vão muito além desta atividade. Os principais efeitos promovidos pelos compostos fenólicos são: atividade vasodilatadora, antiviral, antialérgica, ação antiinflamatória, inibição da oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade - colesterol ruim), redução da agregação plaquetária, inibição do crescimento de células cancerígenas e atividade de antiproliferação de células de tumores (VILLANÓ *et al.* 2006; ANDRIAMBELOSON *et al.* 1997; SCHULDT *et al.* 2000; FRANKEL & MEYER. 1998; CÉTKOVI *et al.* 2004).

Compostos fenólicos também têm sido estudados devido a sua relação com a ação de proteção no organismo contra doenças cardiovasculares e degenerativas (VILLANÓ *et al.* 2006). A literatura relata que extratos contendo compostos polifenólicos atuam como “scavengers” (seqüestradores) de radicais livres, bem como antilipoperoxidantes. Componentes fenólicos possuem uma variedade de inibidores da lipoxigenase, potencialmente benéficos, além de propriedades antioxidantes. Em virtude de tais achados, eles têm sido usados para tratamento de doenças antiinflamatórias (TROUILLAS *et al.* 2003).

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes

oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioleta, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos num elevado número de patologias, tais como arteriosclerose e câncer. Dado que não podem ser sintetizados pelo nosso organismo, são obtidos através da dieta humana, pela ingestão de alimentos que os contenham ou através de suplementos nutritivos. Exemplos de fontes de flavonóides são frutas, verduras, vinho, chá verde, chá preto e soja (MARTÍNEZ-FLORES, 2002).

Inúmeras funções são atribuídas aos flavonóides: ação antiinflamatória, antioxidante, estrogênica, antitumoral, antiviral, antiespasmódica, aumento da resistência da parede de vasos sanguíneos e diminuição de riscos de doenças coronarianas (HARBONE *et al.* 2000).

3.6 Plantas medicinais como antiinflamatórios

A literatura mostra que vários fármacos antiinflamatórios apresentam um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade. Entre tais fármacos pode-se citar o nimesulide, aminosalicilatos, salicilato de sódio e ácido acetil salicílico, glicocorticóides (FACINO *et al.* 1993; MILES e GRISHAM, 1994; KOPP e GOSH, 1994 in SIES, 1993) dentre outros fármacos.

Desta forma, é interessante estudar produtos naturais como extratos obtidos de plantas medicinais tradicionais, que têm a indicação de propriedades antiinflamatórias, mas que não se pode afirmar que também possuam um mecanismo de atividade antioxidante sem a realização de testes apropriados para se fazer esta possível afirmação.

Nardi *et al.* (2002), avaliaram a atividade antiinflamatória de cascas de uma árvore conhecida por pau-Andrade (*Cróton celtidifolius*), e correlacionaram com o efeito antioxidante, estudos fitoquímicos mostraram alto conteúdo de flavonóides, os quais reduziram a oxidação, verificado através do ânion superóxido e do teste de peroxidação lipídica.

Pérez-Garcia & Marin (1996), relataram, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, a diminuição do estresse oxidativo causado pelo extrato aquoso de *Pucea sagittalis* (planta medicinal popularmente utilizada na América do Sul), que ocasionou o controle da inflamação pela inibição da atividade de ERO's.

A partir da indicação popular e dos relatos da literatura do uso da espécie *Cordia verbenacea* como antiinflamatória, optou-se em analisar,

neste trabalho a possível correlação entre atividade antioxidante e antiinflamatória dos extratos obtidos através de diferentes técnicas de extração da referida planta empregando ensaios biológicos *in vitro*.

3.7 Atividade Antimicrobiana

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos.

Das 400.000 a 500.000 espécies de plantas existentes no globo, somente uma pequena porcentagem tem sido estudada em suas propriedades fitoquímicas (HOSTETTMANN *et al.* 1997) e menor ainda tem sido a parcela destinada à investigação de atividade antimicrobiana.

Embora os antibióticos de origem microbiana já venham sendo utilizados na prática médica desde os anos 40, o uso de antimicrobianos derivados de plantas ainda é incipiente. Portanto, muitas são as razões que estimulam os estudos sobre a triagem de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir de fitoquímicos. Dentre essas, podemos citar, ainda, o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tradicionais e a maior sensibilidade de pacientes tratados com drogas imunossupressoras às infecções fúngicas e bacterianas (COWAN, 1999).

A erva baleeira foi investigada quanto a sua atividade antimicrobiana por Carvalho *et al.* (2004) que realizaram hidrodestilação (usando Clevenger) de uma amostra coletada no mês de abril em Bragança Paulista, SP. Quando utilizadas as flores, frutos, folhas e caule o rendimento de óleo essencial foi de 0,19% e ao se utilizar apenas as folhas o rendimento foi de 0,23%. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas detectou a presença de α -humuleno (4,64%) e o óleo essencial mostrou ser composto principalmente por mono e sesquiterpenos como α -pineno (29%) e trans-cariofileno (25%). A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que as bactérias Gram-positivas tiveram o crescimento inibido em 88%, leveduras 93%, e a maioria das bactérias Gram-negativas foram resistentes.

Kitzberger *et al.* (2007), testaram extratos de cogumelo shiitake obtidos com solventes orgânicos como etanol, diclorometano e acetato

de etila e extratos obtidos por extração supercrítica (ESC) com CO₂ e também ESC + co-solvente contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*), Gram-negativas (*E. coli*) e a levedura *Cândida albicans*. Os extratos obtidos com solventes orgânicos não apresentaram atividade antimicrobiana para os microorganismos testados. Os extratos supercríticos foram mais efetivos contra o crescimento microbiano das bactérias *M. luteus* e *B. cereus* que são Gram-positivas. Para o fungo testado somente o extrato obtido na menor pressão (150 bar) apresentou atividade contra *C. albicans*. Podemos então destacar que a ESC demonstrou ser uma técnica mais seletiva para obtenção de compostos capazes de influenciar o crescimento de bactérias e fungos responsáveis por danos a saúde, principalmente bactérias Gram-positivas.

Neste trabalho é avaliada a atividade antibacteriana de extratos de erva baleeira obtidos a partir de ESC e também extração com solventes orgânicos. Maiores detalhes sobre as técnicas empregadas nestas análises serão discutidos na seção 4.10 do item Material e Métodos.

3.8 Fluidos Supercríticos

Fluidos supercríticos (FSC) são definidos como qualquer substância mantida acima da sua temperatura e pressão crítica. A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido. Acima do ponto crítico, as propriedades do líquido e do gás se tornam idênticas, e este gás, altamente denso, é denominado fluido supercrítico (ARAÚJO, 1999). Na região acima do ponto crítico, uma pequena mudança na temperatura e pressão do sistema pode provocar uma grande variação nas propriedades do solvente, aumentando ou diminuindo o seu poder de solvatação. O FSC possui algumas propriedades intermediárias entre gás e líquido. A sua difusividade pode ser da ordem de até duas magnitudes maior do que a de líquidos e a sua densidade possui valores próximos à densidade dos gases, facilitando a transferência de massa e tornando a extração mais rápida do que quando utilizamos líquidos convencionais. Além disso, a baixa viscosidade e a baixa tensão superficial permitem que o solvente supercrítico penetre facilmente na matriz vegetal solubilizando o(s) componente(s) a serem extraídos (LEAL *et al.* 2003; BERNARDO-GIL *et al.* 2002).

Os valores de densidade podem ser alterados com pequenas variações na pressão e/ou temperatura, permitindo o fracionamento do extrato. Na zona próxima do ponto crítico é onde se produzem, com pequenas alterações de pressão e temperatura, as maiores variações da densidade do fluido supercrítico, e por consequência do seu poder solvente (BERNARDO-GIL *et al.* 2002).

O dióxido de carbono - CO₂ é o fluido supercrítico mais utilizado como solvente na obtenção de extratos de produtos naturais, principalmente para as indústrias de alimentos e farmacêutica. Ele é inerte, seu custo é relativamente baixo, está facilmente disponível em alta pureza, é inodor, atóxico, não inflamável e pode ser facilmente removido do produto final, sem deixar resíduos. Além disso, apresenta temperatura e pressão críticas relativamente baixas (T_c = 31,1 °C e P_c = 73,8 bar) (BERNARDO-GIL *et al.* 2002).

A facilidade de extração de compostos com CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais individuais nesses compostos, do seu peso molecular e de sua polaridade. Hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos com polaridade relativamente baixa, como por exemplo, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e lactonas são extraídos com CO₂ supercrítico a baixas pressões, em torno de 75 e 100 bar, onde substâncias moderadamente polares, como derivados de benzeno com um grupo carboxílico e dois grupos hidroxilas, são moderadamente solúveis. Compostos altamente polares, com um grupo carboxílico e três ou mais grupos hidroxilas são pouco solúveis. Para a extração de certa classe de compostos, o uso de co-solvente junto ao CO₂ supercrítico é necessário para aumentar a polaridade e poder de solvatação do solvente. Etanol, acetato de etila e água são os co-solventes mais utilizados para obter produtos para a indústria de alimentos (MUKHOPADHYAY, 2000).

3.9 Extração Supercrítica

Dentre as técnicas de extração comumente empregadas citamos os processos convencionais, representados por arraste a vapor e extração com solventes orgânicos, operações possivelmente responsáveis pela degradação térmica de componentes termolábeis presentes na matéria-prima e pela contaminação do extrato com resíduos de solvente, normalmente empregado em quantidades excessivas. Aliado à isto, a competitividade da área de compostos com atividade terapêutica, que tem como fatores fundamentais a conquista de mercados, a qualidade, a

disponibilidade e o preço, sinaliza para o emprego de técnicas modernas de extração, como a extração supercrítica (ESC), que se destaca por representar uma tecnologia que minimiza danos ao meio ambiente e que vem se desenvolvendo continuamente nas últimas décadas (MACHMUDAH *et al.* 2006, CASAS *et al.* 2007).

A extração supercrítica (ESC) é um método alternativo de extração, considerado como uma inovação tecnológica, pois utiliza fluidos supercríticos como solventes e seu emprego em processos industriais vem ganhando espaço continuamente, principalmente devido aos fatores ambientais e de qualidade envolvidos. Trata-se de um processo livre de resíduos tóxicos, que não provoca a degradação térmica dos extratos e não requer grandes gastos com energia, como ocorre em processos de destilação. Além disso, proporciona uma melhor seletividade e eficiência ao processo e o solvente pode ser facilmente removido no final da extração. Assim, o emprego de fluidos supercríticos tem sido considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, particularmente para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (PEREIRA *et al.* 2004; BRUNNER, 1994).

3.9.1 Processo de Extração Supercrítica em Leito Fixo

Na extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, é utilizado um extrator em leito fixo, onde o leito é formado pelo material vegetal. Na extração o solvente supercrítico escoar através do leito de partículas sólidas, solubilizando os componentes presentes no sólido. Conforme o solvente escoar através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluída, e em qualquer ponto dentro do extrator a concentração de óleo na fase sólida e fluída varia continuamente até que o equilíbrio seja alcançado. A concentração dos compostos solubilizados aumenta na direção do fluxo do solvente supercrítico. Como o leito permanece fixo, a concentração do extrato na fase fluída varia com o tempo e a posição, desta forma o processo ocorre em regime transiente. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e através da depressurização ocorre a separação (BRUNNER, 1994, MOURA, 2004).

O transporte de substâncias pode ocorrer no interior do sólido e através da fronteira ou superfície da estrutura do material, a qual difere de substrato para substrato. Durante os processos extrativos, a variabilidade de constituintes químicos detectados numa planta, seja

quantitativo ou qualitativo, depende de muitos fatores (RASKIN *et al.* 2002). O mesmo material da mesma espécie de planta difere, dependendo do período de colheita, das condições de tratamento após a colheita, idade e tratamento anterior a extração. Outros fatores, como pH do solo, condições de crescimento, nutrientes do solo, método de coleta (data, hora, etc.), parte da planta utilizada, fase de desenvolvimento no momento da coleta, secagem e transporte, interações entre plantas, presença de microorganismos, podem afetar diretamente a concentração dos compostos químicos de cada espécie (BAUER *et al.* 1996).

Ao mesmo tempo, o material sólido pode consistir de partículas de variadas formas e tamanhos sendo que a distribuição do tamanho das partículas pode ser muito variável. O leito de partículas pode formar diferentes geometrias e ainda alterações nesta durante o processo. Desta forma, uma grande variedade de parâmetros são relevantes para a modelagem do transporte de massa no substrato sólido. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície dos poros, no interior do sólido ou no interior das células das plantas. Cada uma destas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

Segundo Brunner (1994) a extração de compostos solúveis de um material vegetal consiste em vários e consecutivos passos:

1. A matriz vegetal absorve o solvente supercrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;
2. Em paralelo, ocorre a dissolução dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente;
3. Ocorre a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície;
4. Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;
5. Os compostos solubilizados são transportados da superfície para o seio do solvente supercrítico e são subsequentemente removidos com o solvente.

3.9.2 Mecanismos de Transporte de Sólidos

Quando um leito fixo de sólidos é colocado em contato com um fluxo de CO₂ os mecanismos de transporte de massa envolvem a difusão e adsorção do fluido supercrítico (FSC) seguido pela desorção do soluto, difusão através dos poros e transporte convectivo juntamente

com o FSC através do comprimento do leito. Mas o fator crucial é a distribuição inicial das substâncias extraíveis no interior da matriz sólida, que podem estar adsorvidas na superfície da partícula, na superfície dos poros, ou estar dissolvidas no citoplasma ou vacúolo no interior das células das plantas (BRUNNER, 1994 apud MUKHOPADHYAY, 2000).

O esquema da Figura 4 descreve os diferentes mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo de extração que implica numa seqüência de passos descritos a seguir:

- 1) Difusão do CO₂ no interior dos poros e adsorção do CO₂ na superfície do sólido;
- 2) Transporte de óleo à camada exterior e formação de uma película líquida fina ao redor das partículas sólidas;
- 3) Dissolução do óleo no CO₂ supercrítico;
- 4) Dessorção e difusão do soluto no FSC através dos poros;
- 5) Transporte convectivo do soluto pelo CO₂.

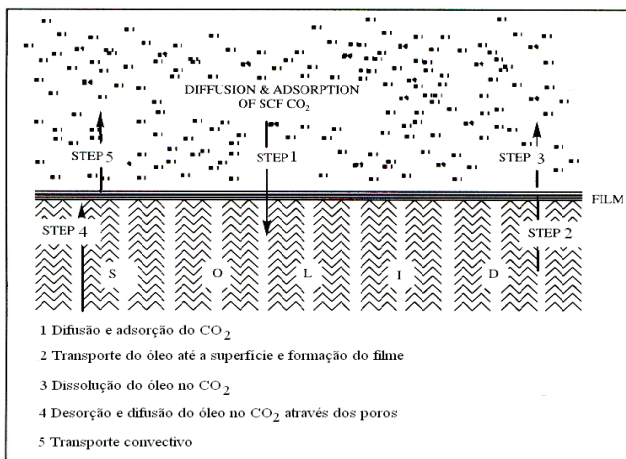


Figura 4: Esquema que descreve os mecanismos de transporte de sólidos pelos FSC.

Fonte: MUKHOPADHYAY, (2000).

O Passo 4 (dessorção e difusão do soluto no FSC através dos poros) é o mais longo de todos, pois quando há um filme líquido de óleo presente na superfície externa das partículas sólidas a transferência de massa ocorre em taxa constante dependendo da solubilidade do óleo no solvente e a taxa de transferência de massa é controlada pela resistência

ao filme externo. No entanto se não existe um filme líquido presente na superfície externa das partículas, então não ocorre um período de taxa constante de extração e a transferência de massa ocorre em taxa decrescente e é controlado pela resistência interna a difusão (MUKHOPADHYAY, 2000).

A ESC de produtos naturais como manjeriço, manjerona, alecrim mostra claramente que a extração de ceras cuticulares inicia com um período de taxa constante de extração, e após exibe um período de taxa decrescente de extração. Esta variação no comportamento da extração de dois tipos de produtos da mesma espécie botânica é atribuído ao fato que as ceras podem estar localizadas na superfície das folhas e deste modo a sua extração não é impedida pela difusão interna do substrato no sólido, resultando na transferência de massa com taxa constante de extração. Por outro lado, se os óleos essenciais estão distribuídos uniformemente no sólido nas células do material a sua extração é dificultada pela resistência intrapartícula devido a difusão do substrato no interior do sólido resultando num período de taxa decrescente de extração (REVERCHON *et al.* 1993 apud MUKHOPADHYAY, 2000).

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

3.9.3 Curvas de Extração

As curvas de extração são determinadas pela massa total de óleo extraído em função do tempo de extração. De acordo com a literatura as curvas de extração são em geral divididas em três etapas (FERREIRA & MEIRELES, 2002):

- 1) etapa de taxa de extração constante (CER): onde a superfície externa das partículas está completamente coberta de óleo,

- predomínio da transferência de massa devido à convecção na fase fluida;
- 2) etapa de taxa de extração decrescente (FER): onde aparecem falhas na camada superficial de óleo que cobre as partículas, tanto os efeitos convectivos na fase fluida quanto os difusionais na fase sólida determinam a velocidade do processo;
 - 3) etapa de taxa de extração controlada pela difusão no sólido: predomínio do fenômeno difusional.

As curvas de extração são obtidas através da seguinte relação:

$$m_{\text{ext}} = Q_{\text{CO}_2} \int_0^{t_{\text{TOTAL}}} Y(t) dt \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde: m_{extr} é a massa de extrato obtida em kg, Q_{CO_2} é a vazão de solvente em g/min, t é o tempo (min) e $Y(t)$ é a concentração de soluto na fase solvente em g.

3.9.4 Inversão das Isotermas de Rendimento

De acordo com Carvalho Jr. *et al.* (2003) sistemas formados por um soluto e um FSC (fluido supercrítico) apresentam um comportamento de inversão das isotermas de solubilidade. Este fenômeno, também chamado de retrogradação, representa a influência da pressão de vapor do soluto e do poder de solvatação do solvente no valor de solubilidade dos compostos no fluido supercrítico.

A solubilidade no fluido supercrítico é afetada pela pressão e temperatura de operação. A solubilidade aumenta com a pressão de operação a uma temperatura constante. Porém, o efeito da temperatura é mais complexo, pois surge o fenômeno de retrogradação, que indica a inversão das isotermas de solubilidade, e é representada pela influência da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente na solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Este comportamento ocorre nas proximidades do ponto crítico, onde pequenas alterações de temperatura e/ou pressão são acompanhadas por grandes variações de densidade do solvente. Em pressões mais elevadas o efeito dominante passa a ser a pressão de vapor do soluto, cujo aumento com a temperatura indica elevação da solubilidade do soluto no solvente. Os valores de pressão que indicam o efeito dominante sobre a solubilidade (densidade ou pressão de vapor) são função do sistema avaliado (soluto

e solvente) (MICHIELIN *et al.* 2005; LÓPEZ *et al.* 2004; LEAL *et al.* 2003).

Michielin *et al.* (2005), estudando a ESC de cavalinha observaram que a região da inversão das isothermas se encontra entre 120 e 150 bar, onde a 120 bar houve a predominância do efeito da densidade na solubilização da oleoresina e de 150 a 250 bar o principal efeito foi o da pressão de vapor, ou seja, a 120 bar o aumento da temperatura de 30°C para 40°C indicou a redução do rendimento, enquanto que acima de 150 bar observou-se um aumento de rendimento com a mesma variação de temperatura.

Almeida *et al.* (2007), realizaram extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata*) e observou que o fenômeno da retrogradação para as isothermas de 30, 40 e 50 °C ocorre em aproximadamente 155 bar. O rendimento diminui com o aumento da temperatura nas pressões abaixo de 155 bar, enquanto que nas pressões acima de 155 bar, o rendimento aumentou com o aumento da temperatura. Em seu trabalho com bagaço de maçã (*Malus comunis*), Ribeiro *et al.* (2007), encontraram a inversão das isothermas de rendimento na região de 200 bar.

3.9.5 Utilização de Co-solventes

O CO₂ tem sido o solvente de escolha para vários estudos de ESC devido às suas características de temperatura e pressão críticas amenas, ser atóxico e não-inflamável. No entanto o CO₂ supercrítico tem suas limitações em consequência da sua polaridade, pois comporta-se como um solvente lipofílico (apolar), sendo assim ele não é muito eficiente para extrair compostos polares. Desta forma, a adição de pequenas quantidades de solventes orgânicos denominados de modificadores ou co-solventes ao CO₂ supercrítico tem sido empregadas para aumentar a eficiência da extração. Os co-solventes podem atuar aumentando o rendimento e alterando a seletividade do processo através da mudança das características do solvente como a polaridade e interações específicas com o soluto como pontes de hidrogênio, também podem interagir com sítios ativos da matriz sólida a qual favorece o CO₂ para extrair eficientemente os compostos desejados (DÍAZ-REINOSO *et al.* 2006; TONTHUBTHIMTHONG *et al.* 2004).

Os modificadores têm diferentes propriedades físicas e químicas que podem conduzir a quebra das interações entre o soluto e a matriz sólida, como por exemplo, forças de van der Waals, e pontes de

hidrogênio. Os modificadores também podem alterar a matriz pelo inchamento, facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais até a superfície da matriz (HOLLENDER *et al.* 1997).

Diversos solventes orgânicos podem ser utilizados como co-solventes na ESC. O etanol é o solvente mais empregado, pois atende as exigências legais para o uso de solventes orgânicos em insumos para a indústria de alimentos.

Casas *et al.* (2007), avaliaram a extração supercrítica de *Helianthus annuus L.* com a adição de 5% de metanol, água e dimetil sulfoxido como co-solventes. Os melhores rendimentos de extração foram alcançados usando 5% de água como modificador. O autor explica que dependendo do tipo de matriz sólida e da afinidade do substrato pela matriz, o modificador pode influenciar a extração de três maneiras diferentes: (1) aumentando a solubilidade do substrato no fluido supercrítico em consequência das interações substrato-co-solvente na fase fluida; (2) facilitando a dessorção do substrato - as moléculas polares do co-solvente são capazes de reagir com a matriz competindo eficientemente com os sítios ativos da matriz pelo substrato; (3) e favorecendo o processo de difusão do substrato e a penetração do fluido supercrítico no interior da matriz pelo inchamento da matriz sólida.

Salgin (2007), avaliou o emprego de etanol como co-solvente para obtenção de óleo de sementes de jojoba nas concentrações de 2, 4 e 8 (% em volume) e constatou que a solubilidade do óleo aumentou com a concentração do co-solvente. O autor verificou que na pressão de 250 bar a solubilidade diminuiu com o aumento da temperatura de 70 a 90 °C. No entanto, nas pressões de 350 e 450 bar a solubilidade aumentou com a temperatura mostrando uma região de inversão das isotermas com o emprego de etanol como co-solvente.

3.10 Modelos Matemáticos

A extração de solutos presentes em uma matriz sólida, obtida de plantas medicinais, por exemplo, envolve uma fase sólida e uma fase fluida. Essa fase fluida compreende o fluido pressurizado e os solutos nele dissolvidos. A transferência de massa acontece entre essas duas fases e é representada por um balanço de massa para as substâncias transferidas e pelas relações de equilíbrio para a transferência de massa na interface entre as fases, sendo que os parâmetros de operação e as condições do pré-tratamento do sólido controlam o processo (BRUNNER, 1994).

Os modelos matemáticos permitem generalizar os resultados experimentais, que posteriormente poderão ser aplicados a novas condições de trabalho e/ou a outros materiais diferentes daqueles inicialmente pesquisados (RUIZ, 1999).

Neste trabalho a modelagem das curvas de extração de erva baleeira foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), modelo Logístico de Martínez *et al.* (2003), modelo de difusão de Crank (1975) apud Reverchon (1997), Tan e Liou (1989), Goto *et al.* (1993) e Esquível *et al.* (1999), através do programa Mass Transfer desenvolvido por Correia *et al.* (2006) disponível no LATESC. Também será ajustado o modelo de transferência de massa VTII desenvolvido por Brunner (1994) disponível no programa “Thermische Verfahrenstechnik VTII” desenvolvido pela Universidade Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH) da Alemanha (ZETZL *et al.* 2007).

Segundo Reverchon & De Marco (2006), os modelos matemáticos apresentados na literatura para representar as curvas de extração supercrítica podem ser classificados em três grupos: modelos empíricos, modelos baseados na analogia entre a transferência de massa e calor e modelos baseados na integração do balanço de massa.

Dentre os modelos matemáticos avaliados neste trabalho cinco deles são baseados na integração do balanço de massa diferencial: modelo de Sovová (1994); modelo logístico de Martínez *et al.* (2003), o modelo VTII (BRUNNER 1994), e os modelos que descrevem o processo de extração pelo mecanismo de dessorção como o proposto por Tan e Liou (1989) e o modelo de Goto (1993).

O modelo de Sovová (1994), considera a ESC dividida em três etapas: na primeira etapa há o óleo de fácil acesso (óleo exposto ou livre), onde a resistência à transferência de massa se encontra na fase solvente; na segunda etapa, o óleo de fácil acesso é esgotado no início do extrator e inicia o processo difusivo (extração do óleo de difícil acesso, do interior das partículas sólidas) e na terceira etapa ocorre o processo difusivo (esgotamento do óleo livre em toda a extensão do leito).

O modelo de Sovová (1994) foi empregado por FERREIRA (1996) para a modelagem das curvas de extração do óleo essencial de pimenta do reino, por MICHIELIN (2002) na avaliação do processo de extração da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*) e por CAMPOS *et al.* (2005) para descrever a extração de oleoresina de calêndula. Em todos estes estudos o modelo de SOVOVÁ (1994) apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

O modelo logístico de Martínez *et al.* (2003) foi desenvolvido a partir do balanço diferencial de massa na coluna de extração, considerando o extrato como uma mistura de classes de compostos com estrutura química similar, mas também pode ser aplicado a quaisquer dados experimentais, considerando o óleo como um único pseudocomponente.

Martínez *et al.* (2003), correlacionaram os dados das curvas de extração de gengibre utilizando o modelo logístico. Os autores aplicaram o modelo logístico considerando o soluto como um único componente e também como uma mistura complexa de compostos. Neste caso, a melhor correlação entre as curvas experimentais e as modeladas foi obtida utilizando o modelo logístico considerando o soluto como um único pseudocomponente.

Campos *et al.* (2005), utilizaram o modelo logístico considerando o extrato como um pseudocomposto para a modelagem das curvas de extração da oleoresina de calêndula obtendo um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

O modelo VTII (BRUNNER, 1994) considera fenômenos termodinâmicos, como o equilíbrio entre as fases sólida e fluida do sistema, e de transferência de massa, como dispersão axial, difusão na partícula e convecção na fase fluida. Brunner (1994), aplicou este modelo para representar as curvas de extração de teobromina a partir de cascas de semente de cacau. Os parâmetros de dispersão axial, coeficiente de difusão efetiva e coeficiente de transferência de massa foram ajustados às curvas experimentais. Com os valores obtidos o modelo representou bem os resultados das extrações realizadas em uma planta piloto.

O modelo de Tan e Liou (1989) considera a transferência de massa interfacial como um modelo cinético de primeira ordem, ou seja, a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida, sendo a transferência de massa interfacial representada pela constante de dessorção (k_d). Chassagnez-Méndez *et al.* (2000), aplicaram este modelo para descrever a extração com CO₂ supercrítico de óleo de *Curcuma longa L.*, obtendo um bom ajuste entre os dados experimentais e os modelados. Os autores observaram que o valor da constante de dessorção (k_d) é proporcional ao valor do rendimento da extração, ou seja, o valor de k_d aumenta com o aumento da pressão e diminui com o aumento da temperatura, para as faixas de T e P estudadas.

Araújo *et al.* (2000), aplicaram o modelo de Tan & Liou (1989) aos dados experimentais da ESC de óleo de pupunha e verificaram que o modelo se ajustou bem a algumas curvas de extração. Os autores verificaram que a constante de dessorção (k_d) é dependente da solubilidade do óleo no solvente, da temperatura do processo e do pré-tratamento da matéria-prima.

Sousa *et al.*, (2004), estudaram a extração de “canela de Cunhã”, nome popular dado à uma vegetação indígena (*Croton zehntneri* Pax et Ho) presente no nordeste brasileiro e que cresce junto à caatinga, com CO₂ supercrítico e modelaram as curvas de extração utilizando o modelo de Tan e Liou (1989) e compararam os resultados com outros modelos presentes na literatura como o modelo de Sovová (1994) e o modelo de Martínez *et al.* (2003) e constaram que o modelo de Tan e Liou (1989) apresentou os piores ajustes entre os dados modelados e os dados experimentais. Os autores observaram que o modelo superestimou os dados experimentais, ou seja, a massa de óleo extraída atingiu valores superiores aos valores da massa de óleo total existente na matriz sólida.

O modelo de Goto *et al.* (1993) descreve o processo de transferência de massa pelo mecanismo de dessorção do soluto da partícula para os poros seguido pela difusão do soluto no fluido supercrítico através dos poros. O modelo possui dois parâmetros ajustáveis: ϕ , relativo ao coeficiente global de transferência de massa e k , constante de equilíbrio de dessorção.

Carvalho Jr. (2004) aplicou o modelo de Goto *et al.* (1993) para descrever as curvas de extração de alecrim obtendo um bom ajuste aos dados experimentais, mas como o objetivo do seu trabalho era estudar o aumento de escala o autor menciona que os parâmetros deste modelo não estão diretamente relacionados com os coeficientes de transferência de massa e com a geometria do leito de extração o que inviabiliza a sua utilização para este fim.

Moura (2004) aplicou os modelos de Goto *et al.* (1993), Tan e Liou (1989) e Sovová (1994) para representar as curvas de extração de funcho com CO₂ supercrítico e observou que os modelos de Goto e de Tan e Liou apresentaram os melhores ajustes aos dados experimentais.

Também foi estudado o modelo proposto por Crank e apresentado por Reverchon (1997) que é baseado na analogia a transferência de calor. Este modelo trata as partículas sólidas como esféricas e considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, baseado na segunda lei de Fick, foi utilizado por Subra *et al.* (1998) para correlacionar a extração com fluido supercrítico de β -caroteno de

cenoura. Os resultados indicaram um bom ajuste entre os dados experimentais e os modelados.

Martínez (2002) modelou os dados de extração supercrítica de gengibre utilizando o modelo de Crank (1975) e concluiu que este modelo não proporcionou um bom ajuste, o que o levou a crer que o processo de ESC de gengibre não é controlado pela difusão em todo o período.

O modelo empírico de Esquível *et al.* (1999) é baseado na equação da cinética de crescimento microbiano de Monod e apresenta um parâmetro ajustável o qual leva em consideração tanto a influência termodinâmica quanto os fenômenos de transporte envolvidos.

Carvalho Jr. *et al.* (2000), modelaram as curvas de extração de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) com os modelos de Sovová, Crank, Tan e Liou, Goto, Martínez e Esquível (1999), e encontraram os melhores ajustes aos dados experimentais com os modelos de Sovová, Goto e Esquível.

A explicação detalhada sobre os modelos de transferência de massa encontram-se no Apêndice I que apresenta as equações de cada modelo bem como as suas considerações.

3.11 Equilíbrio de Fases

O equilíbrio de fases termodinâmico determina os limites para a transferência de massa entre diferentes fases, as quais estão envolvidas em diversos processos inclusive na extração com fluido supercrítico. O equilíbrio de fases revela a composição das fases no equilíbrio, incluindo a solubilidade dos compostos extraídos no solvente supercrítico e a solubilidade do solvente supercrítico na fase pesada; as quantidades das fases em equilíbrio; a distribuição dos componentes individuais entre as fases em equilíbrio e a variação dessas quantidades com T e P (BRUNNER, 1994).

3.11.1 Critérios do equilíbrio de fases

A condição de equilíbrio líquido-vapor é definida pelo mínimo de energia livre de Gibbs como condição necessária e suficiente e é fornecida pela igualdade de potenciais químicos em ambas as fases a uma dada temperatura e pressão, que através do formalismo da termodinâmica chega-se à igualdade das fugacidades do componente *i*:

$$\widehat{f}_i^V = \widehat{f}_i^L \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde:

\widehat{f}_i^V = fugacidade do componente i na fase vapor,

\widehat{f}_i^L = fugacidade do componente i na fase líquida.

O equilíbrio líquido-vapor pode ser interpretado através das abordagens “gama-fi” ($\gamma - \phi$) e “fi-fi” ($\phi - \phi$). Onde γ representa o coeficiente de atividade e ϕ representa o coeficiente de fugacidade (PRAUSNITZ *et al.* 1980). As abordagens diferem entre si em função de como é realizada a representação da fase líquida.

Na abordagem $\gamma - \phi$ a fase líquida é representada por modelos de energia livre de Gibbs em excesso (G^E), enquanto que a fase vapor é descrita por uma equação cúbica de estado. Esta é uma abordagem tradicional, que pode ser aplicada a uma ampla variedade de misturas, e são adequadas para sistemas a pressões baixas ou moderadas, embora não seja aplicada para sistemas a altas pressões. Esta limitação deve-se principalmente ao fato de que os modelos de (G^E) são baseados em misturas de líquidos puros determinados a baixas pressões (MOURA, 2004).

A abordagem $\phi - \phi$ é preferencialmente empregada para o cálculo do equilíbrio líquido-vapor a altas pressões, uma vez que ambas as fases são modeladas através de uma equação de estado e caracterizadas por seus respectivos coeficientes de fugacidade, garantindo a continuidade matemática do modelo no ponto crítico. A principal vantagem deste método é a aplicação a uma ampla faixa de pressões e temperaturas, além do estado de referência para a fugacidade (gás ideal) ser o mesmo para as duas fases. Devido a estas características, em aplicações com fluidos supercríticos, esta abordagem é preferencialmente utilizada (SANDLER, 1989). Esta abordagem foi empregada neste trabalho para o estudo da modelagem do equilíbrio de fases da erva baleeira e de seus componentes chave (α -humuleno e trans-cariofileno).

Nesta abordagem ambas as fases do sistema são representadas pelos coeficientes de fugacidades:

$$\widehat{f}_i^L = \widehat{\phi}_i^L x_i P \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$\widehat{f}_i^V = \widehat{\phi}_i^V y_i P \quad \text{Eq. 3.3}$$

logo,

$$\widehat{\phi}_i^L x_i = \widehat{\phi}_i^V y_i$$

onde: \widehat{f}_i^L é a fugacidade do componente i na fase líquida, \widehat{f}_i^V é a fugacidade do componente i na fase vapor, x_i é a fração molar na fase líquida do componente i , y_i é a fração molar na fase vapor do componente i , $\widehat{\phi}_i^V$ é o coeficiente de fugacidade na fase vapor do componente i e $\widehat{\phi}_i^L$ é o coeficiente de fugacidade na fase líquida do componente i .

As aplicações do método requerem uma equação de estado que possa representar adequadamente ambas as fases, como função da temperatura, pressão e composição química.

3.11.2 Equações de Estado Cúbicas para Modelagem Termodinâmica

O objetivo da modelagem termodinâmica é representar, através de um modelo matemático, o comportamento do equilíbrio de fases através das variáveis termodinâmicas envolvidas. Basicamente, são representadas as condições dos componentes de uma determinada mistura, em todas as fases que se encontram em equilíbrio, a uma determinada condição de temperatura e de pressão.

Extratos obtidos a partir de produtos naturais são misturas complexas de vários componentes, sobre os quais há uma grande escassez de informações experimentais, tornando difícil a análise termodinâmica dos processos de ESC, sobretudo, quando se leva em conta as altas pressões envolvidas. Grande parte das dificuldades na modelagem de processos de ESC podem ser contornadas através do uso de equações de estado adequadas para o tratamento termodinâmico dos materiais envolvidos (CARDOZO-FILHO, 1999 apud MATILHA *et al.* 2001).

Dentre as equações de estado disponíveis, as equações cúbicas são atualmente as mais importantes, em virtude da sua forma simples e da variedade de problemas, que podem ser tratados através do seu uso. As equações cúbicas de estado (EDE) de Peng-Robinson (P-R) e de

Soave-Redlich-Kwong têm sido exaustivamente empregadas na modelagem de problemas de equilíbrio de fases. É admirável que, apesar de sua simplicidade, as EDE possam ser usadas para prever o equilíbrio de fases para amplas faixas de temperatura e pressões e para uma grande diversidade de sistemas (SANDLER, 1994). As razões expostas são justificativas para o uso intensivo das EDE na modelagem termodinâmica de processos de extração com fluido supercrítico.

A equação cúbica de Peng-Robinson (1976) (Equação 3.4) é a mais empregada, tanto na academia como para a indústria. Equações cúbicas, tais como Peng-Robinson podem ser usadas para determinar os coeficientes de fugacidade de uma mistura.

$$P = \frac{RT}{V - b} - \frac{a(T)}{V(V + b) + b(V - b)} \quad \text{Eq. 3.4}$$

onde: P é a pressão do sistema; T é a temperatura; V é o volume molar; “a” é o parâmetro atrativo que leva em consideração as interações entre as espécies numa mistura; “b” é o parâmetro de correção do volume (volume excluído) em cujo cálculo devem ser levadas em consideração as diferenças no tamanho entre as espécies na mistura.

Os parâmetros ‘a’ e ‘b’, para substâncias puras são obtidos através do critério de estabilidade no ponto crítico (inclinação e curvatura num diagrama PV são iguais a zero), que se aplicado na equação (3.4) permite a obtenção das seguintes relações para os parâmetro de EDE de Peng-Robinson:

$$a(T_c) = 0,45724 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad \text{Eq. 3.5}$$

$$b = 0,07780 \frac{RT_c}{P_c} \quad \text{Eq. 3.6}$$

onde: R é a constante dos gases, T_c é a temperatura crítica e P_c a pressão crítica.

A forma da dependência do parâmetro ‘a’ com a temperatura, para a EDE de P-R é apresentada na equação que segue (SMITH & VAN NESS, 1987):

$$a(T) = a(T_c) \alpha(T_r, \omega) \quad \text{Eq. 3.7}$$

$$\alpha(T_r, \omega) = \left\{ 1 + km \left[1 - (T_r)^{1/2} \right] \right\}^2 \quad \text{Eq. 3.8}$$

onde: para a equação de P-R, temos:

$$km = 0,37464 + 1,54226\omega - 0,2699\omega^2 \quad \text{Eq. 3.9}$$

A função α representa a dependência do termo atrativo $a(T)$ em relação à temperatura do sistema:

$$\alpha(T_r) = \left[1 + f(\omega) \left(1 - \sqrt{\frac{T}{T_c}} \right) \right]^2 \quad \text{Eq. 3.10}$$

com $f(\omega)$ assumindo a forma de:

$$f(\omega) = 0,37464 + 1,54226\omega - 0,26992\omega^2 \quad \text{Eq. 3.11}$$

O cálculo dos coeficientes de fugacidade para ambas as fases pode ser realizado através da integração da seguinte equação (PRAUNITZ *et al.* 1999):

$$\ln \phi_i = \frac{1}{RT} \int_V^\infty \left(\frac{\partial P}{\partial n_i} \Big|_{T,V,n_{j \neq i}} - \frac{RT}{V} \right) dV - \ln \left(\frac{PV}{RT} \right) \quad \text{Eq. 3.12}$$

A abordagem ϕ - ϕ para predição do equilíbrio de fases, determina os valores do coeficiente de fugacidade através da equação (3.17), onde a EDE de P-R é empregada para avaliar o termo de variação da pressão com a composição da mistura. Assim, substituindo-se a equação (3.4) na equação (3.12), obtemos a seguinte expressão para o coeficiente de fugacidade:

$$\ln \phi_i = \frac{\bar{b}_i}{b} (Z-1) - \ln(Z-B) + \frac{A}{2\sqrt{2}B} \left(\frac{\bar{a}_i}{a} - \frac{\bar{b}_i}{b} \right) \ln \left(\frac{Z + (1 + \sqrt{2})B}{Z + (1 - \sqrt{2})B} \right) \quad \text{Eq. 3.13}$$

onde: os parâmetros 'a' e 'b' para componentes puros (a_i e b_i) são quantidades parciais molares que dependem da regra de mistura utilizada. Para o cálculo dos parâmetros a e b da Equação 3.4 geralmente empregam-se regras de mistura que são apresentadas a seguir.

3.11.3 Regras de Mistura

O cálculo do equilíbrio de fases de misturas com equações de estado é realizado através do emprego de regras de mistura para o cálculo dos parâmetros das equações de estado. As regras de mistura são relações que expressam a dependência com a composição dos parâmetros a e b da equação de estado. Existem diversas regras de mistura cuja complexidade aumenta com o caráter não ideal do sistema estudado.

As regras de mistura de van der Waals são quadráticas na composição e tem a seguinte forma:

$$a_m = \sum_{i=1}^{nc} \sum_{j=1}^{nc} x_i x_j a_{ij} \quad \text{Eq.3.14}$$

$$b_m = \sum_{i=1}^{nc} \sum_{j=1}^{nc} x_i x_j b_{ij} \quad \text{Eq.3.15}$$

onde: nc é o número de componentes da mistura, a_{ij} e b_{ii} são os parâmetros dos componentes puros, x_i e x_j são as frações molares e a_{ij} e b_{ij} ($i \neq j$) são os parâmetros cruzados, relacionados com os parâmetros dos componentes puros.

A modificação mais simples da regra de mistura de van der Waals é através da utilização de dois parâmetros de interação binária nas regras combinadas, ou seja, a adição de um termo ajustável (l_{ij}) para b_{ij} . As equações para os parâmetros cruzados são, então representadas por:

$$a_{ij} = a_{ji} = \sqrt{a_{ii} a_{jj}} (1 - k_{ij}) \quad \text{Eq. 3.16}$$

$$b_{ij} = b_{ji} = \left[\frac{(b_{ii} + b_{jj})}{2} \right] (1 - l_{ij}) \quad \text{Eq.3.17}$$

onde: k_{ij} e l_{ij} são parâmetros de interação binária entre os componentes de uma mistura. O parâmetro k_{ij} está associado à energia de atração entre as moléculas da mistura (a_{ij}) e o parâmetro l_{ij} está associado à energia de repulsão entre tais moléculas (b_{ij}).

Os parâmetros (k_{ij} e l_{ij}) são obtidos através de regressão de dados experimentais de equilíbrio de fases, para os binários (ij). A introdução de um segundo parâmetro (l_{ij}) na regra de mistura clássica, melhora a descrição de sistemas que apresentam grandes diferenças de tamanho entre as moléculas.

A seguir são apresentados os Materiais e Métodos utilizados na elaboração deste trabalho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

A planta erva baleeira (*Cordia verbenacea*), empregada neste estudo foi coletada na Praia da Barra de Ibiraquera, Imbituba, SC, no mês de abril de 2006. Foi realizada uma coleta para material testemunho, denominada de E. M. Z. Michielin 1, identificada pela Profa. Dra. Ana Zanin do Laboratório de Sistemática do Departamento de Botânica da UFSC e incorporado ao acervo do Herbário FLOR daquele Departamento com número de tomo 34.672.

O material coletado para a realização deste trabalho consistiu de caules e folhas, os quais foram separados, os caules foram desprezados e as folhas lavadas em água corrente para eliminar poeira e maresia. As folhas foram depositadas sob papel toalha para eliminar o excesso de água e em seguida conduzidas à estufa para secagem na condição de 45°C por 14 horas. O material seco foi triturado em moinho de facas de aço inox (Marconi, Piracicaba) com uso de malha 20 mesh. Em seguida, o material foi acondicionado em saco plástico, e armazenado em freezer doméstico (Brastemp, 260L, Brasil) a temperatura de aproximadamente -18°C.

4.2 Caracterização da matéria-prima e leito de partículas

A caracterização do leito de partículas representa a determinação das características físicas das partículas e do leito de sólidos, como a umidade da matéria-prima, avaliação da distribuição do tamanho de partículas, diâmetro médio das partículas, densidade real, densidade aparente do sólido e a porosidade do leito. Estes dados são utilizados para a avaliação das propriedades de transporte, utilizadas na modelagem matemática das curvas de extração.

4.2.1 Determinação do teor de Umidade e Voláteis

Utilizou-se a metodologia da AOAC (2005) cujo método fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 105°C. Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra em cápsula de alumínio tarada, previamente aquecida em estufa a 105°C por 1 h, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Posteriormente foi aquecida em estufa a 105°C por 3 h, resfriada em

dessecador até temperatura ambiente e pesada. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento em intervalos de meia hora, até peso constante. Estas determinações foram feitas em triplicata.

Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, a seguinte equação foi empregada:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade\%} \quad \text{a } 105 \text{ } ^\circ\text{C p/p}$$

onde: N é a perda de peso em g e P é o número de gramas de amostra.

4.2.2 Distribuição Granulométrica

A matéria-prima moída em moinho de facas (mesh 20) foi classificada em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras, SP) para determinação da distribuição do tamanho de partículas. Foram utilizadas peneiras com mesh 20, 32, 48, 65, 80, 100 e fundo. As massas retidas sobre as peneiras foram pesadas para posterior cálculo do diâmetro médio de partícula. A maior parte da matéria-prima ficou retida entre as granulometrias de -20+65 mesh, assim utilizou-se estas frações para a realização dos experimentos e as frações retidas nas peneiras de mesh 80, 100 e fundo foram desprezadas.

4.2.2.1 Determinação do Diâmetro Médio das Partículas

Uma quantidade de $174,97 \pm 0,01$ gramas de folhas de erva baleeira moídas foi colocada na peneira de maior abertura (20mesh) e o sistema ficou em agitação por 20 min. Posteriormente as frações retidas em cada peneira foram pesadas e o diâmetro médio de partículas foi calculado conforme as Equações 4.2 e 4.3 (Gomide, 1980).

$$D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}}}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}^3}}} \quad \text{Eq. 4.2} \quad x_i = \frac{M_i}{M} \quad \text{Eq. 4.3}$$

onde: x_i = percentagem retida de amostra na fração i, D_p = diâmetro da partícula da fração i, M_i = massa de amostra na fração i, M = massa total de amostra, n = número de frações.

4.2.3 Densidade real e Densidade aparente

A densidade real da erva baleeira seca e moída (d_r) foi determinada usando picnometria com gás Hélio, através do equipamento Ultrapycnometer 1000 da Quantachrome no Laboratório de Materiais Particulados da Universidade de São Carlos – UFScar (São Carlos, São Paulo). Na medida da densidade real do leito o gás hélio penetra nos poros das partículas sólidas enquanto que na medida da densidade aparente os poros não são considerados.

A densidade aparente (d_a) do leito de partículas é calculada através da massa de erva baleeira utilizada nas extrações em relação ao volume da célula extratora ocupada pelo sólido em g/cm^3 .

4.2.3.1 Porosidade do leito fixo de partículas

Para formar o leito fixo de partículas foi utilizada a matéria-prima seca e moída (mesh entre -20 e 65) na quantidade de 20g. A porosidade do leito mais partículas (ϵ) é calculada usando a densidade real das partículas e a densidade aparente do leito, conforme a Equação 4.4.

$$\epsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad \text{Eq. 4.4}$$

onde: d_r é a densidade real das partículas e d_a é a densidade aparente do leito em (kg/m^3).

4.2.4 Densidade do solvente

A equação de ANGUS *et al.* (1976), baseada em dados experimentais, foi utilizada para determinação da densidade do dióxido de carbono supercrítico (CO_2) nas condições operacionais e ambientais de extração. Estes valores são utilizados na avaliação da influência da temperatura e da pressão na variação da densidade do solvente, e na aplicação de modelos de transferência de massa.

4.3 Unidades de extração supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina), onde encontram-se disponíveis duas unidades de experimentação: Unidade 1, que opera até uma pressão máxima de 230 bar e baixas vazões de solvente (de 0,5 g/min a 5 g/min) e Unidade 2, que opera até uma pressão máxima de 300 bar e altas vazões de solvente (de 1,6 g/min a 41,6 g/min).

A Unidade 1 foi utilizada para a realização de experimentos preliminares para verificar o tempo de extração necessário e alguns testes iniciais para obtenção de extrato e avaliação da composição dos mesmos.

A Unidade 2 foi empregada para a determinação do rendimento global de extração com CO₂ puro e com co-solvente, obtenção das curvas de extração necessárias para a modelagem matemática e para o estudo das condições ótimas de operação, a fim de se obter um extrato rico nos compostos de interesse. Para a obtenção dos extratos utilizados no estudo da composição do óleo de erva baleeira também foi empregada a Unidade 2.

4.3.1 Unidade de Extração 1:

A unidade 1 consiste de um cilindro de CO₂ com tubo pescador (R) e com um manômetro (PI1) acoplado para monitoramento da pressão, fornecido pela White Martins Ltda, o qual alimenta um tanque pulmão (P) de aço inox de 200 cm³ (Suprilab, Campinas, SP) através de uma válvula de três vias (Hoke, modelo 7165G4Y, Cresskill, NJ, EUA) com o dispositivo de segurança. Este tanque é resfriado através de um banho termostático (TC) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, Florianópolis, SC), cuja temperatura é programada para $\pm 1^{\circ}\text{C}$ e é provido de uma camisa de PVC para mantê-lo resfriado, garantindo deste modo o estado líquido do solvente antes do seu bombeamento e evitando a cavitação da bomba (B) utilizada (Thermo Separation Products, modelo 3200 P/F, Fremont, EUA). O tanque pulmão ainda possui um manômetro (PI2) para o controle da pressão com incerteza de 0,5% (IOPE, modelo 01221-40-2, São Paulo, SP). Através de uma válvula globo (Whitey, modelo SS-43S4, Solon, OH, EUA) é possível a passagem do solvente para bomba que opera no modo de pressão constante fornecendo uma vazão de solvente normalmente entre 1 e 10 ml/min. A temperatura de operação do extrator é controlada e mantida constante através de um banho termostático (T) (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, Florianópolis, SC). Na entrada do extrator encontra-se

acoplado um manômetro (PI3) (Header, modelo H-11, São Paulo, SP), onde a pressão de extração é monitorada. O extrator (Suprilab, Campinas, SP) consiste de um cilindro de aço inoxidável encamisado de 40 cm de comprimento, 2,1 cm de diâmetro interno, volume de 138,5 ml e extremidades rosqueadas, onde é formado o leito fixo de partículas.

Na saída do extrator é conectada uma válvula agulha micrométrica (VM) (Swagelok, modelo SS-31RS4, Solon, EUA), onde ocorre a despressurização da mistura soluto/solvente, e sua conseqüente separação. A VM é aquecida com uma fita de aquecimento (Fisatom, modelo 5, São Paulo, SP), sendo que o seu controle de temperatura é feito através de um potenciômetro (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., modelo Q-323.2, Diadema, SP). Este aquecimento é necessário de modo a evitar o congelamento da VM devido a despressurização da mistura soluto/solvente (com a conseqüente mudança de estado do CO₂) e também para garantir que os compostos extraídos da matriz vegetal não se acumulem na linha de extração.

Após a válvula micrométrica o extrato obtido é coletado em frascos de vidro âmbar (C) e, após o ponto de coleta, encontra-se conectado um bolhômetro (BL) onde são realizadas as leituras de vazão de solvente (LATESC, UFSC), mediante o deslocamento de coluna de líquido, conforme descrito por JOCHMANN, 2000. A Figura 5 mostra a foto da Unidade 1 e a Figura 6 mostra o esquema referente à unidade de extração 1.



Figura 5: Foto da unidade de extração 1 (LATESC).

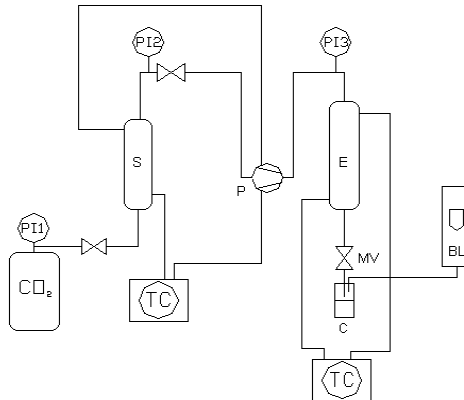


Figura 6: Esquema da Unidade 1 de ESC.

Onde:

CO₂ – Reservatório de CO₂,

S – Tanque pulmão,

P – Bomba,

E – Extrator,

C – Frasco coletor de extrato,

BL – Bolhômetro,

TC – Banho termostático,

PI1 – Manômetro de controle do cilindro de CO₂,

PI2 – Manômetro de controle do tanque pulmão,

PI3 – Manômetro de controle do extrator.

4.3.2 Unidade de Extração 2

A unidade de extração “2” consiste de um cilindro de CO₂ com tubo pescador (White Martins Ltda, Joinville, SC), que alimenta a linha de extração, que passa imersa em um banho termostático de resfriamento (Thermo Haake C10 - K10, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente siga no estado líquido à bomba (Maximator M111 CO₂), que trabalha suprida por uma linha de ar comprimido. A pressão de operação desejada é regulada através da válvula V1 (Tescom Cat N° 26-1761-24-161, Alemanha). A bomba é alimentada com o solvente, que é então pressurizado a uma pressão pré-estabelecida em V1, e encaminhado à linha de extração, passando ao extrator, que consiste de um cilindro encamisado de aço inox com extremidades rosqueadas de 33,5 cm de

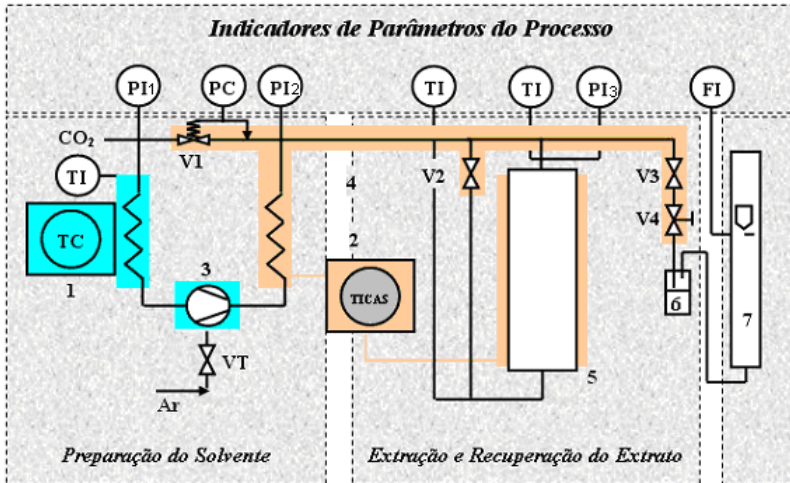
comprimento, 2,042 cm de diâmetro interno e volume interno de 100 mL. A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (Thermo Haake DC30 – B30, Alemanha). Toda a tubulação onde encontram-se conectadas as válvulas V1 a V6 é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ99-20, Palhoça, SC, Brasil) a uma temperatura de 60 °C. A tubulação da saída do extrator é conectada à V3 (Sitec Microvalve 710.3012, Zurique, Alemanha) e em seguida à V4 (Sitec Shutoff Valve 710.3010, Zurique, Alemanha) por onde o fluxo de CO₂ é regulado. Após passar pela V4, o extrato é coletado em tubos âmbar, onde também é conectado um rotâmetro (ABB Automation Products 10 A 61, Zurique, Suíça) para medição do fluxo de CO₂, regulado na V3 e V4.

Essa unidade de ESC foi completamente desenvolvida e construída na Alemanha, na Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH), no Laboratório ‘Thermische Verfahrenstechnik’ e doada para o LATESC através do projeto CNPq/DRL 910016/99-2.

A Figura 7 mostra a foto do Equipamento 2 e a Figura 8 mostra o esquema referente a unidade de extração 2.



Figura 7: Foto da unidade de extração 2 (LATESC).



- | | |
|--|--|
| 1- Refrigerador | V1- Válvula reguladora de pressão |
| 2- Banho termostático | V2- Válvula da entrada do extrator |
| 3- Bomba de CO ₂ | V3- Válvula da saída do extrator |
| 4- Caixa de água para aquecimento da válvula de expansão | V4- Válvula micrométrica (controla a velocidade de escoamento) |
| 5- Extrator | PI1- Manômetro de controle de pressão do CO ₂ |
| 6- Linha para coleta de tubos | PI2- Manômetro de controle da bomba |
| 7- Medidor de fluxo (kg/h) | PI3- Manômetro de controle do extrator |
| TI- Controladores de temperatura | VT- Válvula de controle da frequência da bomba |

Figura 8: Esquema da unidade de extração 2 (Zetzl *et al.* 2003).

4.4 Determinação do rendimento global de óleo (X_0)

O rendimento global de óleo (X_0) é a quantidade de óleo extraível presente na matriz sólida (erva baleeira) referente a uma dada temperatura e pressão de extração. Para que os valores de X_0 sejam válidos e reprodutíveis é preciso especificar uma metodologia para sua determinação.

Os experimentos para determinação do rendimento global de extração foram realizados na Unidade de extração 2, e as condições de operação utilizadas foram as seguintes: 100, 200, e 300 bar e 30, 40 e 50

°C. O tempo de extração foi definido através da observação da curva de extração obtida a 150 bar, 40 °C e vazão de solvente de 3,0 g/min conforme explicado no item 5.1, sendo fixado em 4 h o que totaliza um consumo de 720 g de CO₂. Como pode ser observado na Figura 5.1 do item 5.1, em 4 h a extração se aproxima da etapa de taxa nula de extração.

Através de um planejamento experimental fatorial 3², foram avaliados os efeitos de dois parâmetros de processo, pressão e temperatura, em três níveis conforme mostra a Tabela 1, resultando num total de 9 experimentos, sendo que cada experimento foi realizado em duplicata. A matriz do planejamento experimental foi obtida com auxílio do *software* STATISTIC for Windows versão 6.0 e os resultados das extrações em termos de rendimento de processo foram submetidos à análise estatística através do método de superfície de resposta.

Tabela 1: Identificação dos níveis das variáveis para as extrações supercríticas.

Variável	Nível	Identificação
Pressão	-1	100bar
	0	200bar
	1	300bar
Temperatura	-1	30°C
	0	40°C
	1	50°C

Os frascos com os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -18 °C. O rendimento global (X_0) foi calculado através da razão entre a massa de extrato (M_{extrato}) obtida e a massa de erva baleeira (M_{erva}) utilizada para formar o leito conforme a Equação 4.5.

$$X_0 = \frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{erva}}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.5}$$

4.4.1 Experimentos Cinéticos – Curvas de Extração

Os experimentos cinéticos para a obtenção das curvas de extração de erva baleeira consistiram na determinação da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração. Para a determinação das curvas de extração foram utilizados frascos de coleta previamente

pesados em balança analítica e a coleta do soluto extraído foi realizada em intervalos em tempos pré-determinados. Após a coleta os frascos foram novamente pesados para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido; ou ainda pelo rendimento de extração versus a razão massa de solvente por massa de amostra.

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro nas condições de pressão 100, 150, 200 e 300 bar; temperaturas de 30, 40 e 50 °C e vazões de 3,0 a 8,3 g/min.

Os valores experimentais de massa de extrato vs tempo de extração obtidos nas curvas da ESC de erva baleeira são apresentados na Tabela 25 do Apêndice II.

4.5 Emprego de co-solvente (CS)

Para a adição de co-solvente junto à extração supercrítica, uma bomba de co-solvente (CS) foi acoplada ao Equipamento de extração supercrítica (Unidade 2). Uma válvula de retenção (VR) foi colocada após a bomba de co-solvente para evitar que o solvente orgânico retorne para a bomba de CS se houvesse um aumento na pressão da bomba de CO₂ durante o experimento. A bomba de CS trabalha numa faixa de vazão de solvente de 0,1 a 10 ml/min. Os solventes utilizados como co-solventes foram álcool etílico (P.A.) e acetato de etila em concentrações de 2, 5, 8% em massa. Estes solventes foram escolhidos com base nos resultados de rendimento (item 5.2.3), atividade antioxidante (item 5.3.3) e dados da literatura que relatam o uso destes solventes como co-solventes (CASAS *et al.* 2007; SALGIN, 2007).

Os experimentos com co-solvente foram realizados na condição de 300 bar, 50°C, vazão média de CO₂ de 0,3 kg/h e 4 horas de extração a fim de se avaliar a influência no rendimento da ESC provocada pela sua adição, em diferentes concentrações.

A quantidade de solvente necessária para obter a concentração desejada foi calculada com base na vazão de CO₂ e no tempo total de extração, da seguinte maneira: com a vazão de CO₂ em kg/h calcula-se a quantidade total de CO₂ que será utilizada em 4 horas de extração e utilizando uma regra de três calcula-se a massa de co-solvente necessária para a porcentagem de massa desejada (2, 5, ou 8%) considerando que a massa de CO₂ corresponde a 100%.

O extrato obtido no final da extração foi levado ao rotaevaporador (Fisatom 802) com controle de vácuo (Nova Técnica, Modelo NT 613, Piracicaba, SP) a fim de evaporar todo o co-solvente contido na amostra. A temperatura do rotaevaporador foi a temperatura de ebulição do co-solvente empregado.

4.6 Determinação Experimental da Solubilidade

A solubilidade do extrato de erva baleeira no solvente supercrítico foi determinada experimentalmente através do ajuste simultâneo de duas retas às curvas de extração (m_{extrato} versus m_{CO_2}) utilizando o pacote estatístico SAS for Windows – versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Foi determinada a inclinação da reta ajustada no período de taxa constante de extração (CER), onde a massa de soluto obtido é constante com o tempo. Se a vazão de CO_2 é adequada, esta inclinação corresponde ao valor de Y_{CER} e é equivalente ao valor de Y^* , para a condição de temperatura e pressão específica quando o solvente está saturado com o soluto. A vazão utilizada para determinação da solubilidade experimental foi baseada no estudo feito por Danielski (2002), que definiu a faixa de 0,9 $\text{g}_{\text{CO}_2}/\text{min}$ à 1,2 $\text{g}_{\text{CO}_2}/\text{min}$ como adequada para a determinação da solubilidade de oleoresinas em CO_2 supercrítico, garantindo assim o tempo de contato entre as fases, necessário para alcançar o equilíbrio. Os dados obtidos com este procedimento são valores aproximados, uma vez que existe variação da composição do extrato com o tempo de extração. Estes dados aproximados foram considerados apenas para a aplicação do modelo de SOVOVÁ (1994).

4.7 Medidas Experimentais do Equilíbrio de Fases

O extrato de erva baleeira foi obtido na unidade de extração 2 com CO_2 supercrítico na condição de 300 bar e 50°C por 4 h de extração resultando num rendimento de processo de 5% (extrato/massa material). Os principais componentes presentes neste extrato de erva baleeira foram identificados e quantificados por análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas conforme descrito no item 4.11.

Baseado na análise de composição do extrato e na literatura (atividade antiinflamatória) os componentes α -humuleno e *trans*-cariofileno foram considerados os componentes-chave do extrato de erva baleeira e foram selecionados para o estudo do equilíbrio de fases

visando o fracionamento do extrato de erva baleeira. Estes dois componentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Foram realizadas medidas experimentais de equilíbrio de fases para o sistema composto por extrato de erva baleeira+CO₂, onde o extrato de erva baleeira é considerado um pseudocomponente puro. Também foram avaliados os sistemas binários compostos por CO₂+ α -humuleno, CO₂+*trans*-cariofileno e o sistema ternário contendo CO₂+ α -humuleno+ *trans*-cariofileno.

4.7.1 Aparato experimental

As medidas experimentais de equilíbrio de fases a altas pressões foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai (URI- Campus de Erechim - RS) em uma célula de volume variável com visualização, baseada no método estático sintético. A Figura 9 mostra uma foto do equipamento e a Figura 10 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental.



Figura 9: Foto da unidade de equilíbrio de fases. Fonte: (LANZA, 2004).

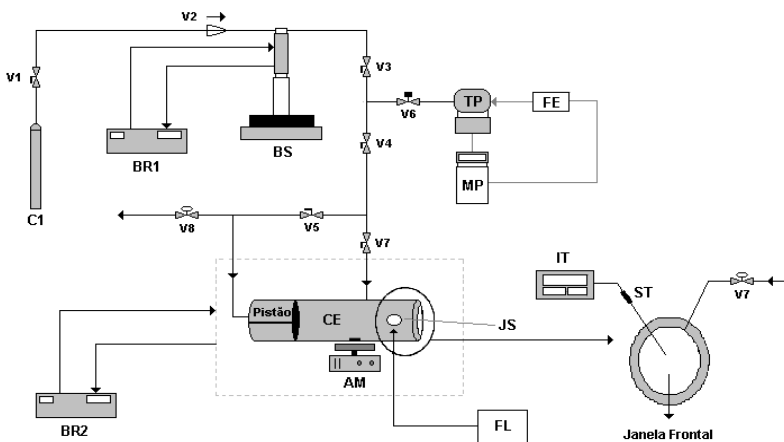


Figura 3: Diagrama Esquemático do Aparato Experimental. Fonte: (LANZA, 2004).

Onde:

C1- Reservatório de solvente (CO_2), com tubo pescador.

V1- Válvula de Esfera (Marca HOKE, Modelo 7155F2Y), permite o fluxo do solvente do cilindro para a bomba.

BR1- Banho de Recirculação 1 (Marca QUIMIS, Modelo 214M2).

BS- Bomba de seringa (Marca ISCO, Modelo 500D) que possui um cilindro interno de 500 mL, pressão de trabalho de até 300 bar e fluxo de até 107 ml/min. Esta bomba permite a quantificação da massa de fluido deslocada e também a pressurização e despressurização do sistema a medida que o solvente é deslocado.

JS e Janela Frontal- A célula possui duas janelas de safira (Swiss Jewel Company), sendo uma **Janela Frontal** ($d = 25,4$ mm e espessura = 9,52 mm) para visualização do interior da célula e outra lateral (**JS**) ($d = 15,87$ mm e espessura = 4,76 mm) para a entrada de luz.

V2- Válvula de Via Única (check-valve, Marca HOKE, Modelo 6133F2Y).

V3, V4, V5- Válvulas de Esferas (Marca SWAGELOK, Modelo SS-H83PF2).

V6- Válvula de Alívio (Marca SWAGELOK, Modelo SS-4R3A).

V7- Válvula de Alimentação (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1). **V8** Válvula de Descarga (Válvula Agulha, Marca HIP, Modelo 1511AF1).

BR2- banho termostático de recirculação (**BR2**) (Marca MARCONI, Modelo MA 184/6).

IT- Indicador de Temperatura (Marca DIGMEC, Modelo FHMD).

TP- Transdutor de Pressão (Marca SMAR, Modelo LD 301).

MP- Monitorador de Pressão (Marca SMAR, Modelo HT2, Versão 5.08).

AM- Agitador Magnético (Marca Velp Científica), para acelerar o alcance do equilíbrio.

FL- Fonte de Luz. Foi utilizado um feixe de luz branca na janela lateral da célula de equilíbrio para iluminar o interior da célula e auxiliar a visualização das transições de fases.

CE- Célula de equilíbrio de volume variável. Consiste em um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 25 mL, possuindo um diâmetro interno de 17,2 mm e comprimento de 176 mm. No interior da célula existe um pistão que tem por objetivo controlar o volume e, conseqüentemente, a pressão do sistema. A célula possui duas entradas superiores: uma para conexão com o termopar (ST) e outra com a válvula de alimentação (V7); uma entrada lateral onde é fixada a janela de safira lateral (JS) e entradas frontal (janela frontal) e traseira (fechamento e conexão com a válvula V5). As Figuras 11 e 12 apresentam detalhes da célula de equilíbrio e do pistão, respectivamente.



Figura 11: Célula de equilíbrio de volume variável. Fonte: (LANZA, 2004).



Figura 4: Pistão utilizado na célula de equilíbrio (LANZA, 2004).

4.7.2 Procedimento Experimental

Na metodologia estática sintética de determinação de solubilidade deve-se conhecer a composição global do sistema em estudo. A célula de equilíbrio é carregada com o soluto em quantidades pré-determinadas. A carga do CO_2 inicia com a transferência do solvente do reservatório para a câmara interna da bomba. Para uma medida precisa do volume deslocado, o solvente deve ser mantido como líquido comprimido. A massa de solvente a ser adicionada é computada com base no decréscimo do volume interno da bomba. Para isso, é necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba. Em seguida o sistema de extrato + solvente é continuamente agitado por meio de um agitador magnético localizado abaixo da célula de equilíbrio. O sistema de controle de temperatura é então ligado e quando a temperatura necessária para a realização da medida experimental é estabelecida a pressão é aumentada, com o auxílio da bomba de seringa, até a visualização de apenas uma única fase no interior da célula. Neste momento o sistema é deixado em repouso durante 10 min até atingir o equilíbrio. Mantendo-se a temperatura constante e a solução sob agitação, a pressão é vagarosamente reduzida até que ocorra o turvamento ou formação de bolhas na solução (transição de fases). Aguarda-se alguns minutos para a estabilização do sistema para identificação do tipo de transição e da interface entre as fases segregadas. Após estabilizar a pressão neste ponto, anota-se o valor desta e em seguida pressuriza-se novamente o sistema para repetir o procedimento. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada condição experimental de temperatura e composição, considerando-se um valor médio para a pressão de

transição a fim de determinar o erro experimental. Ao término da corrida para uma dada condição experimental, o procedimento era repetido (aumento de pressão até que se formasse uma fase e redução da pressão, ocorrendo a transição de fases) para avaliar a repetibilidade da metodologia experimental e obter um valor médio da pressão de transição à temperatura e composição global constantes. As medidas experimentais foram realizadas nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C.

Um ponto experimental é definido como ponto de bolha (PB) quando pequenas bolhas aparecem no topo da célula de equilíbrio. Já num ponto de orvalho (PO) uma fina névoa e/ou gotículas de líquido aparecem dentro da célula. Em ambos os casos, a composição da fase predominante (líquida se for PB ou vapor se for PO) é considerada igual à composição global da mistura.

4.8 Extração com Solventes Orgânicos

4.8.1 Extração soxhlet

Nesta técnica foram utilizados os solventes orgânicos n-hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) e água destilada com valores de polaridade crescente de 0,0<3,4<4,3<5,1<5,2<9,0, respectivamente (BYERS, 2006). Também foram realizadas extrações utilizando misturas de solvente como etanol e água na proporção de 25/75 e 50/50 (volume/volume) a fim de verificar o efeito destes sobre o rendimento e atividade biológica dos extratos. A extração consiste em colocar a amostra (5g) totalmente envolta em papel filtro (cartucho para extração) no aparelho soxhlet (extrator) que consiste de um tubo extrator, balão de vidro de fundo redondo e um condensador. O extrator é conectado ao balão contendo um solvente (etanol, acetato de etila, acetona, n-hexano, diclorometano, água) e a um condensador. O solvente é aquecido por uma manta, causando sua evaporação. O vapor do solvente sobe até o condensador, onde resfria e condensa gotejando sobre a matriz vegetal, solubilizando os compostos. O extrator contendo o material de prova lentamente enche com o solvente até ser esvaziado por ação de sifão, sendo então enviado de volta ao balão.

Este ciclo pode ser repetido várias vezes. Durante cada ciclo, novos compostos são dissolvidos no solvente e o solvente evapora-se novamente, deixando a substância dissolvida no balão. O processo se

repete até que todo o material (soluto presente na matéria-prima) tenha sido extraído. O tempo total de cada extração foi de 6 horas. Ao final o solvente foi removido usando um evaporador rotatório (Fisatom 802) com controle de vácuo (Nova Técnica, Modelo NT 613, Piracicaba, SP).

4.8.2 Hidrodestilação

A hidrodestilação é um tipo de extração a baixa pressão onde a extração do soluto é realizada em um extrator que opera em circuito fechado, o sistema de Clewenger, que apresenta mínima perda de voláteis. Neste sistema a matriz a tratar é imersa em água, cujo aquecimento até fervura provoca a formação de vapor que arrasta os compostos voláteis. Após condensação, estes compostos separam-se da água por decantação. Na destilação o material é sujeito a temperaturas próximas de 100°C, o que poderá levar à decomposição de constituintes termolábeis. O equipamento de hidrodestilação consiste de um tubo de transferência de vapor, um condensador, um tubo separador com escala volumétrica e um tubo de retorno e saída de óleo. O sistema completa-se com o balão volumétrico de fundo redondo, o sistema de refrigeração, que pode funcionar com água corrente à temperatura ambiente ou através de refrigerador com circulação de água, além de manta aquecedora para fornecer o agente de separação energético (calor) (SANTOS *et al.* 2004). Para a realização desta técnica foram utilizadas 100 g de amostra e foi realizado em duplicata.

4.8.3 Maceração seguida de partição Líquido-Líquido

A maceração é um processo estático, não exaustivo, fortemente dependente do tipo de farmacógeno, da seletividade do líquido extrator e solubilidade dos compostos-alvo. Realizada em temperatura ambiente, recipiente fechado, durante um período pré-estabelecido sem renovação do líquido extrator, esta é uma das técnicas extrativas mais usuais devido a simplicidade e custos reduzidos.

Para a realização desta técnica foram utilizadas 100g de amostra seca e triturada que foram deixadas em maceração por 5 dias em álcool etílico (300g). Depois de finalizada a etapa de extração, o passo sequencial é uma semi-purificação dos compostos químicos, que pode ser realizada utilizando uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, que resultará em separação provável dos principais metabólitos secundários. A partição foi realizada com os solventes

orgânicos n-hexano, diclorometano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade: $0,0 < 3,4 < 4,3$ a fim de comparar o rendimento de extração e a composição dos extratos obtidos neste processo e na extração supercrítica. Após 5 dias de maceração a mistura foi filtrada com o auxílio de papel filtro e funil de vidro e o etanol foi evaporado até 10% do volume inicial com o auxílio de um rotaevaporador. Adicionou-se 20ml de água e evaporou-se o restante do etanol. O banho quente do rotaevaporador foi mantido a aproximadamente 50°C e o banho frio (solução de etileno glicol) a mais ou menos 11°C. O banho frio tem a finalidade de resfriar o condensador, para a eliminação do solvente. Evaporado o restante do etanol, adicionou-se 20ml de hexano e colocou-se a mistura em um funil de separação. A fase orgânica foi retirada do funil e à fase aquosa foi adicionada mais 20ml de n-hexano. Novamente a fase orgânica (mais densa) foi removida e a esta fase foi adicionado Na_2SO_4 a fim de eliminar a água remanescente (depois a mistura foi filtrada para retirar o Na_2SO_4). A fase aquosa foi colocada novamente no rota evaporador para eliminar o n-hexano. Depois foi adicionado no funil de separação 20ml de diclorometano no que restou da extração anterior. A fase orgânica (mais densa) foi separada, o procedimento foi repetido e a fase orgânica foi secada com Na_2SO_4 e filtrada em seguida. A fase aquosa foi colocada novamente no rotaevaporador a fim de evaporar o diclorometano (SIMÕES *et al.* 2001). No fim da extração com solventes orgânicos foram obtidos quatro extratos: fração n-hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração aquosa.

4.9 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.9.1 Determinação do índice de fenólicos totais (FT)

O índice de fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Folin-Ciocalteu (ROSSI & SINGLETON, 1965). A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra, reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstícos e fosfomolibdicos, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorbância na faixa visível do espectro a 765nm.

Para interpretar os resultados é necessário preparar uma curva padrão com o objetivo de representar a absorbância frente à concentração da curva de ácido gálico. Para isso dissolve-se 0,5 g de

ácido gálico em H₂O destilada de modo a obter uma solução de concentração 5g/L. A partir desta solução estoque prepara-se soluções de concentração crescente de 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/mL. Pipeta-se alíquotas de 100 µL de cada uma das concentrações para balão volumétrico de 10 mL, adiciona-se 2 mL de água destilada, 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu, 1,5 mL de solução de carbonato de sódio [20% m/v] e dilui-se até a marca dos 10 mL com água destilada. Deixa-se repousar a solução por 2h à temperatura ambiente e, após, determina-se a absorbância a 765 nm (espectrofotômetro marca Spectronic Unicam, modelo Genesys 10 vis, Rochester, USA). Construir a curva padrão de absorbância *versus* concentração de ácido gálico.

Para a execução do ensaio, prepara-se uma solução com o extrato de erva baleeira na concentração de aproximadamente 200 mg/L. Pipeta-se 100 µL dessa solução para balão de 10 mL e repete-se o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior.

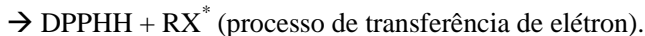
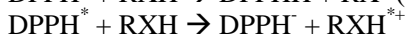
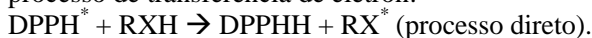
A concentração de fenólicos totais presentes na amostra é obtida em equivalentes a ácido gálico (GAE) através da curva padrão referente à absorbância lida para a amostra. A curva padrão de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro) encontra-se apresentada na Figura 36 do Apêndice III. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg GAE/g extrato, como média ± desvio padrão.

$$\text{Fenólicos Totais (mg GAE/g}_{\text{ext}}) = \{[\text{GAE} \times 1000] / \text{D}_{\text{extratos}}\} \quad \text{Eq. 4.6}$$

Onde: GAE: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg GAE/L), D: Diluição das amostras (mg_{ext}/L).

4.9.2 Método DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm (MENSOR, 2001). Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. Este processo pode se dar de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron:



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

O procedimento consistiu na incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, de uma solução etanólica de DPPH 0,3 mM com concentrações crescentes (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL) dos extratos obtidos de erva baleeira. Após o referido período, mensurou-se espectrofotometricamente em 517nm (espectrofotômetro marca Spectronic Unicam, modelo Genesys 10 vis, Rochester, EUA), quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH vai se tornar, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH foi calculado convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a seguinte equação:

$$AA\% = 100 - \left\{ \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \right\} \quad \text{Eq. 4.7}$$

A concentração das amostras necessárias para captar 50% do radical livre DPPH (CE₅₀) foi calculada por análise de regressão exponencial e linear, e foram expressas em média ± desvio padrão (MENSOR *et al.* 2001).

Foram testadas as amostras obtidas com as diferentes técnicas de extração: extração com solvente orgânico, extração soxhlet, maceração e extração supercrítica com e sem co-solvente. Os valores de atividade antioxidante calculados (CE₅₀) são referentes a maior concentração de extrato testado que foi de 178,5 µg/mL.

Os resultados encontrados de concentração efetiva (CE₅₀) para os extratos analisados foram comparados com a rutina e quercetina, flavonóides de reconhecida atividade antioxidante, utilizados como controle positivo do ensaio.

4.9.3 Método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). O radical

monocátion pré-formado ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) é gerado pela oxidação química do ABTS, e é reduzido na presença de antioxidante doador de hidrogênio (ex. flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides e antioxidantes do plasma). As influências de ambas as concentrações de antioxidantes e duração da reação na inibição da absorção do cátion radical são levadas em consideração quando se determina a atividade antioxidante. O método é aplicável para o estudo de soluções antioxidantes hidro e lipossolúveis, compostos puros e extratos de alimentos. Utilizou-se o Trolox, vitamina E sintética (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, EUA) como antioxidante referência, que foi preparado em etanol e estocado como solução padrão. O ABTS foi dissolvido em água até a concentração de 7,0 mM, e submetido à reação com 2,45 mM de persulfato de potássio para a formação do radical.

A mistura ficou no escuro à temperatura ambiente de 12 a 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS^{•+} foi diluída em etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 754 nm. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, para o tempo de 6 minutos após a adição da amostra na solução de ABTS^{•+}. A porcentagem de inibição do radical foi calculada através da equação (4.8).

$$\% \text{Inibição} = 1 - \left(\frac{\text{Abs}_f}{\text{Abs}_0} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 4.8}$$

Onde: Abs_f é a absorbância após a adição da amostra ao radical ABTS para o tempo de 6 minutos e Abs_0 é a absorbância do radical.

Uma curva padrão foi plotada em função da porcentagem de inibição do radical ABTS pelas diferentes concentrações de Trolox ($\mu\text{M}/\text{mL}$) e encontra-se apresentada na Figura 37 do Apêndice III.

Após a obtenção do percentual de inibição do respectivo extrato a atividade antioxidante (AA) foi calculada através da equação (4.9), com base na curva padrão de Trolox.

$$\text{AA} = \frac{C_a (\mu\text{M} / \text{mL})}{C_e (\text{g} / \text{mL})} \quad \text{Eq. 4.9}$$

Onde: C_a é a concentração ($\mu\text{M}/\text{mL}$) referente ao percentual de inibição obtido através da leituras espectrofotométricas do extrato e C_e é a concentração do extrato utilizada na técnica. Desta forma, os resultados foram expressos em μM TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) por g de extrato.

4.9.4 Formação e monitoramento do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Para avaliar a capacidade “scavenger” do $\text{O}_2^{\bullet-}$ utilizou-se o sistema gerador do referido radical, através da reação catalisada pela enzima xantina oxidase (XO) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), que utiliza a xantina como substrato levando à formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e ácido úrico (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988).

O potencial antioxidante dos extratos de erva baleeira foi avaliado na redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) ($25\mu\text{M}$) pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerado pela reação catalisada pela XO. O meio de incubação consiste de tampão fosfato $0,1\text{ mM}$, pH 7,8; extrato de erva baleeira com concentrações crescentes de (5, 10, 100, 250, 500 e $1000\ \mu\text{g}/\text{mL}$); xantina $100\ \mu\text{M}$ e XO $0,04\ \text{U}/\text{mL}$. Após 10min de incubação a temperatura ambiente, a reação é interrompida adicionando-se aos tubos teste HCl $0,1\ \text{N}$. A redução da absorbância do NBT é avaliada espectrofotometricamente em $560\ \text{nm}$ de acordo com a Equação 4.7.

Os resultados foram expressos em termos de CE_{50} que representa a concentração suficiente da amostra necessária para captar 50% dos $\text{O}_2^{\bullet-}$, os quais foram calculados por análise de regressão exponencial e expressos como média \pm desvio padrão. Considerou-se os valores da absorbância dos controles como 100% da redução do NBT sem a presença dos extratos testados.

4.9.5 Proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro* (TBARS)

O malonaldeído (MDA) é um produto da lipoperoxidação *in vivo*, que reage com uma variedade de compostos e forma derivados que podem ser estimados espectrofotometricamente. Um dos métodos mais empregados para sua determinação é a sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que consiste na reação de uma molécula de MDA com 2 moléculas de TBA e eliminação de 2 moléculas de água,

formando um pigmento de coloração rosa com absorção máxima a 532-535 nm.

A proteção contra peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com CHEN & TAPPEL (1996), utilizando-se homogenato de fígado de camundongos como substrato alvo. Os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Retirou-se o fígado e lavou-se com solução salina 0,9%, pesou-se e homogenizou-se (Ultraturax – Bosh) em tampão fosfato de potássio 10 mM e pH 7,0 em KCl 140 mM. Em seguida centrifugou-se o homogenato a 2000 g por 5 min a 4°C e, o sobrenadante dilui-se (3:9) em tampão fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4.

Posteriormente, fez-se a incubação de 100 µL H₂O destilada, 125 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM e pH 7,4, 100 µL de peróxido t-butila, 100 µL de diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL), e 150 µL do homogenato diluído. Ao tubo controle adicionou-se 100 µL de BHT. Tal mistura é incubada a 37 °C, sob agitação e condições aeróbicas por 2 horas. Após incubação, adiciona-se 1,0 mL de TCA 2,8% seguido de 1,0 mL de TBA 1% em NaOH 0,05 N, o sistema de incubação é aquecido a 100°C por 15 min em banho-maria e, a seguir, transfere-se as amostras para o banho de gelo, por 5 min. A absorbância das soluções é monitorada espectrofotometricamente em 532 nm.

Calcula-se o potencial de proteção contra a lipoperoxidação de acordo com a Equação 4.7.

Os valores de CE₅₀ representam as concentrações das amostras que são necessárias para prevenir em 50% a peroxidação lipídica, e são calculadas por análise de regressão exponencial e linear, expressos como média ± desvio padrão.

4.10 Avaliação da Atividade Antibacteriana

4.10.1 Método de difusão em ágar

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada empregando-se o método de difusão em ágar descrito por SMÂNIA *et al.* (1995) e KITZBERGER *et al.* (2007).

Os extratos de erva baleeira obtidos por ESC (com CO₂ puro e com co-solvente), por soxhlet e maceração, foram submetidos a avaliação da atividade antibacteriana com bactérias Gram-positivas

como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection) e *Bacillus cereus* MIP 96016 (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC) e bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

O método consiste em incubar as culturas a 36°C por 18 horas. As culturas são então diluídas em caldo de cultivo para conter 10⁶ CFU/mL. Ágar Mueller-Hinton e caldo de cultivo são usados para o crescimento bacteriano.

O método de difusão em ágar é realizado com “swabs” de algodão que são renovados para cada suspensão de bactérias (10⁶ CFU/mL) e inoculadas em placas onde as bactérias foram espalhadas regularmente sobre a superfície do meio ágar. Furos de sete mm de diâmetro são assepticamente cortados e preenchidos com os diferentes extratos de erva baleeira (supercríticos, convencionais e supercríticos com co-solvente) na concentração de 10 mg/mL de DMSO (dimetilsulfóxido), por este não oferecer nenhuma inibição aos microrganismos testados. As placas são então incubadas a 36°C por 18 horas e examinadas para verificar a inibição das linhagens indicadoras. Um resultado positivo é definido como uma zona de inibição de 9 mm ou mais em diâmetro de crescimento inibido das linhagens de microrganismos e interpretado como presença confirmada de uma substância antibacteriana.

4.10.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da MIC pelo método de microdiluição em caldo de cultivo. Os extratos de erva baleeira que apresentaram halo de inibição ao serem submetidos ao método de difusão em ágar foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), previamente esterilizado por autoclavação, e as soluções foram adicionadas de 1.800 µL de caldo Muller-Hinton. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas com concentrações variando de 2,0 a 0,0156 mg/mL, e distribuídas em volume de 200 µL nas placas de microdiluição (contendo 96 orifícios). Como controle de crescimento usou-se a mistura de meio de cultura e para o controle de esterilidade o DMSO, sem a adição de agentes antimicrobianos. Em cada orifício teste e de controle de crescimento são adicionados 5 µL de inóculo bacteriano. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas foram incubadas por tempo/temperatura adequados a cada tipo de microorganismo em estudo.

A MIC é considerada a menor concentração de substância que inibiu o crescimento bacteriano após a incubação. Os resultados são expressos em $\mu\text{g/mL}$ (Smânia *et al.* 2006).

As análises foram realizadas no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

4.11 Análise cromatográfica acoplada com espectrometria de massas CG-EM

Os principais constituintes dos extratos de erva baleeira obtidos mediante extração supercrítica e extração convencional, foram quantificados e identificados através de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

O extrato supercrítico de erva baleeira obtido para as medidas de equilíbrio de fases foi analisado quanto ao seu perfil químico no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB) na FURB (SC). A análise foi executada em um cromatógrafo gasoso (Cromatógrafo Gasoso Varian[®] CP-3800) acoplado ao Espectrômetro de Massas (Saturn[®] 2000) equipado com uma coluna capilar CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (30 m x 0.25mm – filme 0.25 μm). O gás de arraste foi o He (vazão constante de 1 ml/min). A coluna foi aquecida a 60 °C por 3 min, programada a 5 °C/min até 220 °C, e mantida a 220 °C por 15 min. As amostras foram solubilizadas em acetato de etila (1 mL), e 200 μL foram transferidos para uma microcoluna com sílica flash e foram posteriormente eluídos com 1 mL de acetato de etila. O software de gerenciamento foi Saturn[®] GC/MS Workstation 5.51. A identificação das substâncias majoritárias foi realizada por comparação do espectro de massa da substância com banco de dados do sistema GC-MS (Standard Reference Data Series do National Institute of Standard and Technology - NIST 2000 MS Library) e com padrão de n-alcenos co-injetados (C_{10} - C_{25}).

Os demais extratos obtidos por extração supercrítica com CO_2 e com cosolventes e extração convencional foram analisados no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A Análise foi realizada em cromatógrafo GC-MS (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L), coluna Zebron ZB-5HT (30 m x 0.25 mm, 0.10 μm) (Phenomenex, Torrance, EUA). A análise foi realizada usando modo de injeção por split a uma taxa de 1:10. A temperatura do injetor foi de

300°C. O gás de arraste foi o He usado a uma taxa de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 50°C, mantendo por 1min, aquecendo a uma taxa de 6°C/min até 300°C mantendo por 5 min. Os compostos majoritários foram identificados usando uma base de dados para produtos naturais (Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology -NIST - Mass-Spectral Library with Windows search program – Version 2), onde os espectros de massa foram comparados.

4.12 Análise Estatística

Os resultados de rendimento e de atividade antioxidante obtidos para os diferentes extratos de erva baleeira foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância e através de superfície de resposta com o auxílio do software STATISTICA 6.0. Os experimentos de ESC com CO₂ puro seguiram um planejamento fatorial completo de dois fatores (temperatura (T) e pressão (P)) e três níveis (30, 40, 50 °C e 100, 200, 300 bar) com uma replicação.

A ANOVA dos rendimentos obtidos através de ESC com diferentes concentrações de co-solvente foi realizada considerando estes como experimentos de fator único (concentração de co-solvente) com uma replicação. Para os rendimentos obtidos através das extrações convencionais a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. Se, segundo a ANOVA existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância entre as médias dos tratamentos (tipo ou condição de extração) pode-se dar continuidade à análise aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos. Sendo assim, o teste de Tukey foi aplicado para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos rendimentos obtidos.

4.13 Modelagem Matemática

A modelagem das curvas de extração de erva baleeira (massa de extrato acumulada *versus* tempo de extração) foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), Martínez *et al.* (2003), Crank (1975) apud Reverchon (1997), Tan & Liou (1989), Goto *et al.* (1993), Esquivel *et al.* (1999), através do programa Mass Transfer desenvolvido por Correia *et al.* (2006) disponível no LATESC. Também foi ajustado

o modelo de transferência de massa VTII desenvolvido por Brunner (1994), disponível no programa “Thermische Verfahrenstechnik VTII” desenvolvido pela universidade Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH) da Alemanha (ZETZL *et al.* 2007).

O pacote estatístico SAS for Windows – versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi utilizado para determinar os parâmetros t_{CER} e M_{CER} necessários para a utilização do modelo de Sovová (1994). Este programa faz o ajuste simultâneo de duas retas à curva de extração obtida através da massa acumulada de soluto versus o tempo de extração. O ponto de intersecção das duas retas determina t_{CER} que é o tempo de duração da etapa de taxa constante de extração. O parâmetro M_{CER} que representa a taxa de extração da etapa CER é o valor da tangente no período CER e, a partir do mesmo obtêm-se o valor de Y_{CER} que é a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER através da Equação 4.8.

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. 4.8}$$

4.14 Resumo dos Ensaios

A Tabela 2 apresenta o resumo dos experimentos realizados para o estudo dos diferentes extratos obtidos de erva baleeira que inclui as diversas técnicas de obtenção dos extratos, as análises realizadas para cada extrato, bem como o local de sua realização.

Tabela 2: Resumo dos ensaios realizados com erva baleeira.

Experimentos	Análises				Tratamentos			
	Atividade Antioxidante	imi cro bia	Fit	Quí mic	X ₀ (%)	age m	mat em	An ova

			Fenólicos - DPPH	Radical O ₂ ⁻ peroxidação lipídica					
Local de realização			LATESC	LABIOEX	LA	IPTB/IQ	LATESC		
LATESC	Extração Soxhlet	Etanol	x	x	x	x	x		x
		Acet. etila	x	x	x	x	x		x
		n-Hexano	x	x	x		x		x
		DCM	x	x	x		x		x
		Água	x	x	x	x	x		x
LATESC	Extração Maceração	Acet. etila	x	x	x		x		x
		DCM	x	x	x		x		x
		n-Hexano	x	x	x		x		x
		Aquoso	x	x	x		x		x
LATESC	ESC(CO ₂ puro) [P(bar)/T(°C)/QCO ₂ (g/min)]	100/30/3	x	x	x	x	x	x	x
		100/40/3	x	x	x		x		x
		100/50/3	x	x	x		x		x
		200/30/3	x	x	x	x	x		x
		200/40/3	x	x	x		x		x
		200/50/3	x	x	x	x	x		x
		300/30/3	x	x	x		x		x
		300/40/3	x	x	x		x		x
LATESC	ESC(CO ₂ +CS) Tipo de solvente	Etanol	x	x	x		x		x
		Acet. etila	x	x	x		x		x
LATESC	Hidrodestilação	Água	x			x	x		
Laboratório Termodinâmica	Medidas de Equilíbrio de Fases	CO ₂ Extrato erva baleeira α-humuleno trans-cariofileno				x	x	Modelagem Termodinâmica	

LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC.

LABIOEX- Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

LA - Laboratório de Antibióticos do Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

IPTB- Laboratório de Cromatografia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (IPTB) na FURB- Universidade Regional de Blumenau (SC).

IQ- Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Laboratório de Termodinâmica Aplicada- URI- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho com a extração de erva baleeira que são expostos na forma de artigos. O item 5.1 apresenta os ensaios prévios realizados para definir

as condições de extração utilizadas incluindo a caracterização da matéria-prima e os testes preliminares de extração supercrítica.

O item 5.2 apresenta os resultados referentes ao rendimento de extração obtidos com as diferentes técnicas, a composição dos extratos e a atividade antibacteriana dos extratos. Estes resultados geraram um artigo intitulado de “Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods” que foi submetido ao periódico Bioresource Technology e encontra-se no Apêndice IV.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira por diferentes métodos é apresentada no artigo 2 (item 5.3), preparado para ser submetido ao periódico Bioresource Technology. O item 5.4 apresenta o Artigo 3 que trata da modelagem matemática das curvas de extração supercrítica da erva baleeira.

Os resultados referentes ao equilíbrio de fases dos sistemas envolvendo α -humuleno + CO₂, *trans*-cariofileno + CO₂ e α -humuleno + *trans*-cariofileno + CO₂ são apresentados no item 5.5. Estes resultados foram publicados no periódico The Journal of Chemical Thermodynamics sob o título de High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and *trans*-caryophyllene e são apresentados no Apêndice IV.

5.1 Resultados Prévios

Os testes preliminares foram realizados para definir as condições de extração supercrítica adequadas para a obtenção de extratos de erva baleeira com CO₂ a alta pressão. Os parâmetros de processo

determinados nos ensaios preliminares foram: tamanho de partícula, massa de sólidos para formação do leito fixo de partículas, volume do leito de extração e tempo de extração.

O tamanho das partículas de erva baleeira utilizadas para a formação do leito de extração foi referente à fração de -20+65 mesh conforme explicado no item 4.2.2. Esta fração foi selecionada devido ao maior rendimento no peneiramento e por proporcionar uma compactação adequada reprodutível do leito de extração supercrítica, sem a formação de canais preferenciais que também é evitado devido ao baixo teor de óleo presente na matéria-prima. A presença ou não de caminhos preferenciais foi verificada através de análise visual do leito após o término da extração.

O leito de extração foi formado com $20,00 \pm 0,01$ gramas de erva baleeira, com umidade de $10,5 \pm 0,4\%$, sendo que o volume ocupado por esta massa de matéria-prima foi calculado através da altura preenchida pelas partículas sólidas compactadas e o diâmetro interno do extrator. O volume ocupado foi de $55,07 \pm 0,05$ mL no extrator do equipamento ESC “1” que contém volume total de 138,5 mL e $51,41 \pm 0,05$ mL no extrator do equipamento de ESC “2” que contém volume de 100,0 mL. O restante do volume dos extratores foi completado com esferas de vidro e entre as esferas de vidro e a matéria-prima foi colocado algodão que é um material inerte para que a matéria-prima não se misturasse com as esferas mantendo assim a altura do leito constante durante a extração.

Para a determinação do rendimento global de extração (X_0) na ESC é necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão analisadas. Desta forma, o tempo foi definido com base nas três etapas da curva de extração conforme descrito no item 3.10.3.

No início da extração na etapa de taxa constante CER, as partículas se encontram completamente envoltas por uma camada superficial de soluto, fazendo com que a extração seja caracterizada pela transferência de massa por convecção entre a superfície do sólido e o solvente. Após a etapa CER de extração segue-se uma etapa de transição, durante a qual a taxa de extração cai rapidamente, provavelmente causada pela exaustão da camada contínua de soluto na superfície das partículas, que começa a apresentar falhas. A partir daí, o processo difusional começa a controlar a transferência de massa, pois o solvente encontra espaços livres para penetração na matriz sólida,

solubilização do soluto, e posterior difusão da mistura soluto-solvente para a superfície da partícula.

A última etapa é a de taxa quase nula de extração. Nesta etapa a inclinação da curva diminui e o traçado se aproxima assintoticamente do valor que representa o conteúdo teórico de soluto extraível (X_0) (FERREIRA, 1991). Assim, para a determinação de X_0 o tempo de extração deve assegurar que esta etapa de extração quase nula seja alcançada.

A Figura 13 apresenta a curva de extração a 150 bar, 40 °C e vazão de 3 g/min obtida no equipamento de ESC 1. Pelo estudo do comportamento da extração do soluto com o tempo, verificou-se que um tempo de extração de 4 horas é suficiente para a extração da maior parte de soluto. Sendo assim, foi fixado um tempo de 4 h para todos os experimentos de obtenção de X_0 .

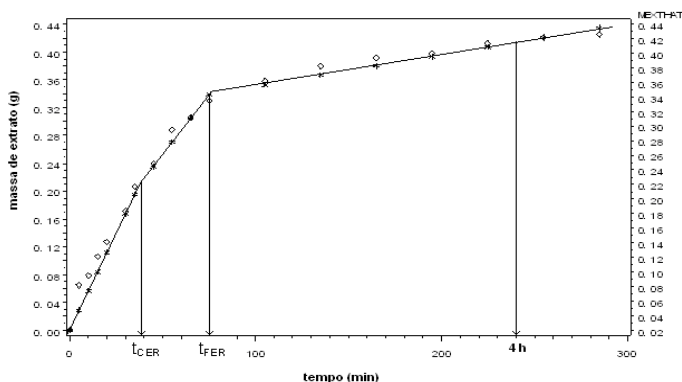


Figura 5: ESC de erva baleeira a 150 bar, 40°C e vazão de 3,0 g/min .

5.2 Rendimento global, composição química e atividade antibacteriana de extratos de *Cordia verbenacea* obtidos por diferentes métodos ¹

Resumo

O presente estudo descreve a composição química e a atividade antibacteriana de extratos de *Cordia verbenacea* D.C. (Borraginaceae), uma planta medicinal tradicional largamente distribuída ao longo da costa sudeste do Brasil. Os extratos foram obtidos usando diferentes técnicas de extração: operações a alta pressão e métodos a baixa pressão. A técnica que usa alta-pressão foi aplicada para a obtenção de extratos de *C. Verbenacea* usando CO₂ puro e CO₂ com co-solvente com pressões de até 300bar e temperatura de 30, 40 e 50°C. Os solventes orgânicos n-hexano, acetato de etila, etanol, acetona e diclorometano foram usados para obtenção de extratos a baixa-pressão. Os rendimentos de extração foram de até 5.0 % (m/m) e de até 8.6 % (m/m) para a extração com fluido supercrítico com CO₂ puro e com acetato de etila como co-solvente, respectivamente, enquanto que a técnica a baixa-pressão mostrou rendimentos de até 24.0 % (m/m) na extração soxhlet usando água e também a mistura aquosa com 50% de etanol como solvente. A atividade antibacteriana dos extratos também foi avaliada contra quatro cepas de bactérias pelo método de diluição em ágar. A atividade inibidora dos extratos foi maior contra as bactérias Gram-positivas se comparado às bactérias Gram-negativas. A análise por CG/EM foi usada para a identificação da composição dos extratos. Os componentes mais importantes identificados foram: artemetina, β -sitosterol, α -humuleno e trans-cariofileno, dentre outros.

Palavras-chave: Extração supercrítica, *Cordia verbenacea*, composição, atividade antibacteriana.

¹Estes resultados foram submetidos ao periódico Bioresource Technology.

5.2.1 Introdução

Atualmente, existe um crescente interesse popular e científico no uso de plantas medicinais para o tratamento de diversos males, incluindo o uso como antimicrobianos.

Estudos da ação antimicrobiana de compostos naturais são de extrema importância, pois o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos é cada vez maior, além da ocorrência de efeitos colaterais como diarreias, vômitos e o aparecimento de manchas dentárias. Com isso, o uso de extratos naturais pode ser de grande ajuda para combater infecções arresponsivas a antibióticos.

O extrato de erva baleeira pode ser obtido por diferentes técnicas de extração e solventes que vão definir tanto a qualidade do extrato quanto o rendimento da extração. Esta seção apresenta o efeito de vários métodos de extração como extração supercrítica com CO₂ puro e com co-solvente e extrações a baixas pressões com solventes orgânicos de diferentes polaridades no rendimento, na composição química e na atividade antibacteriana de extratos de erva baleeira, numa tentativa de contribuir ao uso destes como produtos alternativos para controle microbiano.

5.2.2 Material e Métodos

Os experimentos para determinação do rendimento global (X_0) da ESC de erva baleeira foram realizados em duplicata conforme planejamento experimental apresentado no item 4.4. As extrações foram realizadas com CO₂ supercrítico puro e também com o emprego de co-solventes como etanol e acetato de etila em diferentes concentrações (item 4.5). As condições de extração foram de 100, 200 e 300 bar e 30, 40 e 50 °C, a uma vazão de solvente de 0,3 ($\pm 0,03$) kg CO₂/h por um período de 4 h.

O rendimento global das extrações convencionais por soxhlet maceração e hidrodestilação, realizadas em triplicata com solventes de diferentes polaridades foi determinado conforme descrito no item 4.8.

Os resultados de rendimento para as diferentes técnicas foram avaliados separadamente através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância e o teste de Tukey foi aplicado para avaliar as diferenças significativas entre os pares de médias dos tratamentos (item 4.12).

A determinação da composição química dos extratos foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) conforme o item 4.11 e a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através do método de difusão em ágar e da determinação da

concentração mínima inibitória (MIC) conforme descrito no item 4.10 (SMÂNIA *et al.* 2006).

5.2.3 Resultados

Rendimento Global da Extração Supercrítica

Os resultados de rendimento global de extração (X_0) de erva baleeira com CO_2 supercrítico puro são apresentados na Tabela 3, com os valores de temperatura (T), pressão (P) e densidade de solvente (ρ_{CO_2}) correspondentes. O rendimento global da extração é definido como a quantidade de extrato presente na matriz sólida possível de ser extraído pelo solvente nas condições estabelecidas de temperatura e pressão para um tempo de processo pré-determinado (MARTÍNEZ *et al.* 2005).

Tabela 3: Valores de X_0 obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão para a ESC de erva baleeira.

T (°C)	P (bar)	ρ_{CO_2} (g/cm ³)*	X_0 (%)
30	100	0,772	2,8 ± 0,3
30	200	0,890	3,8 ± 0,3
30	300	0,948	4,2 ± 0,1
40	100	0,629	2,5 ± 0,3
40	200	0,840	3,9 ± 0,4
40	300	0,911	4,8 ± 0,3
50	100	0,385	2,2 ± 0,3
50	200	0,785	4,5 ± 0,2
50	300	0,871	5,0 ± 0,2

* ANGUS *et al.* (1976)

De acordo com a Tabela 3, o maior rendimento de extração foi de 5,0 ± 0,2 %, obtido para a condição de 300 bar e 50 °C e o menor rendimento foi de 2,2 ± 0,3 % para a condição de 100 bar e 50 °C. Os resultados também mostram que o rendimento de extração (X_0) aumenta com a pressão a temperatura constante, para as três isotermas estudadas (30, 40 e 50 °C). Este comportamento é justificado pelo aumento na densidade do solvente supercrítico com a pressão.

Quispe-Condori *et al.* (2007), obtiveram o maior rendimento na ESC de erva baleeira na condição de 300 bar e 50°C com valor de 4,25% e o menor rendimento de 0,11% foi obtido na condição de 78 bar e 40°C.

A Figura 14 apresenta as isotermas de rendimento do extrato de erva baleeira em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os resultados da Tabela 3.

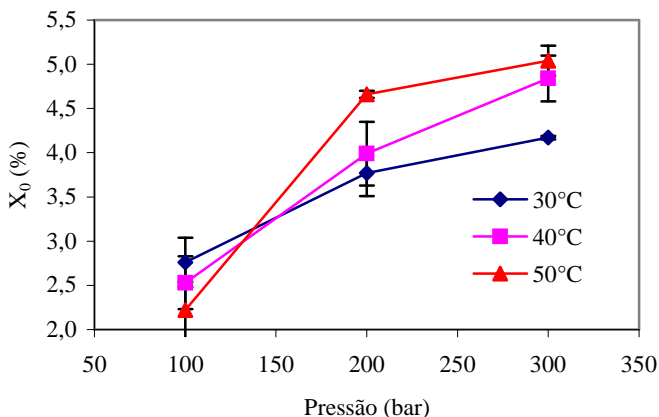


Figura 14: Isotermas de rendimento global para a ESC de erva baleeira.

A avaliação dos resultados de X_0 , obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão, indica o efeito do poder de solubilização do solvente sobre o rendimento do processo (SILVA, 2004). O poder de solubilização do CO₂ no estado supercrítico depende da sua densidade, e nas regiões próximas ao ponto crítico, a densidade aumenta bruscamente com o aumento da pressão à temperatura constante, e também diminui com o aumento da temperatura a pressão constante.

O efeito da temperatura no rendimento de extração, a pressão constante, é devido a dois mecanismos: um aumento na temperatura de processo aumenta a solubilidade devido ao aumento da pressão de vapor do soluto e por outro lado reduz a solubilidade devido a diminuição na densidade do solvente.

As isotermas mostram uma inversão na região entre 140 e 150bar, representando uma possível região de retrogradação. Observa-se na Figura 14 que para pressões abaixo de aproximadamente 140 bar, o

rendimento global aumenta com a redução da temperatura. Neste caso, prevalece o efeito da densidade do solvente (CO_2), que diminui com o aumento da temperatura, provocando a redução da solubilidade dos compostos solúveis de erva baleeira no CO_2 supercrítico. Para pressões superiores a 150 bar, o aumento na pressão de vapor do soluto com a temperatura é mais importante que a diminuição da densidade do solvente e isto faz com que o rendimento aumente com o aumento da temperatura. Este fenômeno de retrogradação representa a influência da pressão de vapor do soluto e do poder de solvatação do solvente no valor da solubilidade e conseqüentemente no rendimento de processo (MICHIELIN *et al.* 2005, CASAS *et al.* 2007, ALMEIDA *et al.* 2007).

Segundo a ANOVA a temperatura ($p=0,116$) não teve efeito significativo sobre o valor de X_0 , no entanto a pressão ($p=0,000$) e o efeito da interação entre pressão e temperatura (0,003) apresentaram efeito significativo no rendimento global de erva baleeira ao nível de 5 % de significância.

O fato da temperatura não apresentar influência significativa sobre o rendimento é devido ao efeito contrário que está apresenta na região de inversão das isotermas (140 a 150 bar). Para pressões menores que a pressão de inversão a menor temperatura (30°C) implica em maior rendimento e para pressões maiores que a pressão de inversão ocorre o contrário e desta forma na análise estatística o efeito da temperatura não se mostra significativo.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 15) apresenta o comportamento do rendimento global (Tabela 3) em função da pressão e temperatura de extração, onde a região mais escura representa a região de maior rendimento.

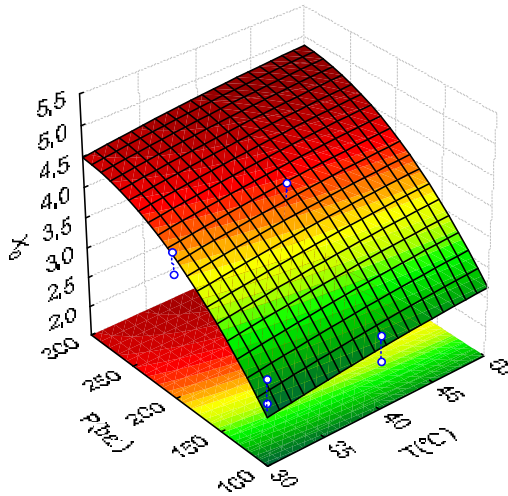


Figura 6: Gráfico de superfície de resposta para o rendimento global da ESC de erva baleeira em função de T e P.

Para representar a dependência do rendimento do processo (X_0) com a temperatura (x_1) e a pressão (x_2), ou seja, $X_0 = f(x_1, x_2)$, uma equação polinomial de segunda ordem foi usada (MONTGOMERY, 2005):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Eq. 5.1}$$

Onde: y representa a resposta experimental (X_0), β_0 , β_i , β_{ii} , e β_{ij} são os coeficientes de regressão; (x_i) e (x_j) são as variáveis independentes (temperatura e pressão).

O modelo com os termos linear, quadrático e de interação entre as variáveis é representado pela seguinte equação:

$$X_0 = 1,422 - 0,019T + 0,016P - 0,0004T^2 - 0,00005P^2 + 0,00035TP \quad \text{Eq. 5.2}$$

A equação de regressão (Equação 5.2.) obtida a partir da superfície de resposta, pode ser aplicada para encontrar valores de X_0 obtidos em outras condições de temperatura e pressão mas que estejam dentro da faixa avaliada neste estudo.

Para averiguar a significância da temperatura no rendimento foi realizada a análise estatística dos valores de X_0 para a faixa de pressão acima do ponto de inversão das isothermas, na região onde o efeito da pressão de vapor sobre X_0 é dominante, desconsiderando assim a faixa de pressão onde ocorre a inversão das isothermas. Através da ANOVA a temperatura ($p=0,0074$) e a pressão ($p=0,0040$) apresentaram efeito significativo sobre o valor de X_0 ao nível de 5 % de significância.

A Figura 16 apresenta o gráfico de superfície de resposta para o rendimento global de erva baleeira para as pressões maiores que a pressão de inversão das isothermas.

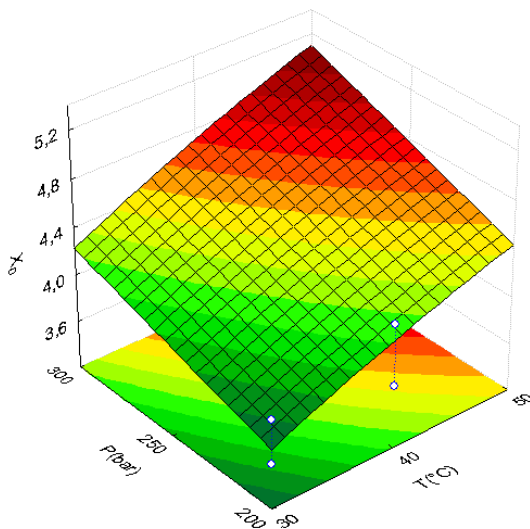


Figura 7: Superfície de resposta para o X_0 da ESC de erva baleeira para as pressões de 200 e 300 bar em função da temperatura.

O modelo com os termos linear, quadrático e de interação entre as variáveis para a faixa de pressão de 200 a 300 bar é representado pela seguinte equação:

$$X_0 = 1,328 + 0,0567T + 0,00316P - 0,00042T^2 + 7 \times 10^{-5}TP \quad \text{Eq. 5.3}$$

Para a faixa de pressão de 200 a 300 bar a temperatura mostrou que tem influência significativa sobre o valor de X_0 , comportamento contrário ao encontrado quando se avalia os resultados como um só conjunto. Neste intervalo de pressão a temperatura que fornece o maior rendimento é de 50 °C.

A Figura 15 assim como a Figura 16 indica que é necessário avaliar uma faixa maior de condições para se averiguar a tendência de X_0 com a temperatura e pressão de operação.

Ao comparar os resultados obtidos na ESC com CO_2 (Tabela 3) com os da extração soxhlet (Tabela 5), notamos que os solventes orgânicos utilizados apresentaram rendimentos maiores do que a ESC, isto pode ser devido ao caráter polar desses solventes, que extraem compostos normalmente não extraídos na ESC, visto que o CO_2 é apolar. E apesar do hexano também ser apolar, o volume do solvente utilizado na extração soxhlet, e o tempo de extração prolongado (6h) podem ter contribuído para um maior rendimento (15,2 %), se comparado aos valores da ESC.

Emprego de co-solvente (CS)

O emprego de co-solvente na ESC de erva baleeira foi realizado para melhorar o desempenho da ESC com CO_2 puro em termos de rendimento e qualidade dos extratos. Os solventes orgânicos etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc) foram selecionados para o emprego como co-solventes na ESC, nas concentrações de 2, 5 e 8% em massa em relação ao CO_2 .

As extrações foram realizadas na condição de maior rendimento, que foi de 300 bar e 50°C e vazão de 0,3 kg/h por um período de 4 h, e foi avaliado o rendimento de extração em função da concentração e tipo de co-solvente empregado. A influência da concentração de co-solvente no rendimento da ESC, para os dois co-solventes selecionados, pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimento global (X_0) da ESC de erva baleeira em função das diferentes concentrações de co-solventes empregados.

Co-solvente	X_0 (%) m/m
2% EtAc	5,4 ± 0,1
5% EtAc	8,6 ± 0,3
8% EtAc	7,1 ± 0,2
2% EtOH	6,5 ± 0,3
5% EtOH	7,7 ± 0,2
8% EtOH	7,3 ± 0,1

Os resultados da Tabela 4 mostram um aumento de 72% no rendimento quando comparado ao CO₂ puro (Tabela 3), alcançando rendimentos de até 8,6% (m/m) utilizando 5% de acetato de etila como co-solvente. Este comportamento é devido ao aumento do número de compostos solúveis na mistura, reduzindo a seletividade e aumentando o rendimento do processo.

Segundo a ANOVA dos rendimentos obtidos com diferentes concentrações de acetato de etila como co-solvente, existe diferença significativa quando aumenta-se a concentração de 2 para 5% (m/m) com $p=0,015$, no entanto quando aumenta-se a concentração de 5 para 8% o rendimento não difere significativamente ao nível de 5% de significância ($p=0,1096$). Já o emprego de etanol como co-solvente em diferentes concentrações não apresentou diferença significativa no rendimento de extração.

O efeito da concentração de co-solvente no rendimento de extração é melhor observado na Figura 17, para os dois co-solventes estudados em concentrações de 2, 5 e 8% (m/m). O emprego de co-solvente resultou no aumento de rendimento até a concentração de 5%, para ambos os co-solventes, e na redução do mesmo para a concentração de 8%.

A maior quantidade de co-solvente (8%) favorece as interações soluto/co-solvente, reduzindo as interações com o CO₂, e desta forma reduz o rendimento, comportamento também observado por Campos *et al.* (2008) durante a extração de bagaço de uva com misturas de CO₂ e etanol e por Kitzberger *et al.* (2007), na extração de shiitake. O fato de o

rendimento diminuir na maior concentração de co-solvente também pode ser devido a polaridade destes, já que estes solventes extraem preferencialmente compostos polares e desta forma a extração de compostos apolares fica prejudicada.

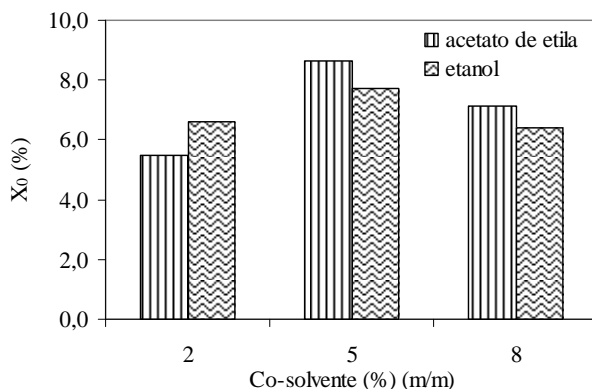


Figura 8: Efeito da concentração e do tipo de co-solvente no rendimento da ESC de erva baleeira.

Na concentração de 5% de co-solvente obteve-se os maiores rendimentos indicando que houve quebra nas interações soluto matriz-sólida e a substituição pelo co-solvente nos sítios ativos da matriz (HOLLENDER *et al.* 1997). Geralmente o tipo de co-solvente tem mais efeito na eficiência da extração do que sua concentração. A maioria deles alcança melhores resultados em altas concentrações, enquanto outros reagem ao contrário. O tipo de interação matriz-compostos e os parâmetros físico-químicos do co-solvente têm maior impacto sobre a eficiência da extração (LUTERMANN *et al.* 1998).

Rendimento Global das Extrações com Solventes Orgânicos

A Tabela 5 apresenta os resultados de rendimento obtidos nas extrações por maceração e soxhlet utilizando os solventes n-hexano (Hx), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtAc), etanol (EtOH), acetona, água e misturas aquosas (etanol + água), bem como o valor de rendimento obtido na hidrodestilação. A Tabela 5 também apresenta a polaridade dos solventes empregados e a análise estatística através do teste de Tukey.

Tabela 5: Rendimento global das extrações convencionais de erva baleeira.

Método / Solvente	Polaridade (²)	Rendimento (%) (¹)
Soxhlet		
Hx	0,00	14,9 ± 0,4 ^{ad}
DCM	3,40	12 ± 2 ^{ad}
EtAc	4,30	14,8 ± 0,5 ^{ad}
EtOH	5,20	14,2 ± 0,1 ^{ad}
Acetona	5,40	10 ± 1 ^a
EtOH 50% (50:50 v/v etanol- água)	7,10	24 ± 3 ^{ce}
EtOH 25% (25:75 v/v etanol- água)	8,05	15 ± 2 ^d
Água	9,00	24 ± 2 ^{be}
Maceração		
Hx	0,00	4,3 ± 0,3 ^a
DCM	3,40	2,69 ± 0,07 ^b
EtAc	4,30	0,26 ± 0,01 ^c
Água	9,00	0,6 ± 0,1 ^c
Hidrodestilação		0,9 ± 0,2

¹ Médias seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes pela análise do teste de Tukey com $p < 0.05$.

² Polaridade da mistura aquosa calculada pela equação $(IA/100 \times PA) + (IB/100 \times PB)$ onde IA e IB são a polaridade dos solventes A e B e PA e PB as porcentagens dos solventes na mistura (Markom *et al.* 2007).

Na Tabela 6 são apresentadas algumas propriedades dos solventes utilizados nas extrações como viscosidade, temperatura de ebulição, constante dielétrica, energia de coesão e tensão superficial, que podem auxiliar no entendimento da influência destes parâmetros no rendimento de extração.

De acordo com o teste de Tukey os rendimentos dos extratos (Tabela 5) obtidos através de soxhlet com n-hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e acetona não diferem entre si ao nível de 5% de significância. A água e a mistura aquosa de 50% etanol fornecem

rendimentos iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância e apresentaram diferença significativa em relação aos demais.

Tabela 6: Propriedades dos solventes.

	Viscosidade (mPa)	Temperatura de ebulição (°C)	Constante dielétrica	Energia de coesão (Jmol/mL)	Tensão Superficial (cal/mol A ²)
n-Hexano	0,3	69	1,88	200,76	25,75
DCM	0,41	40	8,93	400,22	39,15
EtAc	0,45	77	5,99	300,64	33,67
Acetona	0,31	56	20,49	362,07	33,77
Etanol	1,07	78	24,85	618,87	31,62
Água	0,89	100	78,36	2095,93	104,70

Fonte: Gu *et al.* 2004.

O maior rendimento foi obtido na extração soxhlet com água e com a mistura aquosa 50% etanol/água com valor de 24 %. Este resultado indica que a erva baleeira possui grande quantidade de compostos solúveis em solventes polares como a água com polaridade de 9,0 (BYERS, 2006). Segundo Barwick (1997), a polaridade pode ser definida como a habilidade da molécula em participar de interações de todas espécies (por pontes de hidrogênio, interações do tipo dipolo e forças de dispersão) com outras moléculas polares. A temperatura de operação, o reciclo do solvente e as interações entre água e soluto podem ter contribuído para a dissolução. A água tem viscosidade e tensão superficial altas, características que normalmente não são desejadas na extração, uma vez que impedem a absorção do solvente nos sítios ativos da matriz. No entanto, a constante dielétrica e energia coesiva são significativamente mais altas e dessa forma, as moléculas de água são fortemente ligadas aos componentes polares extraíndo-os (MARKOM *et al.* 2007).

Na extração soxhlet o solvente é utilizado na temperatura de ebulição, e nesta condição, a tensão superficial e viscosidade do solvente são grandemente reduzidas quando comparadas com uma temperatura mais baixa, portanto o solvente pode alcançar os sítios ativos dentro da

matriz com maior facilidade solubilizando os solutos (MARKOM *et al.* 2007).

Segundo Markom *et al.* (2007), características como a constante dielétrica (capacidade de atenuar campos elétricos e, portanto, auxiliar na interação entre cargas) do solvente podem afetar a extração de determinados compostos. O autor observou em seu trabalho que a recuperação de taninos somente foi possível quando utilizou-se solventes com constante dielétrica maior que 20 (acetona, etanol, metanol e água) e solventes como diclorometano, clorofórmio e n-hexano não foram eficientes.

Xu & Godber (2000), estudaram a extração de γ -oryzanol de arroz usando n-hexano, acetato de etila, isopropanol e diferentes combinações de solventes. O efeito da temperatura mostrou-se significativo, possibilitando ao solvente modificar a estrutura da matriz sólida, mas não foi determinante na extração do soluto. A comparação entre os solventes mostrou que a extração é atribuída mais significativamente a polaridade do solvente do que a temperatura de processo.

A extração por maceração promoveu rendimentos inferiores do que a extração soxhlet, provavelmente devido a baixa temperatura e a falta de refluxo quando comparada a extração soxhlet. O rendimento da fração n-hexano (4,08%) apresentou valor comparável às extrações com CO₂ supercrítico. Sertié *et al.* (2005), obtiveram extrato bruto de erva baleeira por maceração com etanol 70%, este foi liofilizado apresentando rendimento de 7%. Ticli *et al.* (2005), realizaram maceração de folhas secas de erva baleeira em clorofórmio seguido de metanol obtendo rendimento de 2,25%.

O rendimento obtido na hidrodestilação (0,9%) foi inferior a todos os rendimentos obtidos na extração supercrítica, nas diferentes condições de operação. No entanto, deve-se salientar que na hidrodestilação a ebulição do solvente provoca a formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis presentes na amostra, sendo então o extrato caracterizado como óleo essencial. Já nos demais processos como maceração, soxhlet e ESC os solventes e as condições de processo empregadas permitem a obtenção de extratos que são misturas complexas de compostos alcançando-se assim maiores rendimentos. Em seus trabalhos, Passos *et al.* (2007), Carvalho Jr. *et al.* (2004) e Akisue *et al.* (1983) obtiveram rendimento de 0,37%, 0,23% e 1,1%, respectivamente, na hidrodestilação de erva baleeira. Esta diferença no rendimento verificada na literatura pode ser devida ao processo de

secagem empregado no material, ao período de colheita, ao solo e clima que influenciam na composição do material vegetal.

A água é considerada uma substância anfótera, ou seja, pode se comportar tanto como um ácido como uma base. Na hidrodestilação, o hidrogênio ligado ao oxigênio torna a água consideravelmente ácida e então, esse comportamento pode levar a formar ligações de hidrogênio com os ânions, estabilizando-os e diminuindo a sua reatividade (MORRISON & BOYD, 1981). Além disso, a alta temperatura utilizada na hidrodestilação (100 °C) juntamente com tempo de processo prolongado (6 h) podem destruir compostos voláteis, reduzindo o rendimento da extração.

Em seu trabalho Quispe-Condori *et al.* (2007) estudaram a extração de erva baleeira cultivada em Campinas, São Paulo, obtendo rendimento de 8,13% na extração soxhlet com etanol e de 0,55% na hidrodestilação.

A determinação do rendimento e da atividade biológica dos extratos convencionais obtidos com diferentes solventes é fundamental para a seleção do co-solvente a ser utilizado na ESC a fim de melhorar o rendimento global de extração, ampliando o espectro de compostos da matriz sólida solubilizados pelo solvente. Desta forma o etanol e o acetato de etila parecem ser os solventes mais adequados para auxiliar na extração de compostos de natureza polar, pois apresentaram bons valores de rendimento na extração soxhlet (Tabela 5) e de atividade antioxidante conforme item 5.3.

Composição Química dos Extratos

A Figura 18 apresenta o cromatograma obtido através de CG-EM para o extrato de erva baleeira obtido na condição de 50 °C e 300 bar utilizando CO₂ supercrítico puro como solvente. No Apêndice V são apresentados os CG-EM dos extratos de erva baleeira obtidos em outras condições de ESC e também com outros solventes orgânicos.

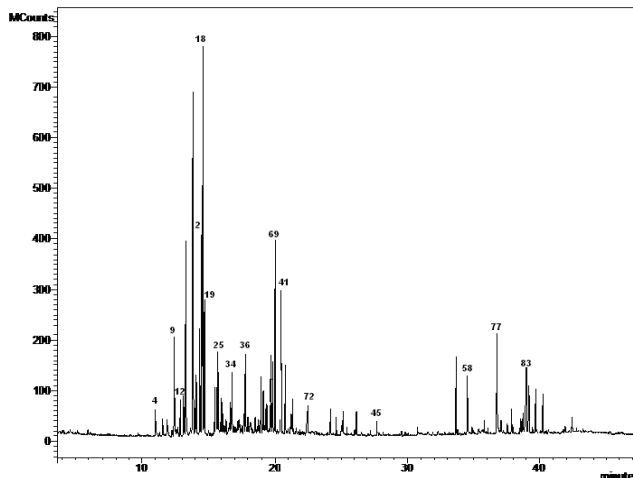


Figura 9: CG-EM do extrato de erva baleeira obtido com CO₂ supercrítico a 50°C e 300 bar.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados de composição, com o nome dos compostos, tempo de retenção e porcentagem de área para os seguintes extratos: ESC a 50 °C e 300 bar, 30 °C e 100 bar, ESC com 5% de EtAc e 5% EtOH como co-solvente, e extratos obtidos por soxhlet com EtAC e EtOH. Foram identificados oitenta e dois compostos de diferentes classes que são apresentados na Tabela 7 separadamente conforme a família a que pertencem como: monoterpenos, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, álcoois e flavonóides. Os principais compostos identificados em termos de % de área foram: (1) α -curcumeno, (2) calameneno, (13) aromadendreno, (18) α -sesquifelandreno e (24) espatulenol.

Outros compostos químicos importantes, também detectados nos extratos de erva baleeira são: α -humuleno, β -cariofileno, cariofileno óxido, lupeol e artemetina.

Tabela 7: Componentes identificados nos extratos de erva baleeira com seus respectivos tempos de retenção e porcentagem de área.

	Componentes	% Área (cromatograma)						
		TR (min)	ESC				Soxhlet	
			* 5% EtOH	* 5% EtAc	50°C/ 300bar	30°C/ 100bar	EtOH	EtAc
Monoterpenos hidrocarbonetos								
1	α -Curcumeno	13,788	-	0,512	7,277	4,441	-	7,469
2	Calameneno	14,505	-	2,362	4,360	3,700	7,820	4,007
3	Dicumeno	16,599	-	-	-	-	1,138	-
Sesquiterpenos hidrocarbonetos								
4	α -Cubebeno	11,033	1,113	1,265	0,643	-	-	0,820
5	Copaeno	11,548	-	-	0,374	-	-	0,476
6	α -Cubebeno	11,883	-	-	0,354	-	-	-
7	α -Elemeno	11,894	-	1,585	-	-	-	-
8	4,11,11-Trimetil-8-metilenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	12,365	-	5,977	-	-	-	-
9	β -Cariofileno	12,382	5,841	-	2,678	1,779	-	-
10	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimetil-8-metileno-[1R-(1R*,4Z,9S*)]	12,423	-	-	-	-	-	2,558
11	α -Bergamoteno	12,849	-	-	0,703	-	-	0,596
12	α -Humuleno	13,090	1,895	2,101	1,243	1,672	-	1,098
13	Aromadendreno	13,209	-	11,84	-	2,698	6,422	4,405
14	Alloaromadendreno	13,234	13,31	-	4,141	-	-	-
15	α -Farneseno	13,366	-	-	0,315	-	-	-
16	α -Zingibereno	14,087	-	-	1,120	11,500	-	-
17	α -Bisaboleno	14,349	-	-	2,010	1,633	-	1,365
18	α -Sesquifelandreno	14,596	1,358	1,465	9,115	8,985	-	6,463
19	Naftaleno, 1,2,3,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)	14,703	2,749	2,578	3,002	2,072	2,828	2,946
Sesquiterpenos oxigenados								
20	α -Terpinil acetato	11,137	0,427	-	-	-	-	-
21	6,10-Dodecadien-1-yn-3-ol, 3,7,11-trimetil	12,849	-	-	-	1,697	-	-
22	Germacreno D-4-ol	14,371	3,089	2,718	1,908	1,974	1,745	1,037
23	D-Nerolidol	15,459	-	-	0,238	-	-	-
24	Espatuleno	15,538	3,523	3,542	1,227	1,273	3,586	1,146
25	Óxido de cariofileno	15,602	-	-	1,332	0,946	0,820	1,563
26	1-Hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno	15,730	1,091	1,809	1,848	1,940	-	1,511
27	LanceoLicis	15,924	0,876	-	-	-	-	-
28	Viridiflorol	15,986	-	-	-	0,691	1,599	0,764
29	Ledol	15,991	1,641	1,297	0,626	-	-	-
30	1,5,5,8-Tetrametil-12-oxa bicyclo [9.1.0]dodeca-3,7-diene	16,118	-	-	0,305	-	-	-
31	α -Bisabolol	16,336	-	-	0,233	-	-	2,307
32	Tetraciclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimetil	16,671	-	-	0,626	0,645	1,386	0,545
33	Torreol	16,757	1,23	1,122	-	-	-	-
34	Cubenol	16,765	-	-	1,543	1,553	-	1,575
35	7-Tetraciclo [6.2.1.0 (3,8)0(3,9)] undecanol, 4,4,11,11-tetrametil	17,420	-	-	0,446	-	-	0,609
36	β -Cedren-9- α -ol	17,821	-	-	2,114	-	-	1,397
37	Spiro[4.5]decan-7-one, 1,8-dimetil-8,9-epoxi-4-isopropil	18,952	-	-	1,171	-	-	1,217
38	1-Naftalenol, 5,6,7,8-tetrahydro-2,5-dimetil-8-(1-metiletil)	19,291	3,018	2,518	0,453	1,247	-	0,643
39	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	20,337	-	-	-	-	-	0,742
40	Trans-Z- α -Bisaboleno epoxido	20,449	-	-	2,900	0,728	-	-
41	5,9,13-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimetil-, (E,E)	20,498	-	-	2,408	-	-	-
42	7,11-Hexadecadienal	20,513	-	-	-	-	-	1,862
43	Cis-Z- α -Bisaboleno epoxido	21,294	-	-	-	-	-	0,751
44	trans-Farnesol	27,753	-	-	0,408	-	-	-
Triterpenos								
45	Esqualeno	33,718	0,921	1,648	1,460	3,842	-	-
46	Lupenone	38,949	-	-	-	3,107	-	-
47	Lupeol	39,169	1,258	2,049	1,421	2,586	5,287	1,566
48	Lupeol acetato	40,183	1,258	1,230	1,072	1,514	4,210	1,378

Terpenos Acíclicos								
49	Phytol	24,598	1,361	-	0,327	-	-	0,627
Alcoois								
50	3-Buten-2-ol, 2-metil-4-(1,3,3-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-yl)	19,123	-	-	1,048	-	-	1,283
51	10-Metil-8-tetradecen-1-ol acetato	19,140	-	-	-	-	-	0,794
52	2-Metil-Z,Z-3,13-octadecadienol	19,959	-	-	-	0,968	-	-
53	Hexadecen-1-ol, trans-9	24,178	1,23	-	0,436	0,686	-	0,478
54	Hexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol, 3,7,11,16-tetrametil-, (E,E,E)	26,100	-	1,878	-	-	-	-
55	2,6,10,14-Hexadecatetraen-1-ol, 3,7, 11,15-tetrametil-, acetato, (E,E,E)	26,147	-	-	0,486	0,520	-	-
56	1-Hentetracontanol	34,536	-	-	-	2,412	6,161	-
57	13-Tetradecen-1-ol acetato	36,669	-	-	1,601	-	8,595	0,709
Outros								
58	3-Allil-2-methoxifenol	11,323	2,310	-	-	-	-	-
59	Eugenol	11,355	0,678	-	-	-	-	-
60	Acetuegenol	14,783	-	0,653	-	-	-	-
61	o-Toluilic acid, tridec-2-ynyl ester	15,708	-	-	-	-	2,212	0,583
62	Phenol, 2-metil-5-(1,2,2-trimetil ciclopentil)-, (S)	16,640	2,448	2,046	-	-	-	-
63	1-(2,4-Dimetilfenil)-3-(tetrahydrofúril-2)propano	16,724	-	-	-	-	4,440	-
64	1 α -Cadin-4-en-10-ol	16,757	-	-	-	-	-	-
65	Benzenesulfanomide N-butil	19,348	-	1,852	1,088	1,614	-	-
66	3-Buten-2-one, 4-(5-hidroxi-2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl)	19,643	-	0,926	1,572	1,165	-	-
67	Farnesil acetona	19,802	-	-	1,680	2,435	-	1,883
68	7, 11- Hexadecodienal	20,004	-	-	4,626	-	-	3,170
69	Farnesil acetato	20,372	-	-	-	0,640	-	-
70	1a,2,5,5-Tetrametil-cis-1a,4a, 5,6,7,8-Hexahidro-gamma-chromeno	21,353	-	-	0,600	0,785	-	0,992
71	Ácido n-Hexadecanoico	22,456	1,845	1,346	0,998	2,191	4,235	1,853
72	Oxacicloheptadeca-8-en-2-one	24,996	-	-	-	-	-	0,397
73	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	25,079	-	-	0,662	-	-	1,346
74	2,6,10,14,18-Pentametil-2,6,10,14,18-eicosapentaene	26,140	2,411	1,387	0,292	0,990	-	-
75	Octadecil trifluoroacetato	34,543	2,876	-	-	-	-	-
76	17-Pentatriaconteno	36,695	2,874	2,487	2,674	2,180	-	1,862
77	Stearil acetato	37,835	-	-	-	0,532	-	-
78	1-Hexacoseno	38,764	-	-	0,594	-	-	-
79	FW 306	38,972	-	-	1,912	-	-	-
80	Triciclo[20.8.0.0(7,16)] triacontane, 1(22),7(16)-diepoxi	42,399	-	2,144	-	-	-	-
81	β -Sitosterol	38,507	-	0,864	0,270	-	-	0,638
Flavonoides								
82	Artemetina	38,965	-	3,847	1,236	-	10,14	2,378

* Extrato obtido a 50°C e 300bar.

Dentre as substâncias apresentadas na Tabela 7 pode-se observar que a erva baleeira apresenta compostos como o lupeol, um triterpeno pentacíclico, uma molécula biologicamente ativa com um grande espectro de propriedades medicinais, incluindo forte atividade antioxidante, efeito antiinflamatório, antiartrítico, antimutagênico (NAGARAJ *et al.* 2000, GEETHA *et al.* 2001).

O sesquiterpeno β -cariofileno (trans-cariofileno) apresenta atividade anticarcinogênica e antiinflamatória (ZHENG *et al.* 1992), enquanto o espatulenol e o óxido de cariofileno possuem propriedades antibacterianas (LIMBERGER *et al.* 2004, VEIGA Jr. *et al.* 2002).

Os sesquiterpenos α -humuleno e β -cariofileno são importantes componentes extensivamente estudados na literatura. Passos *et al.* (2007) e Fernandes *et al.* (2007) demonstraram que a atividade antiinflamatória atribuída à erva baleeira é devido a presença destes compostos.

Outra importante substância detectada nos extratos de erva baleeira é o flavonóide artemetina. Este flavonóide apresenta ação antiinflamatória e foi isolado e identificado na *C. verbenacea* por Sertié *et al.* (1990). O componente β -sitosterol, extraído a 300 bar e com acetato de etila é indicado para o tratamento de muitas doenças como aterosclerose, hiperplasia benigna de próstata e câncer de cólon (NAIR *et al.* 2006, YOKOTA *et al.* 2006).

A análise de CG-EM mostrou um aumento no número de compostos identificados com o aumento da pressão de extração (de 100bar para 300bar) na ESC com CO₂ puro. O número de compostos identificados no extrato supercrítico obtido a 50°C e 300 bar (52 compostos) com CO₂ puro foi maior do que nos extratos supercríticos obtidos na mesma condição mas com a adição de co-solvente (5% de EtAc e 5% EtOH). Para estes últimos extratos o número de compostos identificados foi de 26 e 29, respectivamente.

A literatura indica que o emprego de co-solvente na ESC reduz a seletividade do processo e o resultado apresentado acima parece contradizer este comportamento (REVERCHON & De MARCO, 2006). Entretanto, a análise de composição por CG-EM detecta preferencialmente substâncias apolares ou de polaridade média. Na cromatografia gasosa os componentes polares se movem mais lentamente que os apolares. Portanto, este método analítico é mais adequado para detectar preferencialmente substâncias apolares, sendo mais apropriado para caracterizar extratos obtidos por ESC com CO₂ e verificar a importância deste método de extração na obtenção de substâncias valiosas no extrato de baleeira de erva.

Portanto, conclui-se que o uso de EtAc e EtOH afeta a seletividade do processo por reduzir o número dos componentes apresentados na Tabela 7, mas também aumenta a extração de substâncias polares não completamente separadas e detectadas pela análise de CG-EM realizada. Este comportamento também foi verificado no perfil químico dos extratos obtidos por soxhlet e maceração os quais também apresentaram menor número de compostos. Os extratos obtidos por soxhlet com EtOH e EtAc contêm 17 e 43 compostos identificados, respectivamente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7 observamos que os extratos de erva baleeira contêm alta proporção de monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados e de acordo com Kotan *et al.* (2007), especialmente os monoterpenos oxigenados, são os principais responsáveis pela atividade antibacteriana. Por outro lado, a atividade biológica de um extrato, como a atividade antibacteriana não pode ser atribuída a ação de um único componente, porque possíveis efeitos de sinergismo entre os componentes podem ter um papel importante na atividade do extrato (ALVAREZ-CASTELLANOS *et al.* 2001).

A análise por CG-EM mostrou um aumento no número de compostos identificados com o aumento da pressão de extração para o CO₂ puro. O emprego de co-solvente na ESC não contribuiu para aumentar o espectro de compostos identificados, se comparado aos extratos obtidos com CO₂ puro. Entretanto, o uso de outros métodos, como HPLC, poderia detectar a presença de outras substâncias com maior polaridade, evidenciando a redução da seletividade do processo, não verificada aqui pela análise de CG realizada.

Avaliação da Atividade Antibacteriana dos extratos pelo método de Difusão em Agar

A atividade antibacteriana dos extratos obtidos com as diferentes técnicas de extração foi avaliada segundo o procedimento descrito no item 4.11 (SMÂNIA *et al.* 1995; KITZBERGER *et al.* 2007). Como um teste inicial de triagem foi aplicado o método qualitativo de difusão em ágar descrito no item 4.11.1 o qual testa se o extrato inibe ou não o crescimento do microrganismo de interesse. Os extratos que apresentaram os maiores halos de inibição dos microrganismos no teste de difusão foram submetidos ao método quantitativo de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação da MIC (mínima concentração inibitória) que refere-se à menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento de determinado microrganismo

Os extratos obtidos por extração supercrítica com CO₂ puro em diferentes condições de T e P e com 5% de acetato de etila e etanol como co-solventes e extratos obtidos com diferentes solventes por soxhlet e maceração foram testados contra as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* através do método de difusão em ágar.

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos através do teste de difusão em ágar em termos de tamanho dos halos de inibição para os microorganismos testados e a Figura 19 mostra uma foto do teste onde é

possível observar os halos formados. Um halo de inibição superior a 9 mm de diâmetro é considerado um resultado positivo. Os extratos foram mais efetivos contra o crescimento microbiano das bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quando comparados às bactérias Gram-negativas (*E. Coli* e *P. aeruginosa*). O mesmo comportamento também foi verificado por Kitzberger *et al.* (2007) e por Boussaada *et al.* (2008). A maior resistência das bactérias Gram-negativas pode ser devido a diferenças na membrana celular destes grupos de bactérias. A membrana externa da bactéria Gram-negativa é altamente hidrofílica, enquanto que a membrana externa da bactéria Gram-positiva tem caráter lipofílico que reduz a sua resistência a penetração de compostos com propriedades antibacterianas (ULTEE *et al.* 1999).

De todos os microorganismos testados a *E. coli* demonstrou ser o mais resistente, apresentando halo de inibição somente para os extratos soxhlet obtidos com 25% de EtOH, água, hexano e acetato de etila, com halos de inibição de 16 mm, 12 mm, 11 mm and 12 mm, respectivamente. O extrato aquoso 25% etanol de maneira geral foi o mais efetivo (tamanho do halo maior que 9 mm) contra o crescimento de todas as bactérias testadas pelo método de difusão em ágar.

O extrato supercrítico obtido a 40 °C e 200 bar foi o mais eficiente contra o crescimento de *S. aureus*, com halo de inibição de 31 mm, e todos os extratos testados mostraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* pelo método de ADM.

Tabela 8: Teste de difusão em ágar para os diferentes extratos de erva baleeira.

Extrato	Extrato/ Condições	Halo (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	100bar/30°C	09	11	00	12
2	100bar/40°C	15	12	00	00
3	100bar/50°C	15	15	00	11
4	200bar/30°C	15	13	00	00
5	200bar/40°C	31	12	00	00
6	200bar/50°C	15	13	00	00
7	300bar/30°C	16	13	00	11
8	300bar/40°C	15	13	00	10
9	300bar/50°C	17	11	00	00
10	CO ₂ + 5% EtAc	17	14	00	10
11	CO ₂ + 5% EtOH	15	12	00	09
12	Maceração EtAc	19	16	00	11
13	Maceração Hx	18	23	00	09
14	Maceração Água	20	13	00	00
15	Maceração DCM	19	14	00	00
16	Soxhlet 25% EtOH	25	15	16	21
17	Soxhlet 50% EtOH	18	11	00	00
18	Soxhlet EtOH	16	13	00	00
19	Soxhlet Água	20	10	12	16
20	Soxhlet Acetona	15	13	00	00
21	Soxhlet DCM	18	14	00	00
22	Soxhlet Hx	15	13	11	12
23	Soxhlet EtAc	21	16	12	00

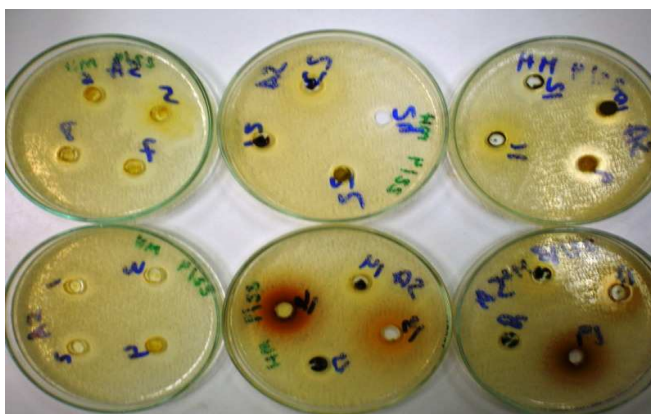


Figura 19: Foto do teste de difusão em ágar mostrando os halos de inibição.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A seleção dos extratos a serem avaliados quantitativamente foi baseada no tamanho dos halos de inibição apresentados. Os extratos selecionados para o teste de microdiluição em caldo de cultivo são apresentados na Tabela 9 com os respectivos resultados de MIC.

De maneira geral não há um acordo no nível aceitável de inibição de materiais obtidos de plantas quando comparado com padrões. Embora, de acordo com Duarte *et al.* (2007), Wang *et al.* (2008) e Sartoratto *et al.* (2004), seja possível classificar os materiais, como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de MIC apresentado pelos seus extratos. A classificação apresentada é a seguinte: forte inibidor para MIC até 500 µg/mL; moderado inibidor para MIC entre 600 e 1500 µg/mL; fraco inibidor para MIC acima de 1600 µg/mL. Esta classificação é muito útil para detectar o potencial antibacteriano de vários extratos de plantas com atividade biológica.

Os extratos supercríticos obtidos a 300 bar e 30 °C (CO₂ puro) e 300 bar e 50°C com 5% de acetato de etila e 5% de etanol como co-solvente apresentaram a menor concentração inibitória contra o crescimento de *B. cereus*, com MIC menor que 7,8 µg/mL, 15,6 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente. Os baixos valores de MIC apresentados indicam a ESC como o melhor método para obtenção de extratos de erva baleeira com forte poder inibidor, de acordo com a classificação apresentada previamente (forte inibidor MIC < 500µg/mL). A redução da densidade do fluido supercrítico (aumento da pressão e redução da temperatura) aumentou o valor do MIC contra o *B. cereus*. Este comportamento indica que maior poder solvente é necessário pra a obtenção de compostos com potencial antimicrobiano.

Para a bactéria *S. aureus* pode-se verificar da Tabela 9 que os extratos que apresentaram as concentrações mais baixas foram os extratos supercríticos obtidos com co-solvente (etanol e acetato de etila) e também a fração acetato de etila da maceração com MIC de 250 µg/mL.

Os extratos mais efetivos contra a bactéria *P. aeruginosa* foram o extrato supercrítico com 5% de etanol e os extratos soxhlet 25% etanol e água com MIC de 1000 µg/mL.

Tabela 9: Valores de MIC para a erva baleeira determinados pelo método de microdiluição.

Extrato	Extrato/Condições	MIC (µg/mL)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
3	100bar/50°C	1000	125	NT	>4000
5	200bar/40°C	500	46,8	NT	NT
7	300bar/30°C	375	<7,8	NT	>4000
10	CO ₂ + 5% EtAc	250	15,6	NT	>4000
11	CO ₂ + 5% EtOH	250	31,25	NT	1000
12	Maceração EtAc	250	46,8	NT	1500
16	Soxhlet 25% EtOH	2000	1000	2000	1000
19	Soxhlet Água	2000	2000	2000	1000
22	Soxhlet Hx	NT	NT	2000	>4000
23	Soxhlet EtAc	500	46,8	2000	NT

NT: não testado.

Estes resultados indicam que a ESC é uma poderosa tecnologia para obtenção de compostos com propriedades antibacterianas de erva baleeira, para vários microorganismos.

A bactéria *E. coli* teve o crescimento inibido somente pelos extratos soxhlet com MIC de 2000 µg/mL.

Comparando-se as Tabelas 8 e 9 pode-se observar que os maiores valores do halo de inibição (31 e 25 mm) obtidos para os extratos 200 bar e 40°C e soxhlet 25% etanol (testados para *S. aureus*) não resultaram nas menores concentrações de inibição (46,8 e 1000 µg/mL), isto porque embora o tamanho da zona de inibição no teste de difusão possa depender da sensibilidade do organismo ao antimicrobiano, isso não pode ser usado para comparar a potência das amostras.

Duarte *et al.* (2007), investigaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cordia verbenacea* contra 13 diferentes *Escherichia coli* serotipos, o extrato não se mostrou efetivo contra as bactérias apresentando MIC > 1000 µg/mL. O mesmo autor avaliou a atividade de uma amostra comercial de *trans*-cariofileno contra dois serotipos diferentes de *Escherichia coli*, a mesma apresentou MIC > 1000 µg/mL. Este composto identificado como um dos responsáveis pela atividade antiinflamatória desta planta, no entanto não contribui para a atividade antibacteriana, sendo que esta ação se deve a presença de outros compostos presentes nos extratos ou então ao sinergismo existente entre os componentes.

A atividade antibacteriana apresentada pela *Cordia verbenacea* pode ser atribuída a presença de compostos aromáticos presentes em seus extratos, como o eugenol. De acordo com Lis-Balchin *et al.* (1998), compostos aromáticos, especialmente o eugenol são reconhecidos pela sua importante atividade antibacteriana. Este composto foi detectado no extrato obtido por ESC com 5% EtOH, como apresentado na Tabela 7.

Segundo Boussaada *et al.* (2008) as propriedades antibacterianas de extratos obtidos a partir de plantas estão relacionadas ao alto conteúdo de sesquiterpenos oxigenados, especialmente bisabolol e farnesil acetato os quais são efetivos contra bactérias Gram-positivas. Ambos compostos foram detectados neste trabalho somente nos extratos obtidos por ESC (Tabela 7).

Na literatura já foi provado que o bisabolol tem efeito sinérgico com o eugenol (PAULI, 2001). Estes resultados demonstram que a atividade antibacteriana dos extratos está relacionada com a configuração química dos componentes, com a proporção em que eles se apresentam nos extratos e com as interações entre eles (LIS-BALCHIN *et al.* 1998, BOUSSAADA *et al.* 2008).

A análise antimicrobiana dos extratos de erva baleeira demonstrou que os extratos supercríticos foram mais eficientes contra o crescimento de bactérias Gram-positivas, se comparados aos extratos obtidos a baixa pressão (soxhlet e maceração). Estes resultados indicam o uso da ESC para obtenção de extratos de erva baleeira com atividade antimicrobiana contra diferentes microorganismos de acordo com as condições de extração empregadas.

5.2.4 Conclusão do Artigo 1

Este estudo mostrou que a *C. verbenacea* apresenta forte atividade antibacteriana validando o emprego de vários extratos desta planta como agentes antimicrobianos.

Os extratos supercríticos foram mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*, com destaque para o extrato obtido com CO₂ puro a 30°C e 300 bar que apresentou concentração mínima inibitória menor que 7,8 µg/ml sendo considerado um extrato com forte potencial inibidor. O uso de co-solvente na ESC (EtOH e EtAc) não somente aumentou o rendimento de processo se comparado com CO₂ puro, mas também produziu extratos com forte inibição antimicrobiana. Além dos aspectos antimicrobianos, os resultados mostram a

importância da ESC na obtenção de importantes compostos funcionais como β -cariofileno, α -humuleno, espatulenol, β -sitosterol e eugenol da erva baleeira, aumentando o valor dos extratos.

Os extratos obtidos por soxhlet apresentaram os maiores rendimentos de extração e foram os únicos a apresentar atividade contra o crescimento de *E. coli*. Os extratos soxhlet e maceração com acetato de etila se mostraram eficientes contra as bactérias Gram-positivas, principalmente *B. Cereus*, com MIC de 46,8 $\mu\text{g/mL}$.

Os extratos de *C. verbenacea* obtidos pelas diferentes técnicas apresentaram grande diversidade de grupos químicos de compostos com atividade biológica como lupeol, bisabolol, farnesil acetato e artemetina. Todos estes aspectos aqui relatados colocam este estudo como um importante ponto inicial para análise deste relevante material vegetal.

5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante e Conteúdo de Fenólicos dos Extratos de Erva baleeira Obtidos com Diferentes Técnicas de Extração ¹

Resumo

A possibilidade de usar as folhas de *Cordia verbenacea* como uma nova fonte de compostos antioxidantes naturais foi investigada. No presente estudo foram utilizadas diferentes técnicas de extração para obtenção de extratos de *Cordia verbenacea* como extração supercrítica, extração soxhlet, extração por maceração seguida de partição líquido-líquido e hidrodestilação. A extração supercrítica foi aplicada para obtenção de extratos usando CO₂ puro e também considerando a adição de co-solventes junto ao CO₂, em temperaturas de 30, 40 e 50 °C e pressões de 100, 200 e 300 bar. Solventes orgânicos com diferentes polaridades como n-hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol, água e misturas aquosas (etanol+água) foram empregados para obtenção de extratos pela técnica soxhlet. O extrato bruto etanólico obtido por maceração foi fracionado com os solventes n-hexano, diclorometano e acetato de etila resultando em diferentes frações. Os diferentes métodos de extração foram avaliados quanto a atividade antioxidante através dos seguintes ensaios: radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), radical ABTS^{•+} [2,2'- azino - bis - (3 - etil - benzotiazolina - 6 - ácido sulfônico)], radical ânion superóxido (O₂^{•-}) e proteção contra a peroxidação lipídica. O teor de compostos fenólicos para os extratos obtidos foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu. Os extratos obtidos com acetato de etila apresentaram forte poder antioxidante tanto pelo método do radical livre DPPH como pelo ensaio de peroxidação lipídica. Os extratos obtidos por soxhlet com água e misturas etanol/água apresentaram importantes atividades antioxidantes indicando que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem afinidade por solventes polares como etanol e água.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea*, extração supercrítica, atividade antioxidante, extração com solventes orgânicos.

¹Artigo em preparação para o periódico Bioresource Technology.

5.3.1 Introdução

O efeito antiinflamatório da erva baleeira já foi investigado e comprovado por Passos *et al.* (2007) e Fernandes *et al.* (2007) e como a literatura mostra que fármacos antiinflamatórios apresentam um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade, esta etapa do trabalho tem o objetivo de investigar se esta planta também possui propriedades antioxidantes.

A complexidade química dos óleos essenciais, uma mistura de dezenas de compostos com grupos funcionais, polaridade e comportamento químico diferentes podem levar a resultados de atividade antioxidante muito diferentes, dependendo do teste empregado e das propriedades físicas do composto (MARCO, 1968).

Numerosas técnicas estão disponíveis para avaliar a atividade antioxidante de compostos e misturas complexas tais como os extratos naturais de plantas. Apesar dos vários métodos de avaliação, o emprego de um único procedimento de análise não pode identificar todos os mecanismos de controle de oxidação possíveis, de forma a caracterizar um produto antioxidante. Assim, a investigação do potencial antioxidante deve ser realizada por métodos que se complementem. A literatura indica que a atividade antioxidante está relacionada entre outras a presença de compostos fenólicos como os flavonóides e ácidos fenólicos que possuem capacidade de seqüestrar os radicais livres. Entretanto, a capacidade de capturar radicais livres é somente um dos vários mecanismos que contribuem para a atividade antioxidante global (SHARIFIFAR *et al.* 2007).

Os compostos antioxidantes podem atuar como sinergistas, desempenhando mais de um papel, como doador de elétrons, quelante de metais e seqüestrador de oxigênio singlete (FENNEMA, 2000).

Sendo assim, a determinação da atividade antioxidante e sua correlação com o conteúdo total de fenólicos presentes nos extratos de erva baleeira obtidos por diferentes técnicas de extração é fundamental para avaliar o potencial de cada técnica na obtenção de extratos com atividade biológica.

5.3.2 Material e Métodos

Os extratos de erva baleeira avaliados quanto a sua atividade antioxidante foram obtidos através da extração supercrítica com CO₂ puro e com co-solvente conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5 e também

através de técnicas convencionais como a extração soxhlet, maceração e hidrodestilação utilizando solventes de diferentes polaridades, conforme descrito no item 4.8.

A determinação da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira foi realizada em triplicata conforme descrito no item 4.9 através dos métodos: radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), radical ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)], radical ânion superóxido (O₂^{•-}) e proteção contra a peroxidação lipídica. O conteúdo de compostos fenólicos para os extratos obtidos foi determinado em triplicata, através do método de Folin-Ciocalteu, conforme apresentado no item 4.9.1.

Os valores de atividade antioxidante são apresentados na forma de CE₅₀ que representa a concentração de extrato capaz de fornecer 50 % de atividade antioxidante. O conteúdo de fenólicos totais é expresso em mg de equivalente em ácido gálico (EAG) por grama de extrato. Os resultados de atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância com o auxílio do software Statistica 6.0.

5.3.3 Resultados

Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de DPPH

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira obtidos por soxhlet e maceração com solventes de diferentes polaridades, por hidrodestilação (HD) e por ESC obtidos em diferentes condições de processo, e dos padrões rutina e quercetina que são flavonóides com reconhecida atividade antioxidante, utilizados como controle positivo do ensaio. A atividade antioxidante apresentada (AA%) é referente a maior concentração de extrato testada que foi de 178,5 (µg/mL).

Tabela 10: Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de erva baleeira através do método DPPH e comparação com os padrões rutina e quercetina.

Soxhlet	AA (%)	CE ₅₀ (µg/mL)	ESC P(bar) / T(°C)	AA (%)	CE ₅₀ (µg/mL)
Hx	23,7±0,8	374±11 ^a	100/30	22,5±0,9	384±34 ^a
DCM	11±1	976±71 ^b	100/40	17,8±0,5	476,7±0,5 ^g
EtAc	54,63±0,06	162,3±0,6 ^c	100/50	8,6±0,4	1052±8 ^h
EtOH	92,7±0,4	82,5±0,5 ^{def}	200/30	29±1	291±10 ^{bef}
Acetona	90,6±0,3	129,7±0,3 ^{ce}	200/40	29±2	309±20 ^b
Água	74±2	38±2 ^{fg}	200/50	22,6±0,4	398±5 ^a
25% EtOH	83,9±0,3	27,4±0,1 ^{fg}	300/30	39±2	228±5 ^{bc}
50% EtOH	85±3	29±2 ^{dg}	300/40	41±2	300±16 ^{bd}
			300/50	29±1	318±10 ^b
HD	6,9±0,2	1984±59	2% EtAc	35,5±0,3	343±2 ^{ab}
			5% EtAc	49,4±0,9	246±4 ^{cde}
Maceração			8% EtAc	48±2	242±10 ^{cdf}
EtAc	95,97±0,06	9,2±0,4 ^a	2% EtOH	58,9±0,7	204±4 ^c
Hx	36,7±0,2	248±2 ^b	5% EtOH	56±1	213±4 ^c
DCM	78±1	107,6±0,8 ^c	8% EtOH	84±2	143±3 ⁱ
Água	87,1±0,1	34,4±0,3 ^d			
Rutina	91,3±0,3	6,2±0,3			
Quercetina	94,5±0,1	2,45±0,0			

Para a mesma técnica, médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

O extrato convencional que apresentou o maior valor de atividade antioxidante foi a fração acetato de etila obtida na extração por maceração apresentando 95,97% de AA, e concentração efetiva de 9,2 µg/mL valor comparável com o controle rutina (6,2 µg/mL). Para inibir em 50% a atividade dos radicais livres, uma quantidade de apenas 9,2 µg/mL de extrato é suficiente.

Na extração soxhlet as misturas aquosas de 50% e 25% de etanol como solventes apresentaram os melhores valores de concentração eficaz com CE₅₀ de 29 µg/mL e 27 µg/mL de extrato, respectivamente, o

que confirma que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem afinidade por solventes polares como etanol e água.

Os extratos n-hexano e diclorometano (soxhlet) apresentaram baixa atividade antioxidante isto pode ser devido a polaridade intermediária destes solventes.

O extrato obtido por hidrodestilação apresentou atividade antioxidante muito baixa de 6,9%. A literatura indica 50 °C como temperatura ótima de extração para compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais (PINELO *et al.* 2006) devido a sua sensibilidade térmica e neste processo a temperatura empregada é a de ebulição do solvente (água) que é muito superior e que pode ter degradado os compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo valor de atividade antioxidante do extrato obtido por hidrodestilação é que os compostos antioxidantes (compostos polifenólicos) possuem alta massa molecular e desta forma, são pouco voláteis e talvez essa técnica não seja a mais adequada para extraí-los.

Os extratos supercríticos apresentaram uma tendência de redução dos valores de atividade antioxidante (AA) e conseqüente aumento dos valores CE₅₀ com o aumento da temperatura de extração de 30 para 50°C, para todas as condições de pressão analisadas. Isto indica que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante podem estar sofrendo degradação térmica com o aumento da temperatura (HU *et al.* 2005).

A pressão também apresentou efeito pronunciado sobre os resultados de AA e CE₅₀. A Tabela 10 mostra que o aumento da pressão à temperatura constante para os três níveis estudados (100, 200 e 300 bar) diminui os valores de CE₅₀. Este resultado indica que o aumento da pressão e conseqüentemente da densidade do fluido supercrítico, aumentou a concentração dos compostos extraídos com atividade antioxidante presentes nos extratos de erva baleeira. O emprego de acetato de etila como co-solvente junto a ESC em diferentes concentrações não resultou em melhora no valor da atividade antioxidante em termos de CE₅₀. No entanto, a utilização de etanol como co-solvente forneceu melhores resultados de concentração eficaz quando comparado ao CO₂ puro na mesma condição. A utilização 8% (m/m) de etanol como co-solvente forneceu o melhor resultado na ESC, com CE₅₀ de 143 µg/mL uma redução considerável quando comparado ao valor obtido na mesma condição de processo (50°C e 300bar) com CO₂ puro (318 µg/mL). O etanol se mostrou o melhor co-solvente para ser usado

junto ao CO₂ na ESC e também um ótimo solvente para obtenção de extratos pelo método soxhlet, principalmente quando adicionado a água.

Silva *et al.* (2007), avaliaram o potencial antioxidante de extratos supercríticos de erva baleeira obtidos nas condições de 40°C e 150bar, 50°C e 250bar e 45°C e 150bar através do método de DPPH e do sistema β-caroteno/ácido linoleico. Os resultados obtidos mostraram reduzida atividade antiradical para os extratos pelo método de DPPH, o autor menciona que os extratos apresentaram atividade 117 vezes menos eficiente que a rutina. Por outro lado, os extratos apresentaram importante atividade antioxidante quando comparados ao β-caroteno, com valor de 69% de AA na primeira hora.

Os resultados de AA obtidos com solvente supercrítico foram menores que aqueles obtidos com o emprego de etanol e água (soxhlet). Este resultado é possivelmente causado pela característica apolar do CO₂, resultando na extração de componentes apolares os quais possuem baixa atividade antioxidante (KITZBERGER *et al.* 2007).

Determinação da Capacidade Atioxidante total pelo método ABTS

O objetivo desta análise foi verificar a capacidade de diferentes extratos de erva baleeira em sequestrar o radical cátion 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), comparado com um padrão antioxidante (Trolox, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) em uma curva dose-resposta. Este método é uma excelente ferramenta para determinar a atividade antioxidante de compostos doadores de hidrogênio e de compostos terminadores de cadeias (RE *et al.* 1999).

A Tabela 11 apresenta a porcentagem de inibição do radical ABTS•+ calculada conforme descrito no item 4.9.3 e os valores da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira avaliados em termos de poder de seqüestro de radicais, de acordo com o método ABTS, expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).

Tabela 11: Atividade antioxidante pelo método ABTS de extratos de erva baleeira.

Soxhlet	% Inibição	TEAC (*)	ESC	% Inibição	TEAC(*)
			P(bar) / T(°C)		
Hx	27,7±0,1	204±2 ^a	100/30	20,4±0,2	193±3 ^a
DCM	32,9±0,3	392,8±0,6 ^b	100/40	19,1±0,2	191±10 ^a
EtAc	39,3±0,1	574±22 ^c	100/50	21±1	195±5 ^a
EtOH	46,7±0,4	585±10 ^c	200/30	24±1	199±2 ^a
Acetona	42,1±0,5	582±2 ^c	200/40	33±3	399,6±0,3 ^b
Água	77±3	1022±4 ^d	200/50	31±1	393±7 ^b
25% EtOH	81±2	1031±3 ^d	300/30	29±1	405±2 ^b
50% EtOH	43,2±0,9	584±3 ^c	300/40	27,5±0,7	398,8±0,7 ^b
Maceração			300/50	29,4±0,3	395±4 ^b
EtAc	81,5±0,6	1048±7 ^a	5% EtAc	43±1	596±4 ^c
Hx	27±0,5	383±7 ^b	8% EtAc	39±1	407±8 ^b
DCM	47,1±0,3	622±2 ^c	5% EtOH	30±2	403±11 ^b
Água	77,1±0,3	999±10 ^d	8% EtOH	46±3	590±15 ^c

(*) Capacidade antioxidante expressa em equivalentes ao Trolox (TEAC) em $\mu\text{M/g}$ de extrato.

Para a mesma técnica, médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os extratos soxhlet obtidos com água e a mistura aquosa com 25% de etanol como solventes se destacaram pela sua alta capacidade antioxidante ($1022 \pm 4 \mu\text{MTEAC/g}_{\text{extrato}}$ e $1031 \pm 3 \mu\text{MTEAC/g}_{\text{extrato}}$) respectivamente, seguidos pelas frações acetato de etila e aquosa da maceração, com valores de capacidade antioxidante de $1048 \pm 7 \mu\text{MTEAC/g}_{\text{extrato}}$ e $999 \pm 10 \mu\text{MTEAC/g}_{\text{extrato}}$, respectivamente.

Ao avaliar as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias da capacidade antioxidante obtidas pelos extratos soxhlet, é possível

observar que os extratos obtidos com acetato de etila, etanol, acetona e 50% de etanol não diferiram estatisticamente entre si, ou seja, todos estes solventes fornecem extratos com mesma capacidade antioxidante, da mesma forma, os extratos obtidos com água e a mistura aquosa de 25% de etanol mostram o mesmo poder antioxidante.

Analisando a Tabela 11 observa-se que para a extração supercrítica usando CO₂ puro como solvente, os valores da capacidade antioxidante variaram entre 191 ± 10 e 405 ± 2 $\mu\text{MTEAC}/g_{\text{extrato}}$ sendo que o aumento da pressão de extração de 100 bar para 200 bar e 300 bar aumentou a capacidade antioxidante dos extratos. Ao se analisar os resultados obtidos pelos extratos supercríticos adicionados dos co-solventes acetato de etila e etanol (5% e 8% [m/m]), podemos observar atividades antioxidantes acentuadas de 596 ± 4 $\mu\text{MTEAC}/g_{\text{extrato}}$ para o extrato obtido com 5% de acetato de etila e 590 ± 15 $\mu\text{MTEAC}/g_{\text{extrato}}$ para o extrato obtido com etanol a 8%. Os extratos obtidos por ESC apresentaram capacidades antioxidantes equivalentes a vários extratos obtidos por soxhlet, como o extrato etanólico, acetona, acetato de etila, diclorometano e hexano, bem como a algumas frações da maceração (Hx e DCM).

Os valores da capacidade antioxidante avaliados pelo método ABTS para os diferentes extratos de erva baleeira variaram de 191 a 1048 $\mu\text{MTEAC}/g_{\text{extrato}}$. Esta pode ser considerada uma importante atividade antioxidante quando comparamos com outros materiais como: vinho tinto envelhecido com capacidade antioxidante de 880 a 1530 μMTEAC (ARNOUS *et al.* 2001), extratos de erva-mate (402 a 1113 μMTEAC - CANTERLE, 2005) e extratos de cascas e pó de café (61,4 a 735,3 $\mu\text{MTEAC}/g$ - BAGGIO, 2006).

Determinação da Atividade Antioxidante pelo método do radical ânion Superóxido

Através do método do radical ânion superóxido (O₂^{•-}) foram avaliados os extratos de erva baleeira que apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante no ensaio DPPH e no método ABTS em cada técnica de extração realizada. Realizou-se esta seleção devido ao grande número de extratos obtidos e visto que como alguns não forneceram bons resultados nos ensaios de DPPH e ABTS não se justificaria a continuação da investigação da atividade antioxidante com os mesmos, devido ao gasto com reagentes e ao tempo despendido com extratos pouco promissores.

Na Tabela 12 estão representados os resultados referentes à avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira selecionados além do padrão rotina, sobre a capacidade “scavenger” do $O_2^{\bullet-}$ determinada através da inibição da redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT). Os resultados são expressos em termos de CE_{50} (média \pm desvio padrão) que representa a concentração de extrato necessária para captar 50% dos radicais $O_2^{\bullet-}$.

Tabela 12: Atividade antioxidante pelo método do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

Soxhlet	CE_{50} (μ g/mL)	ESC	CE_{50} (μ g/mL)
		P(bar)/T($^{\circ}$ C) ou % co-solvente	
EtAc	>1000	300/30	>1000
EtOH	>1000	5% EtAc	>1000
Água	610 \pm 35	8% EtAc	>1000
50% EtOH	373 \pm 18	5% EtOH	>1000
25% EtOH	286 \pm 21	8% EtOH	723 \pm 11
Maceração			
EtAc	878 \pm 13		
Água	576 \pm 6		
Rutina	429 \pm 11		

Carbonari (2005) considera que extratos que apresentam concentração eficaz (CE_{50}) inferior a 1000 μ g/ml determinados pelo método do radical ânion superóxido possuem moderado potencial antioxidante.

Na extração soxhlet as misturas aquosas de 50% e 25% de etanol como solventes apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante com concentração eficaz de 373 μ g/mL e 286 μ g/mL, respectivamente, valores inferiores ao padrão rotina. O extrato obtido com água apresentou moderada atividade antioxidante com concentração eficaz de 610 μ g/mL.

A fração aquosa da maceração apresentou atividade antioxidante próxima ao do padrão rotina com CE_{50} de 576 μ g/mL.

Os resultados da Tabela 12 demonstram também que o extrato supercrítico obtido com 8% de etanol como co-solvente exibiu moderado potencial antioxidante (CE_{50} inferior a 1000 $\mu\text{g/ml}$). Os demais extratos supercríticos analisados neste ensaio revelaram fraca atividade antioxidante (CE_{50} maior que 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro* (TBARS)

A medida da proteção à peroxidação lipídica é uma forma indireta de avaliar o potencial antioxidante de um determinado composto, uma vez que indica o grau de proteção que este pode oferecer ao bloquear o efeito deletério dos radicais livres sobre a membrana plasmática. Avaliou-se neste ensaio, a proteção oferecida pelos extratos de erva baleeira contra a peroxidação lipídica *in vitro*, induzida por peróxido t-butila, em homogenato de fígado de camundongos.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos neste ensaio para os extratos de erva baleeira selecionados conforme explicado no item c. Os resultados são expressos em termos de CE_{50} (média \pm desvio padrão) que representa a concentração de extrato necessária para prevenir em 50% a peroxidação lipídica.

Segundo Rebello (2005), extratos que apresentam concentração eficaz (CE_{50}) inferior a 500 $\mu\text{g/mL}$ determinados pelo método TBARS, possuem importante atividade antioxidante.

A Tabela 13 sumariza o efeito protetor dos extratos de erva baleeira, onde observou-se que o extrato soxhlet obtido com acetato de etila mostrou forte efeito protetor da lipoperoxidação com CE_{50} de 209 ± 3 ($\mu\text{g/mL}$), valor comparável ao flavonóide padrão rutina ($CE_{50} = 203 \pm 2$ $\mu\text{g/mL}$). Dessa forma, pode-se afirmar que *in vitro*, o extrato soxhlet de erva baleeira obtido com acetato de etila mostrou ser efetivo na proteção à lipoperoxidação de membranas plasmáticas, podendo ser considerado antioxidante pelos resultados obtidos neste ensaio.

A fração acetato de etila da maceração e os extratos supercríticos utilizando 5 % e 8% de acetato de etila e 8% de etanol como co-solventes também apresentaram atividade antioxidante importante (CE_{50} inferior a 500 $\mu\text{g/ml}$) com concentração eficaz de 374 $\mu\text{g/mL}$, 395 $\mu\text{g/mL}$ e 463 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 13: Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira através da medida da proteção a lipoperoxidação.

Soxhlet	CE ₅₀ (µg/mL)	ESC	
		P(bar)/T(°C) ou % co-solvente	CE ₅₀ (µg/mL)
EtAc	209±3	300/30	650±14
EtOH	724±18	5% EtAc	444±16
Água	1726±84	8% EtAc	395±9
50% EtOH	575±16	5% EtOH	604±7
25% EtOH	672±4	8% EtOH	463±12
Maceração			
EtAc	374±34		
Água	616±1		
Rutina	203±2		

Para a mesma técnica, médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Nos extratos supercríticos o aumento da concentração de co-solvente (de 5% para 8%) tanto para o etanol como para o acetato de etila, melhorou a extração de compostos com atividade detectáveis pelo método do TBARS.

Determinação do conteúdo de Fenólicos Totais (FT)

A quantidade de fenólicos totais (FT) para os extratos de erva baleeira obtidos por ESC, soxhlet, maceração e hidrodestilação são apresentados na Tabela 14.

A quantidade de compostos fenólicos obtida nos extratos por ESC não apresentou tendência com a temperatura e a pressão. A condição que apresentou maior quantidade de fenólicos foi 200 bar e 40 °C (112 mg/g) a qual se mostrou estatisticamente diferente pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nos extratos supercríticos a quantidade de compostos fenólicos variou de 46 a 112 (mg ácido gálico /g de extrato). Pelo teste de Tukey o emprego de diferentes concentrações de co-solvente não teve influência sobre o conteúdo de compostos fenólicos quando comparados ao CO₂ puro. O teor de fenólicos obtidos na ESC

foi comparável com vários extratos convencionais. Os extratos supercríticos mostraram teores de fenólicos similares aos extratos obtidos por soxhlet e maceração com exceção do extrato aquoso 25% etanol e da fração acetato de etila da maceração.

Tabela 14: Conteúdo de fenólicos totais (FT) expressos em equivalentes a ácido gálico (GAE) para os extratos de erva baleeira.

ESC P(bar)/T(°C)	FT (mgGAE/g)	Soxhlet	FT (mgGAE/g)	Maceração	FT (mgGAE/g)
100 / 30	47±1 ^{ab}	EtAc	72±2 ^a	Hx	63 ± 4 ^a
100 / 40	63±2 ^{ac}	EtOH	97±3 ^b	DCM	114 ± 7 ^b
100 / 50	46±2 ^b	Hx	42±2 ^c	EtAc	358 ± 7 ^c
200 / 30	105±3 ^d	DCM	82±3 ^a	Água	84 ± 2 ^d
200 / 40	112±3 ^e	Água	111±3 ^b		
200 / 50	67±1 ^c	Acetona	82±2 ^a		
300 / 30	61±1 ^{ac}	50% EtOH	102±9 ^b		
300 / 40	63±3 ^{ac}	25% EtOH	187,3±0,9 ^d		
300 / 50	71±1 ^{cf}				
2% EtAc	73±3 ^{cg}				
5% EtAc	76±7 ^{cf}				
8% EtAc	85,7±03 ^{fg}	HD	73 ± 2		
2% EtOH	74±3 ^{cg}				
5% EtOH	64,5±0,3 ^c				
8% EtOH	77,8±08 ^{cg}				

Para a mesma técnica, médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os resultados mostram que a fração acetato de etila (solvente de polaridade intermediária) obtida na extração por maceração apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos (358 mg/g) seguida pela fração diclorometano (114 mg/g). Porém, os rendimentos globais de extração apresentados na Tabela 5, indicam baixos rendimentos para estes solventes (0,26% e 2,69%, respectivamente) o que pode inviabilizar o processo.

Os extratos obtidos por soxhlet forneceram os melhores resultados para os solventes mais polares como etanol e água e para as misturas aquosas de 25% e 50% de etanol. Estes extratos apresentaram alto conteúdo de compostos fenólicos de 97 mg/g, 111 mg/g, 187 mg/g e 102 mg/g, respectivamente. Assim, quando se deseja aliar o teor de fenólicos totais e rendimento dos extratos, pode-se dizer que a melhor opção é a extração soxhlet com água e misturas 50% água:etanol que apresentaram alto rendimento (24% - Tabela 5) e alto conteúdo de fenólicos.

A quantidade de compostos fenólicos detectados nos extratos soxhlet usando etanol e água, sugere que estes são eficientes na solubilização de compostos fenólicos com atividade antioxidante de misturas complexas presentes nas matrizes vegetais, confirmando a sua indicação como co-solventes junto a ESC.

Relação entre atividade antioxidante (DPPH) e conteúdo de fenólicos totais

O coeficiente de correlação (R^2) entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante quantificada pela técnica de DPPH nas diferentes técnicas de extração como ESC, soxhlet e maceração é apresentado nas Figuras 21 a 23.

Observou-se que as diferentes técnicas apresentaram baixo valor de correlação ($R^2=0,05$ na ESC, 0,56 na soxhlet e 0,39 na maceração), o que sugere que existem outras substâncias presentes nos extratos de erva baleeira que contribuem mais efetivamente para a ação seqüestradora de radicais livres do que a fração de compostos fenólicos.

A relação entre atividade antioxidante e fenólicos totais mostra que estes não são os únicos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira. A diversidade e complexidade das misturas nos extratos de plantas dificultam a caracterização dos compostos e a determinação da sua atividade antioxidante. Cada planta contém diferentes compostos como vitaminas, clorofilas e compostos fenólicos com diferentes atividades antioxidantes. O sinergismo entre os compostos antioxidantes numa mistura torna a atividade antioxidante dependente da concentração, bem como da estrutura e interação entre os mesmos (DJERIDANE *et al.* 2006).

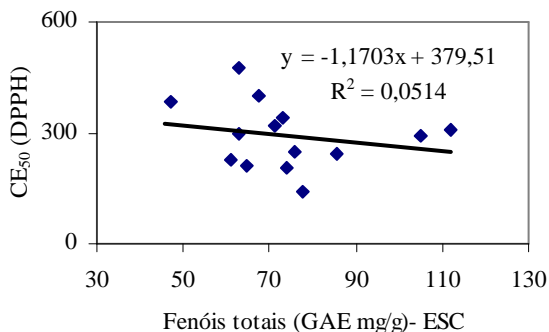


Figura 10: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por ESC.

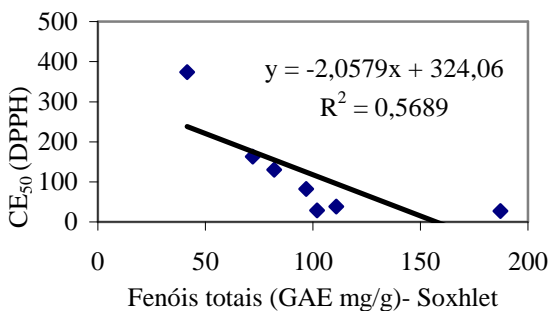


Figura 11: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por soxhlet.

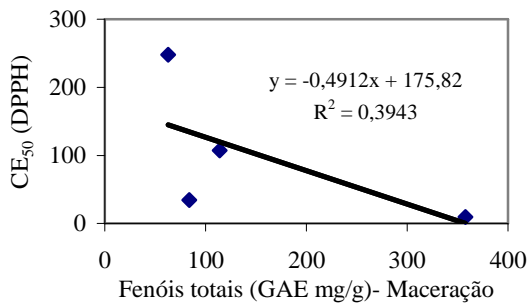


Figura 12: Correlação entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais nos extratos obtidos por maceração.

5.3.4 Conclusão do Artigo 2

Vários tipos de análises que englobam diferentes mecanismos de ação foram realizadas para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de erva baleeira, com o objetivo de avaliar a maior parte de mecanismos que o tecido vegetal da planta possui como defesa antioxidante, como a sua capacidade em participar de reações de óxido-redução, doação de hidrogênio e de anular radicais livres presentes no meio reacional. A erva baleeira se mostrou uma importante fonte de compostos antioxidantes, seja da família de polifenóis, como os antioxidantes, terpenos ou outras.

No ensaio do radical livre DPPH a fração acetato de etila da maceração apresentou forte poder antioxidante com valor comparável ao padrão rotina. Os extratos de erva baleeira obtidos por soxhlet com água e misturas etanol/água apresentaram importantes atividades antioxidantes confirmando que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante possuem afinidade por solventes polares como etanol e água.

As misturas aquosas também mostraram destacada capacidade antioxidante verificada pelo método ABTS e pelo método do radical ânion superóxido onde apresentaram concentração eficaz inferior ao padrão rotina.

Na avaliação da proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro* (TBARS) o solvente acetato de etila se destacou revelando forte efeito protetor, principalmente no extrato obtido por soxhlet e ESC com 8% de co-solvente.

Embora a ESC não tenha apresentado destaque sobre as outras técnicas de extração para efeito de obtenção de compostos antioxidantes é importante salientar que o aumento da concentração de co-solvente para valores superiores aos aqui empregados pode tornar esta técnica comparável com outras para esta atividade biológica. Apesar disso, deve-se levar em consideração que cada método de extração tem uma especificidade e, como comprovado no item 5.2 (Artigo 1), a ESC é uma técnica de destaque para obtenção de compostos com atividade antimicrobiana presentes na erva baleeira.

Os métodos para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* representam indicadores das potenciais atividades biológicas, refletindo apenas uma biodisponibilidade teórica. Maiores avaliações são necessárias para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos, para testar suas atividades antioxidantes em

sistemas biológicos, e para verificar a contribuição de cada composto individual na atividade antioxidante total.

5.4 Modelagem Matemática da Cinética de Extração de Erva Baleeira

Resumo

Neste estudo o emprego da extração supercrítica com CO₂ para obtenção de extratos de *Cordia verbenacea* foi avaliado. *Cordia verbenacea* conhecida popularmente por erva baleeira, é um arbusto da família Boraginaceae, que possui como principal propriedade medicinal a atividade antiinflamatória. Esta atividade dá-se pela ação de sesquiterpenos como α -humuleno e trans-cariofileno compostos presentes nos extratos desta planta. O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de extração supercrítica da erva baleeira, avaliando a cinética de extração, os mecanismos de transferência de massa envolvidos e a modelagem matemática das curvas de extração. As curvas foram obtidas a 30, 40 e 50 °C e pressões de 100, 150, 200 e 300 bar, e vazões variando de 3,0 a 8,3 g/min. Diferentes modelos de transferência de massa apresentados na literatura foram empregados para descrever os dados experimentais: modelo de Sovová (1994), modelo de Martínez *et al.* (2003), modelo de Crank (1975), modelo de Tan e Liou (1989), modelo de Goto *et al.* (2006), modelo de Esquível *et al.* (1999) e modelo VTII de Brunner (1994). Os modelos representaram bem as curvas experimentais de extração e os menores desvios entre dados experimentais e modelados foram obtidos com os modelos de Sovová, de Crank e de Goto.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea*, cinética de extração, modelagem matemática, transferência de massa.

5.4.1 Introdução

O conhecimento dos efeitos causados pelas variáveis operacionais como pressão, temperatura e vazão de solvente em determinada extração supercrítica é necessário para o projeto e otimização do processo. A modelagem matemática das curvas de extração permite generalizar os resultados experimentais, que posteriormente poderão ser aplicados para a predição do processo de extração em novas condições de trabalho e/ou a outros materiais diferentes daqueles inicialmente pesquisados. Além disso, a modelagem tem como principal objetivo determinar os

parâmetros ajustáveis dos modelos a partir de dados experimentais, a fim de que estes sejam mantidos constantes na transposição de escala para, então, se obter o design do processo em maior escala, como dimensão de equipamento, vazão de solvente, tamanho de partícula (MARTÍNEZ *et al.* 2003).

O objetivo deste artigo foi estudar o processo de extração supercrítica do extrato de erva baleeira, avaliando a cinética e a modelagem das curvas de extração, verificando qual fenômeno de transferência de massa é predominante no processo de ESC.

A descrição das curvas de extração de erva baleeira foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), modelo Logístico de Martínez *et al.* (2003), modelo de difusão de Crank (1975) apud Reverchon (1997), e modelos de Tan & Liou (1989), de Goto *et al.* (1993) e de Esquivel *et al.* (1999), através do programa Mass Transfer desenvolvido por Correia *et al.* (2006) e Kitzberger *et al.* (2009) disponível no LATESC. Também foi ajustado o modelo de transferência de massa VT-II desenvolvido por Brunner (1994), disponível no programa “Thermische Verfahrenstechnik VTII” desenvolvido pela Universidade Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH) da Alemanha (ZETZL *et al.* 2007). O detalhamento dos modelos matemáticos e suas equações estão apresentados no Apêndice I- Modelos Matemáticos.

5.4.2 Material e Métodos

A erva baleeira foi coletada na Praia da Barra da Ibiraguera-Imbituba- SC. As folhas foram moídas em moinho de facas, secas em estufa (item 4.1) e caracterizadas quanto ao tamanho através de análise granulométrica, conforme explicado na seção 4.2.2.

A determinação do diâmetro das partículas de erva baleeira utilizadas na formação do leito de extração foi realizada conforme o item 4.2.3 e calculada segundo Gomide (1980). A densidade aparente (d_a) foi determinada através da massa de erva baleeira utilizada para a formação do leito e o volume ocupado por esta no extrator (g/cm^3), além da densidade real do sólido, obtida através do método de picnometria em gás hélio, conforme descrito no item 4.2.4. A porosidade do leito foi determinada a partir dos valores da densidade real e aparente de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.5 e a porosidade das folhas foi considerada igual a 0,54 como apresentado por Goto *et al.* (1993).

Para o estudo da cinética da ESC, foram obtidas curvas de extração nas temperaturas de 30, 40 e 50°C e pressões de 100, 150, 200 e 300 bar, onde a vazão de solvente variou de 3,0g/min a 8,3g/min. As curvas experimentais de extração foram construídas com o rendimento de extração versus a massa de solvente por massa de sólido, seguindo o procedimento descrito no item 4.4.1.

Para o cálculo do conteúdo de óleo extraível (X_0) considerou-se que os valores de rendimento global de extração (X_0) apresentados na Tabela 3 correspondem a 90% do total de soluto presente na matriz sólida no início do processo (Michielin *et al.* 2005; Ferreira, 1996). Esta consideração é baseada na observação das curvas de extração, que indicam que a etapa de taxa de extração nula foi praticamente alcançada (ver item 5.1). Assim, a partir dos valores da Tabela 3 encontrou-se o equivalente a 100% que corresponde ao teor inicial de soluto no sólido (O), e o valor de X_0 foi obtido a partir da equação 9.3.

Os parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER), M_{CER} (taxa de extração da etapa CER) e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER) foram determinados utilizando o pacote estatístico SAS for Windows - versão 8.5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) conforme o item 4.13.

A modelagem matemática foi realizada seguindo o procedimento descrito no item 4.14 com o emprego do programa Mass Transfer disponível no LATESC, e o programa “Thermische Verfahrenstechnik VTII”, as equações dos modelos são apresentadas no Apêndice I.

5.4.3 Resultados

Avaliação de parâmetros na cinética da ESC

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos na caracterização do leito de partículas os quais foram utilizados para a modelagem dos dados experimentais.

Tabela 15: Caracterização do leito de partículas de erva baleeira.

Massa sólido formar leito (g)	Diâmetro médio (mm)	Densidade real (g/cm ³)	Densidade aparente (g/cm ³)	Porosidade do leito (ε)
20,0	0,58	1,42	0,389	0,726

As Figuras 24 e 25 mostram as curvas de ESC de erva baleeira para diferentes condições de pressão, temperatura e vazão de solvente. Estas curvas apresentam uma etapa de taxa constante de extração (CER), uma etapa de taxa decrescente (FER) e, finalmente tendem a apresentar uma etapa de taxa nula de extração, quando o mecanismo de difusão é predominante.

O efeito da pressão de operação nas curvas de extração pode ser observado na Figura 24, que mostra o rendimento de extração pela razão massa de solvente por massa de amostra para a condição de 50°C e pressões de 100, 150, 200 e 300 bar, na vazão de solvente de 3,33g/min.

O aumento da pressão à temperatura constante de 50°C resultou no aumento do rendimento especialmente para pressões maiores que 100bar. Este comportamento é devido ao aumento da densidade (ρ_{CO_2} = 385,4 e 871,0 kg/m³ a 100bar e 300 bar, respectivamente) e conseqüente aumento do poder de solvatação do solvente supercrítico. Este comportamento da curva de extração está de acordo com os dados apresentados no item b, do Artigo 1 que apresenta as isotermas de rendimento.

Este resultado também foi verificado em outros estudos apresentados na literatura como na extração de calêndula por Campos *et al.* (2005), na extração de antocianinas por Mantell *et al.* (2002), na extração de óleo de shiitake por Kitzberger *et al.* (2009), na extração de bagaço de maçã por Ribeiro *et al.* (2007), dentre outros.

Na Figura 25 é apresentado o efeito da temperatura nas curvas de extração para a pressão de 200 bar e temperaturas de 30, 40 e 50 °C e vazão de 5 g/min e o efeito da vazão de solvente (CO₂) no rendimento de extração de erva baleeira na condição de 150 bar e 40°C e vazões de 3,0 g/min e 8,3 g/min.

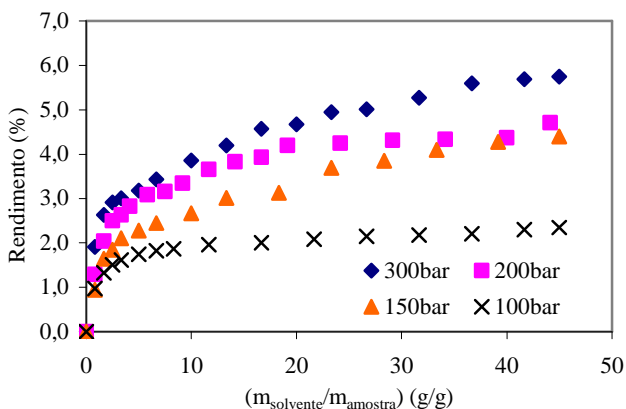


Figura 13: Influência da pressão no rendimento para ESC de erva baleeira à 50°C.

A Figura 25 mostra o aumento do rendimento com a temperatura, indicando que o efeito da pressão de vapor do soluto é dominante e compensa a redução da densidade do solvente, para esta pressão. O aumento do rendimento com a temperatura também pode ser explicado pela redução da viscosidade e conseqüente aumento da difusividade do solvente na matriz sólida. Estas variações conferem melhores características ao solvente facilitando a transferência de massa no interior da matriz vegetal (MANTELL *et al.* 2002). O comportamento do rendimento da ESC de erva baleeira com a temperatura é influenciado pela pressão de vapor do soluto e pela densidade do solvente, o mecanismo predominante no processo de extração depende da pressão de operação, como já verificado no estudo das isotermas de rendimento (Artigo 1, item b).

O aumento na taxa de extração com o aumento da temperatura também foi verificado para a extração de amarantho na pressão de 200 bar (WESTERMAN *et al.* 2006), na extração de óleo de sementes de jojoba nas pressões de 250 e 350 bar (SALGIN *et al.* 2007) e na extração de óleo de hortelã nas pressões de 200 e 300 bar por Almeida *et al.* (2007).

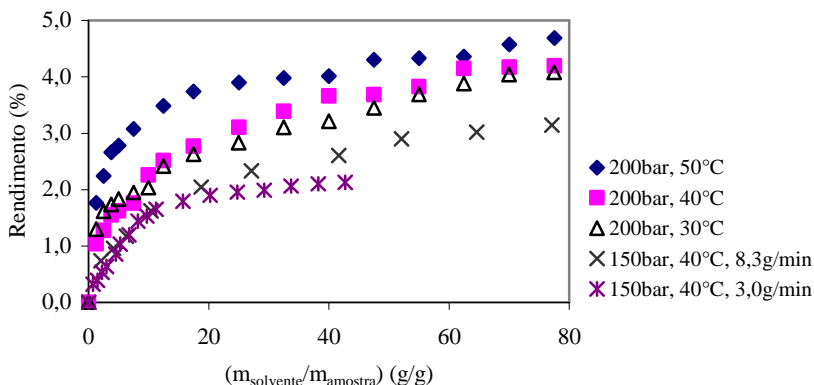


Figura 14: Influência da temperatura e da vazão de CO₂ no rendimento de erva baleeira.

De acordo com a Figura 25 o aumento na vazão do solvente acarreta um aumento no rendimento da extração, devido à maior diferença no gradiente de concentração entre as fases soluto e solvente. O aumento do rendimento na condição de maior vazão pode ter ocorrido em função da diminuição da espessura do filme externo em torno das partículas, que é uma resistência à transferência de massa, e pelo aumento do gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, já que há uma maior quantidade de solvente percorrendo o extrator por unidade de tempo, o que aumenta a quantidade de extrato na saída do extrator. Machmudah *et al.* (2006) avaliaram o efeito da vazão de CO₂ na extração de óleo de noz-moscada e observaram que o rendimento aumentou com a elevação da vazão de solvente. Os autores explicam que o aumento na vazão de solvente geralmente causa um aumento no número de moléculas de CO₂ por unidade de volume na entrada do extrator aumentando as interações intermoleculares entre o solvente e o soluto, aumentando assim a dissolução do soluto.

A Tabela 16 apresenta os valores de solubilidade obtidos em diferentes condições de operação a partir das curvas de extração de erva baleeira. A solubilidade do soluto na fase solvente é um parâmetro importante, necessário para a aplicação do modelo de transferência de massa de Sovová (1994). Os valores prévios de solubilidade do extrato

de erva baleeira em dióxido de carbono a alta pressão foram obtidos através da etapa de taxa constante de extração para ensaios realizados a baixa vazão de solvente, conforme descrito no item 4.6. A faixa de vazão de solvente empregada na determinação de solubilidade foi baseada no estudo desenvolvido por Danielski (2002).

Tabela 16: Solubilidades para erva baleeira.

T (°C)	P (bar)	ρ CO ₂ (g/cm ³)	Vazão (g/min)	Y*(g _{extrato} /g _{solvente}) x 10 ³
40	150	0,781	0,9	7,35
50	200	0,785	1,1	11,5
50	300	0,871	1,3	17,2

O maior valor de solubilidade, obtido na condição de 50°C e 300 bar (17,2 x 10⁻³ g/g), foi empregado no modelo de transferência de massa descrito por Sovová (1994) para a descrição das curvas de extração.

A Tabela 17 apresenta os parâmetros cinéticos t_{CER} , M_{CER} , Y_{CER} , X_0 e X_k em função das condições de operação: pressão (P), temperatura (T) e vazão de CO₂ (Q_{CO_2}) empregadas para a obtenção das curvas de ESC de erva baleeira. A Tabela 17 também apresenta os valores da viscosidade dinâmica do CO₂ (ν) calculados a partir da equação empírica de Altunin and Sakhabetdinov (1972) (apresentada por Sovová & Procháska (1993) necessária para o modelo de transferência de massa VTII.

A concentração de soluto na fase solvente Y_{CER} é determinada através da inclinação da etapa CER (M_{CER}). A taxa de extração na etapa CER (M_{CER}) aumentou com o aumento da vazão de 3,0 para 8,3 g/min no experimento a 40 °C e 150 bar. O experimento de maior vazão promove maior disponibilidade de solvente no extrator por unidade de tempo, o que proporciona um maior gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, ocasionando uma maior taxa de transferência de massa. Isto acontece pela diminuição da resistência à transferência de massa como resultado do aumento da convecção, causado pela não saturação do CO₂ pelo soluto.

O parâmetro Y_{CER} não apresentou uma tendência de comportamento com a variação da densidade do CO₂. O aumento da pressão resultou em menores tempos da etapa de taxa constante de extração (t_{CER}) o que se deve ao aumento do poder de solvatação do

solvente. O aumento da pressão resultou em maiores valores de X_0 pelo aumento da concentração de compostos solúveis, o efeito desta variável (P) sobre o valor de X_0 já é conhecido, conforme a seção 5.2.3. O aumento da pressão e da vazão de solvente também aumentou o teor de óleo de difícil acesso (X_k), que está contido no interior das partículas interligado à matriz sólida e extraído na etapa difusional de extração.

Os valores de X_p mostram o efeito da pressão na concentração de soluto de fácil acesso, isto é, com o aumento da pressão há uma tendência de aumento nos valores de X_p , devido a elevação da densidade do CO_2 .

Tabela 17: Parâmetros cinéticos do processo de ESC de erva baleeira e viscosidade dinâmica do CO_2 .

P/T/ Q_{CO_2} (bar/ $^{\circ}C$ /g/min)	ρ_{CO_2} (g/cm ³)	t_{CER} (min)	$M_{CER} \times 10^2$ (g/min)	$Y_{CER} \times 10^3$ (g/g)	$X_0 \times 10^2$ (g/g)	$X_k \times 10^2$ (g/g)	$X_p \times 10^2$ (g/g)	ν ($\mu Pa.s$)
100/50/3,3	0,385	8,10	1,95	0,58	2,67	0,93	1,74	28,54
150/40/3,0	0,781	49,96	0,53	1,76	2,42	0,88	1,54	68,84
150/40/8,3	0,781	29,24	1,11	0,13	4,56	2,29	2,27	68,84
200/30/5,0	0,890	4,02	3,84	0,76	4,75	3,05	1,70	90,42
200/40/5,0	0,840	4,25	0,90	1,80	4,88	3,41	1,47	79,58
200/50/5,0	0,785	8,1	2,60	0,52	5,49	2,24	3,25	69,66
300/50/3,3	0,871	2,11	0,74	0,22	6,82	3,85	2,97	86,03

Modelagem das Curvas de extração

As Figuras 26 a 29 mostram a comparação entre as curvas experimentais e ajustadas pelos modelos de Crank, Martinez, Tan e Liou, Goto, Esquível, Sovová e VTII. Nas curvas está representado o rendimento de extração em função do tempo de extração.

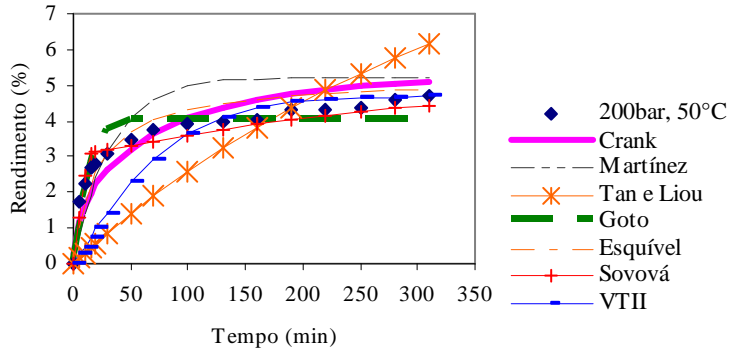


Figura 15: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos para a condição de 200bar e 50°C.

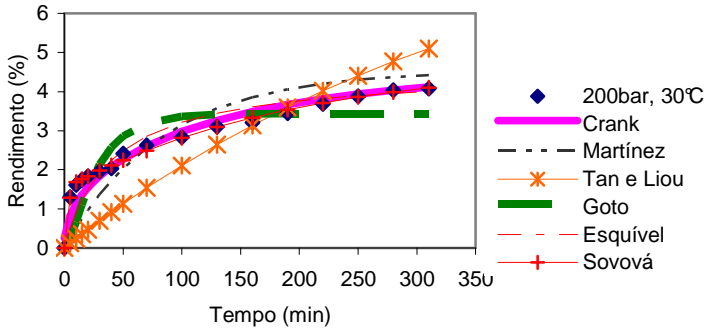


Figura 16: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos para a condição de 200bar e 30°C.

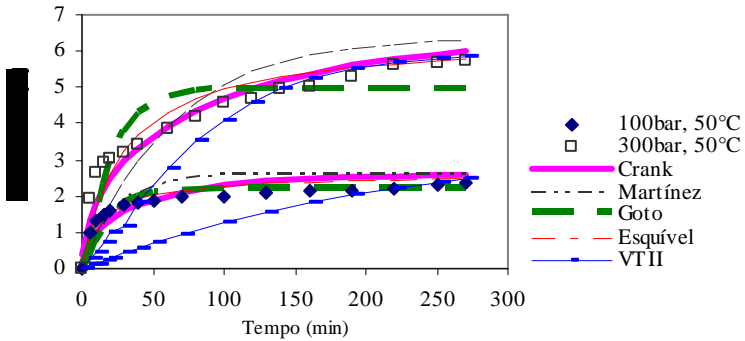


Figura 17: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos: influência da pressão no rendimento para ESC à 50°C.

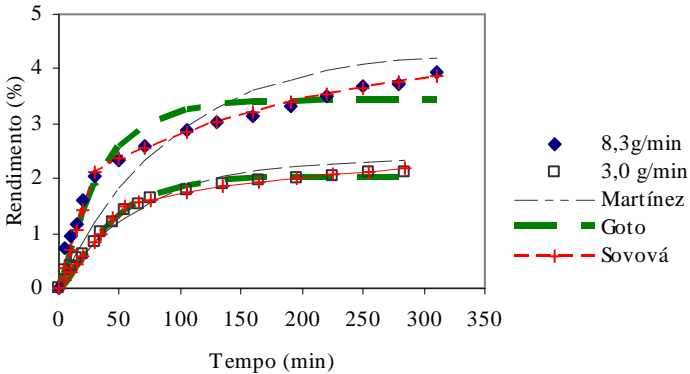


Figura 18: Comparação entre dados experimentais e ajustados pelos modelos: influência da vazão no rendimento para ESC à 150 bar e 40°C.

Os parâmetros ajustáveis para o modelo de Crank (D), Martínez (b e t_m), Tan e Liou (K_d), Goto (K e ϕ), Esquível (b_e), Sovová (coeficientes de transferência de massa para a fase sólida (k_{xa}) e fluida (k_{ya}), razão mássica de soluto de difícil acesso (X_k)), modelo VTII (k_1 e k_2 -coeficientes da isoterma de sorção, D_{ax} -coeficiente de dispersão axial e β_F - coeficiente de transferência de massa na fase fluida) e os erros médios quadráticos (EMQ) entre dados experimentais e modelados, nas diferentes condições estudadas são apresentados na Tabela 18.

De acordo com a Tabela 18 o modelo matemático que se ajustou melhor aos dados experimentais apresentando menor erro médio quadrático foi o modelo de Sovová (1994) seguido pelos modelos de Crank, Goto e Esquivel.

Para a modelagem do processo de extração, em especial na aplicação do modelo de Sovová é necessário o conhecimento de variáveis de processo, tais como a solubilidade e densidade do solvente (Tabela 16), dados específicos da matéria-prima e do leito de partículas (Tabela 15) e ainda dados específicos da curva de extração a ser modelada, como X_0 , t_{CER} , M_{CER} , Y_{CER} (Tabela 17).

O modelo de Sovová (1994) apresenta bons resultados quando as curvas experimentais têm um período de taxa constante de extração bem definido e sua principal vantagem é a descrição do fenômeno que ocorre no processo de ESC que dá um claro significado físico aos parâmetros ajustáveis. Por outro lado, o uso deste modelo é limitado aos sistemas onde a solubilidade é conhecida à temperatura e pressão do processo (SOUSA *et al.* 2004).

Os parâmetros ajustados pelo modelo de Sovová podem ser analisados, observando a Tabela 18. Nota-se que o valor de k_{Y_a} aumenta com o aumento da vazão de solvente (ensaio a 150 bar e 40°C), o que era de se esperar pois k_{Y_a} é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, o qual é diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido, que por sua vez aumenta com o aumento da vazão de solvente. Já o valor de k_{X_a} manteve-se praticamente constante, já que o coeficiente de transferência de massa na fase sólida não sofre a influência da vazão do solvente. Para todos os ensaios realizados os valores do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{X_a}) foram inferiores aos valores do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Y_a}). O soluto localizado internamente nas partículas tem mais dificuldade de ser dissolvido e, assim leva mais tempo para vencer a interface sólido-fluido que o soluto localizado na superfície das partículas. Desta forma, os menores valores de k_{X_a} obtidos indicam que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção na ESC de erva baleeira. Estes efeitos foram observados também por Campos *et al.* (2005) na ESC de calêndula e por Kitzberger (2005) na ESC de shiitake.

Tabela 18: Parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) dos modelos para a ESC de erva baleeira.

Parâmetros dos Modelos	Condições avaliadas: P(bar)/T(°C)/ Q _{CO₂} (g/min)						
	100/50 /3,3	150/4 /3,0	150/4 /8,3	200/3 /5,0	200/40 /5,0	200/50 /5,0	300/50 /3,3
Crank							
D (x10 ¹¹)	13,80	6,0	4,91	5,23	5,48	8,82	7,14
EMQ	0,07	0,02	0,02	0,06	0,01	0,22	0,14
Martínez							
b (x10 ²)	4,11	1,44	10,83	1,19	1,31	3,10	1,58
t _m	-1025,9	-	-	-	-3363,8	-1384,5	-
EMQ	0,14	0,02	0,22	0,37	0,21	0,68	0,80
Esquível							
b _e	14,49	40,41	44,21	40,81	40,90	20,54	28,79
EMQ	0,04	0,007	0,03	0,13	0,04	0,18	0,23
Tan e Liou							
K _d (x10 ³)	3,51	3,25	2,55	2,60	2,70	2,78	3,04
EMQ	0,71	0,21	0,67	0,91	0,82	2,41	2,24
Goto							
k	1,75	1,44	1,87	2,04	1,68	1,94	2,00
φ	3,00	0,52	0,218	0,687	0,355	3,00	3,00
EMQ	0,067	0,009	0,08	0,28	0,16	0,17	0,45
Sovová							
k _{Xa} (x10 ³)	0,92	1,56	1,21	1,43	1,79	0,76	1,56
k _{Ya} (x10 ²)	0,127	0,008	0,023	0,107	0,093	0,116	0,367
EMQ (x10 ⁴)	3,90	1,93	7,94	2,02	8,33	24,80	8,09
VIII							
k ₁ (x10 ²)	3,0	4,0			4,92	4,50	5,35
k ₂	0	0			0	0	0
D _{ax} (m ² /s) (x10 ⁹)	1574,96	738,00			1123,49	1194,39	738,02
β _F (m ² /s) (x10 ⁶)	1,45	0,96			1,17	1,22	9,40
D _{es} (m ² /s) (x10 ⁸)	0,1	0,1			0,1	0,1	0,1
EMQ	0,83	0,037			0,22	1,18	1,58

Os valores de X_k apresentados na Tabela 17 mostram o efeito da densidade do solvente na concentração de soluto de difícil acesso, isto é, nas condições de maior densidade do CO₂ ocorre um aumento nos valores de X_k (200 bar a 30 e 40°C e 300 bar a 50°C) e, conseqüente, do valor de X₀ da ESC, pois ocorre o aumento do teor de óleo extraível pelo solvente.

O modelo de Crank que considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor apresentou bons ajustes aos dados experimentais. Este modelo considera os diferentes mecanismos de transferência de massa através de somente um parâmetro ajustável (D), com o processo de extração controlado unicamente pela difusão, o que impede a avaliação de outros mecanismos de transferência de massa na extração de erva baleeira.

O modelo de Tan e Liou superestimou os dados experimentais de extração. A massa de soluto extraída vai aumentando com o tempo e em certo momento atinge valores muito superiores aos valores da massa de extrato total existente na matriz sólida, o que indica uma deficiência deste modelo. Esta deficiência pode estar ligada ao fato de que Tan e Liou (1989) tratam a constante de dessorção (k_d) como um parâmetro dependente apenas da temperatura do processo. A constante de dessorção representa a transferência de massa interfacial onde a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida e das características do solvente. Uma interpretação válida para esta constante seria atribuir a ela uma relação com alguns parâmetros de processo como a solubilidade, densidade do solvente e as restrições à transferência de massa (k_{Ya} e k_{Xa}).

O modelo de Goto considera que a transferência de massa é controlada pelo mecanismo de dessorção da partícula para os poros seguido de difusão do soluto nos poros da partícula através do ajuste de dois parâmetros, um relativo ao coeficiente global de transferência de massa (ϕ) e k a constante de dessorção. Este modelo apresentou bom ajuste aos dados experimentais. O parâmetro k (de 1,44 até 2,04) apresentou valor similar para todas as condições analisadas, demonstrando que a dessorção do soluto não foi influenciada pelas condições operacionais. Peker *et al.* (1992), mostraram que quando $k \ll 1$ o extrato é totalmente desorvido do interior dos poros das partículas, e conseqüentemente, ele pode ser facilmente absorvido pelo solvente. No entanto todas as curvas modeladas mostraram k maior que 1, indicando dificuldade na recuperação do extrato de erva baleeira contido no interior dos poros. O parâmetro ϕ apresentou maiores valores nas condições de maior pressão e temperatura de processo.

Quispe-Condori *et al.* (2008) ajustou duas curvas de extração de erva baleeira com os modelos de Crank (1975), Tan e Liou (1989), Goto (1993) e Sovová (1994). Para isso foram selecionadas as condições que promoveram o maior rendimento global (300 bar e 50 °C) e a maior atividade anticâncer (200bar e 40 °C). O modelo empírico de Naik e o

modelo de Goto apresentaram os menores erros médios quadráticos. Em outra etapa de experimentos os autores avaliaram a influência da altura do leito de extração nos parâmetros cinéticos e verificaram que a taxa de transferência de massa (M_{CER}) e a duração do período CER aumentaram com a altura do leito de extração. Nestes experimentos os melhores ajustes foram obtidos pelos modelos de Crank, Goto e Sovová. Os parâmetros de processo obtidos com os modelos não seguiram um comportamento bem definido com as alterações no comprimento do leito, e conseqüentemente, a seleção do modelo matemático para o scale-up do processo de extração supercrítica se torna uma tarefa difícil.

Para o ajuste do modelo de Esquível é necessário conhecer apenas o valor de X_0 e da massa inerte de material sendo, portanto um modelo de fácil aplicação. Este modelo representou bem os dados experimentais de erva baleeira, o que pode ser devido a forma hiperbólica de sua equação. Os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa são representados por um único parâmetro ajustável (b_e), desta forma, não é possível verificar a influência dos diferentes mecanismos na descrição da curva de extração. Como este modelo é empírico, ele só pode ser usado para ajustar curvas cinéticas de extração para a faixa experimental na qual o parâmetro b_e foi estimado (QUISPE-CONDORI *et al.* 2005).

O modelo de Martínez ajustou bem os dados experimentais, provavelmente devido a presença de dois parâmetros ajustáveis, b e t_m . No entanto, os parâmetros deste modelo não possuem uma descrição física adequada, e a sua aplicabilidade para outras condições experimentais fica inviável. Neste modelo o parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração é máxima, porém este parâmetro apresentou valor negativo para todas as condições estudadas, perdendo o seu significado físico. Neste caso, a taxa de extração é decrescente e, portanto o seu valor máximo é atingido no instante inicial, ou seja, no tempo igual a zero (MARTÍNEZ, 2002).

O modelo VTII é baseado em diferentes mecanismos de transferência de massa como a relação de equilíbrio entre sólido e solvente (isoterma de sorção), difusão no sólido, transferência de massa da superfície do sólido para a fase fluida e dispersão axial. O coeficiente de transferência de massa na fase fluida (β_F) foi maior na maior pressão empregada (300 bar) e o coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) não mostrou uma tendência clara de comportamento. O coeficiente da isoterma de sorção (k_1) aumentou com o aumento da pressão de operação. Apesar deste modelo ter sido formulado a partir de importantes considerações a respeito do processo de extração o seu

ajuste aos dados experimentais não foi muito adequado, pois apresentou erro médio quadrático maior que outros modelos como de Crank, de Goto, de Esquivel, de Martinez e de Sovová para a maior parte das condições avaliadas. Este comportamento pode ser devido ao programa computacional desenvolvido para solucionar do VTII, que não possui uma rotina automática para ajuste dos parâmetros k_1 , k_2 e D_{es} (coeficiente de difusão efetivo na fase sólida), gerando um trabalho manual de tentativa e erro para encontrar o melhor ajuste entre modelo e dados experimentais. Para o parâmetro D_{es} foi considerado o valor de $0,1 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$ para todas as condições, pois este é considerado como uma boa aproximação geral para extração de óleos Catchpole & King (1994).

Danielski, (2007) empregou o modelo VTII para o ajuste de dados experimentais de extração de óleo de farelo de arroz e Hense, (1997) utilizou o mesmo modelo no ajuste de curvas experimentais de óleo de casca de laranja e grãos de café ambos com bom ajuste aos dados experimentais.

Ampliação de Escala

A partir dos resultados obtidos na modelagem da ESC de erva baleeira é possível sugerir a realização da ampliação de escala. A partir de dados obtidos em laboratório ou planta-piloto, é possível prever o desempenho de processos em escala industrial, para então avaliar a viabilidade técnica e econômica do processo. A maior dificuldade para a ampliação de escala é a escolha dos critérios, isto é, definir os parâmetros e as condições que devem ser mantidos constantes, e os que devem variar, e como devem variar, para reproduzir em grande escala curvas de rendimento em função do tempo de um processo de ESC realizado em laboratório (MARTÍNEZ *et al.* 2007).

O ajuste do modelo de Sovová às curvas de extração de erva baleeira mostrou através dos coeficientes de transferência de massa na fase fluida e na fase sólida (k_{Ya} e k_{Xa} , respectivamente) que o mecanismo de maior influência na extração é a convecção e desta forma, o fator limitante na ESC é a difusão.

Diferentes métodos de ampliação de escala estão disponíveis para projetar uma unidade de extração. Uma forma simples para ampliação de escala a partir de dados experimentais é manter a relação Q_{CO_2}/M (vazão de solvente/massa de alimentação) constante, como apresentado por Mezzomo (2008).

A relação Q_{CO_2}/M deverá ser conservada para ampliação de escala em processos onde a extração é limitada pela difusão, onde o tempo de contato da matriz com o solvente é o fator determinante, devendo ser longo o suficiente para que a difusão do soluto do interior para a superfície da partícula aconteça. Assim, será necessário usar extratores muito grandes ou usar vários extratores em série para maximizar o tempo de contato, tornando possível a minimização da vazão de solvente e do consumo de energia da planta.

Outra forma de ampliação de escala é mantendo a relação m_{sol}/M (massa de solvente/massa de alimentação) constante, no caso de extração limitada pela solubilidade do extrato e quando tanto a difusão como a solubilidade controlam a extração, ambas as relações Q_{CO_2}/M e m_{sol}/M deverão ser mantidas constantes, (CLAVIER & PERRUT, 2004).

Para a realização da ampliação de escala deve-se escolher a melhor condição de pressão e temperatura em termos de rendimento global ou atividade biológica e realizar extrações variando a vazão de solvente e os tempos de ESC de forma a manter constante os critérios de ampliação de escala. A partir da aplicação de um modelo matemático de transferência de massa como por exemplo o modelo de Sovová (1994), faz-se a comparação dos parâmetros cinéticos de extração como t_{CER} , M_{CER} , K_{Ya} , K_{Xa} entre a escala pequena e a escala maior de modo a verificar se a proposta de ampliação reproduziu adequadamente os testes realizados em escala menor. No entanto, como não se realizou experimentos de aumento de escala com a erva baleeira, esta avaliação não será possível no presente trabalho.

5.4.4 Conclusão do Artigo 3

O objetivo da modelagem de um processo é obter uma representação quantitativa, ou pelo menos qualitativa do processo, utilizando um sistema de equações simples que envolve poucos parâmetros com significado físico. A modelagem das curvas de extração dos dados experimentais é importante para a predição do comportamento da cinética ao longo do processo como o tempo total da extração para uma condição de operação específica (T , P e Q_{CO_2}).

A avaliação dos mecanismos de transferência massa e o estudo da cinética da ESC de erva baleeira em função da P , T e Q_{CO_2} , indicaram que estes parâmetros influem na taxa de transferência de massa, no rendimento da ESC e na facilidade de extrair o soluto da matriz sólida.

O efeito da pressão de vapor do soluto se mostrou dominante no processo compensando a redução da densidade do solvente.

A avaliação da modelagem da ESC mostrou que o modelo matemático de transferência de massa que melhor se ajustou aos dados experimentais apresentando menor erro médio quadrático foi o modelo de Sovová (1994) o qual possui a vantagem de fornecer informações sobre os diferentes mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo. Segundo resultados do modelo de Sovová (1994), a ESC de erva baleeira apresenta maior influência da convecção em relação ao processo difusivo (valores de k_{Y_a} maiores que k_{X_a}) e esta informação é importante para um futuro estudo de ampliação de escala.

5.5 Avaliação do Equilíbrio de Fases a Alta Pressão para os Sistemas formados por dióxido de carbono, α -humuleno e trans-cariofileno¹

Resumo

O objetivo principal deste artigo é reportar os dados de equilíbrio de fases dos sistemas binários formados por CO_2 + α -humuleno e CO_2 + trans-cariofileno, e do sistema ternário CO_2 + α -humuleno + trans-cariofileno. Resultados da literatura mostram que os compostos α -humuleno e trans-cariofileno são os principais responsáveis pelas características antiinflamatória e antialérgica, atribuídas à planta medicinal *Cordia verbenacea* D.C. tornando importante a investigação do equilíbrio de fases realizado neste trabalho. Os experimentos de equilíbrio de fases foram realizados a alta pressão em uma célula de volume variável, na faixa de temperatura de 303 a 343K e pressões de até 200 bar. Foram verificados equilíbrio líquido-líquido e equilíbrio líquido-líquido-vapor a 303 K, enquanto que transições de fases do tipo líquido-vapor foram verificadas de 313 a 343 K, para todos os sistemas estudados. A modelagem termodinâmica foi realizada empregando a equação de estado de Peng-Robinson e a regra de mistura quadrática clássica, com um ajuste satisfatório entre valores experimentais e calculados.

Palavras-chave: Equilíbrio de fases, CO_2 , α -humuleno, *trans*-cariofileno.

¹Este Capítulo foi publicado no artigo “High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humuleno, *trans*-cariofileno” no periódico The Journal of Chemical Thermodynamics.

5.5.1 Introdução

A erva baleeira é muito utilizada na medicina popular devido as suas propriedades antiinflamatórias, antireumática, analgésica e cicatrizante. Passos *et al.* (2007) e Fernandes *et al.* (2007) estudaram a atividade antinflamatória do extrato de erva baleeira obtido através de hidrodestilação e demonstraram que esta atividade está relacionada com a presença de α -humuleno e trans-cariofileno. Esta investigação também sugere que estes compostos constituem uma importante alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias.

Como os extratos de erva baleeira obtidos por técnicas de extração a baixa pressão apresentam uma grande variedade de constiuintes como taninos, flavonóides, mucilagens entre outros, um passo adicional para a concentração destes extratos ou isolamento de compostos de interesse como α -humuleno e *trans*-cariofileno se faz necessário.

Uma interessante possibilidade para obtenção de extratos mais concentrados em certos compostos de interesse é o uso da tecnologia supercrítica com o dióxido de carbono como solvente de extração. A extração supercrítica é uma técnica seletiva que permite em um único passo obter extratos naturais sem uma etapa adicional de separação. A seletividade por certas classes de compostos é determinada pela densidade do solvente supercrítico.

Neste sentido, o projeto de um processo de extração supercrítica viável com uma possível aplicação industrial requer o conhecimento do comportamento de fases do sistema e da solubilidade dos principais compostos no solvente supercrítico (CARVALHO Jr *et al.* 2006, FRANCESCHI *et al.* 2004).

Devido ao interesse que as indústrias farmacêuticas têm em compostos ou frações com atividade biológica, geralmente presente em misturas complexas, a otimização do processo de separação é um campo importante de estudo. Além do mais, dados de equilíbrio de fases servem de base para muitos processos químicos e operações de separação que são conduzidos em altas pressões.

Os modelos termodinâmicos podem ajudar a reduzir o número de dados experimentais necessários para a resolução do problema de um projeto em especial, mas no entanto, ao menos alguns pontos experimentais são necessários para o ajuste de parâmetros de interação destes modelos, como por exemplo a equação de Peng-Robinson.

Assim, o objetivo desta etapa é reportar os dados de equilíbrio de fases dos sistemas binários formados por CO₂ + α -humuleno, CO₂ + *trans*-cariofileno e do sistema ternário formado por CO₂ + α -humuleno + *trans*-cariofileno. Estes sistemas foram selecionados para estudo devido a destacada atividade biológica apresentada pelos compostos α -humuleno, *trans*-cariofileno presentes no extrato de erva baleeira como mostra a literatura. Os dados experimentais dos sistemas investigados foram ajustados usando a equação de estado de Peng-Robinson (EDE de P-R).

5.5.2 Material e Métodos

Os componentes α -humuleno e *trans*-cariofileno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA), *n*-pentano (Carlo Herba, Milan, Italy, pureza $\geq 99\%$) e éter etílico (pureza $\geq 99\%$) foram comprados da Merck, Darmstadt, Germany.

A obtenção do extrato de erva baleeira foi realizada na Unidade de ESC descrita no item 4.3.2 com CO₂ supercrítico a 300 bar e 50°C durante 4 h resultando num rendimento de processo de 5% (extrato/massa material). Os principais componentes presentes no extrato de erva baleeira foram identificados e quantificados por análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau (FURB), conforme descrito no item 4.11.

As medidas de equilíbrio de fases foram realizadas através do método estático sintético no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai). O aparato experimental e o procedimento realizado para as medidas de equilíbrio de fases dos sistemas investigados estão descritos no item 4.7 de Material e Métodos.

Os dados experimentais dos sistemas binários foram correlacionados empregando a equação de estado de Peng e Robinson (EDE de P-R) com regra de mistura quadrática de van der Waals. A estimação dos parâmetros de interação binária, k_{ij} e l_{ij} foi realizada minimizando uma função objetivo através dos mínimos quadrados das pressões experimentais e calculadas usando o método "Simulated Annealing" (PRESS, 1992) e a rotina para cálculo de equilíbrio de fases de Bender (2008).

As constantes críticas e o fator acêntrico (ω) para o CO₂ foram obtidos da literatura (REID *et al.* 1987), enquanto que para o α -humuleno e *trans*-cariofileno foram estimados de acordo com o procedimento descrito por Dohrn (1992), estes parâmetros são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Constantes críticas e fator acêntrico para os compostos estudados.

Composto	T _c /K [†]	p _c /MPa [†]	ω [†]
CO ₂ ^a	304,21	7,38	0,2236
α -humuleno ^b	776,29	1,77	0,7042
<i>trans</i> -cariofileno ^b	760,95	1,81	0,6760

^aReid *et al.* 1987; ^bDohrn, 1992.

[†] T_c: temperatura crítica; p_c: pressão crítica; ω : fator acêntrico.

5.5.3 Resultados

A Tabela 20 apresenta o resultado da análise cromatográfica do extrato supercrítico de erva baleeira obtido a 300 bar e 50 °C, relacionando os componentes identificados com seus respectivos tempos de retenção e composição normalizada (% área). O extrato apresentou principalmente sesquiterpenos como *trans*-cariofileno, α -humuleno, alloaromadendreno e α -cubebeno.

Tabela 20: Composição normalizada (porcentagem de área) para o extrato supercrítico obtido a 300 bar e 50°C.

Componentes	TR (min)	Concentração (%)
<i>trans</i> -Cariofileno	27,564	10,62
(+)-Epi-biciclosesquifelandreno	28,796	5,98
α -Humuleno	29,051	4,51
Alloaromadendreno	29,257	22,43
τ -Muuroloeno	30,114	4,93
Di-epi- α -cedreno	30,716	10,74
Selina-6-em-4-ol	31,491	6,44
Calameneno	31,778	9,65
α -Cubebeno	32,192	11,45
β -Guaieno	34,374	8,19
2-Naftalenol-1,2,3,4-tetrahidro-3-(1-hidroxi-1-methylethil)-5-metoxi	41,214	5,06

TR -Tempo de retenção.

Além da avaliação da composição (CG-EM) do extrato de erva baleeira, a escolha dos compostos selecionados para investigação do equilíbrio de fases foi baseada nos seguintes aspectos: atividade biológica (antiinflamatória) destes compostos relatada na literatura (PASSOS *et al.* 2007), e falta de dados de equilíbrio de fases destes compostos na literatura.

Durante as medidas de equilíbrio de fases foi verificado que o extrato de erva baleeira obtido por CO₂ supercrítico (300 bar e 50°C) não solubilizou em CO₂ puro e nem na mistura de CO₂ + etanol (95:5 wt/wt). Desta forma, não foi possível obter os dados de equilíbrio de fases para o sistema composto por CO₂ + extrato de erva baleeira. Uma possível explicação para este fato é a alteração de alguns compostos do sistema entre o momento da extração e o de determinação dos dados de equilíbrio de fases, com possível redução da solubilidade do extrato no solvente utilizado.

As Tabelas 21 e 22 apresentam os dados experimentais obtidos para os sistemas binários formados por CO₂ + α -humuleno e CO₂ + *trans*-cariofileno respectivamente, para a faixa de temperatura de 303 a 343 K, enquanto que a Tabela 23 mostra os dados experimentais para o sistema ternário composto por CO₂ + α -humuleno + *trans*-cariofileno, na mesma faixa de temperatura. No sistema ternário a relação α -humuleno/ *trans*-cariofileno foi baseada na composição da Tabela 20, ou seja 10,62%/4,51%, que corresponde a 2,4 partes de *trans*-cariofileno para 1 parte de α -humuleno. As Tabelas 21 a 23 mostram os resultados de equilíbrio em termos de pressão de transição, erro experimental para cada condição representado pelo desvio padrão das réplicas (σ) e o tipo de transição de equilíbrio de fases (ELV, ELL, ELLV), como explicado no item 4.7.2. de Material e Métodos.

Tabela 21: Dados de equilíbrio de fases para o sistema binário formado por CO₂ + α -humuleno.

T/K	p/MPa	σ /MPa [†]	Tipo de transição ^{††}	T/K	p/MPa	σ /MPa [†]	Tipo de transição ^{††}
$x_1 = 0,341$				$x_1 = 0,933$			
303	4,7	0,02	ELV	303	9,5	0,20	ELL
313	5,4	0,01	ELV	303	7,0	0,01	ELLV
323	6,1	0,08	ELV	313	11,9	0,02	ELV

333	6,5	0,02	ELV	323	14,4	0,05	ELV
343	7,2	0,07	ELV	333	16,6	0,06	ELV
$x_1 = 0,537$				343	18,9	0,02	ELV
303	6,0	0,02	ELV	$x_1 = 0,952$			
313	6,6	0,01	ELV	303	9,0	0,04	ELL
323	7,7	0,01	ELV	303	7,1	0,03	ELLV
333	8,7	0,04	ELV	313	11,2	0,01	ELV
343	9,6	0,02	ELV	323	14,0	0,05	ELV
$x_1 = 0,665$				333	16,5	0,03	ELV
303	6,4	0,10	ELV	343	18,6	0,03	ELV
313	7,9	0,02	ELV	$x_1 = 0,963$			
323	9,4	0,05	ELV	303	8,6	0,05	ELL
333	11,2	0,09	ELV	303	7,1	0,02	ELLV
343	12,6	0,07	ELV	313	10,5	0,02	ELV
$x_1 = 0,756$				323	13,5	0,01	ELV
303	6,9	0,02	ELV	333	16,1	0,07	ELV
313	8,8	0,08	ELV	343	17,9	0,04	ELV
323	10,8	0,01	ELV	$x_1 = 0,976$			
333	12,9	0,05	ELV	303	7,1	0,04	ELL
343	15,0	0,07	ELV	303	7,1	0,01	ELLV
$x_1 = 0,791$				313	9,8	0,06	ELV
303	7,0	0,06	ELV	323	12,5	0,11	ELV
313	9,3	0,03	ELV	333	14,7	0,01	ELV
323	11,9	0,12	ELV	343	16,9	0,13	ELV
333	14,0	0,08	ELV	$x_1 = 0,989$			
343	16,2	0,18	ELV	303	7,1	0,02	ELV
$x_1 = 0,834$				313	8,5	0,01	ELV
303	8,2	0,09	ELL	323	10,9	0,10	ELV
303	7,1	0,10	ELLV	333	13,0	0,02	ELV
313	10,8	0,12	ELV	343	15,0	0,06	ELV
323	13,3	0,03	ELV	$x_1 = 0,995$			
333	15,5	0,09	ELV	303	7,2	0,07	ELV
343	18,1	0,11	ELV	$x_1 = 0,874$			
$x_1 = 0,874$							

303	9,5	0,03	ELL	313	8,6	0,04	ELV
303	7,1	0,01	ELLV	323	10,3	0,03	ELV
313	12,3	0,05	ELV	333	11,8	0,01	ELV
323	14,6	0,09	ELV	343	13,2	0,01	ELV
333	16,5	0,13	ELV				
343	18,9	0,08	ELV				
$x_1 = 0,915$							
303	9,8	0,07	ELL				
303	7,0	0,08	ELLV				
313	12,4	0,06	ELV				
323	15,0	0,06	ELV				
333	16,9	0,21	ELV				
343	19,2	0,08	ELV				

[†] σ - desvio padrão

^{††} E: equilíbrio, L: fase líquida, V: fase vapor.

Tabela 22: Dados de equilíbrio de fases para o sistema binário formado por $\text{CO}_2 + \text{trans-cariofileno}$.

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$x_1 = 0,340$				$x_1 = 0,874$			
303	4,5	0,01	ELV	303	10,8	0,04	ELL
313	5,1	0,01	ELV	303	6,8	0,07	ELLV
323	5,9	0,01	ELV	313	12,7	0,01	ELV
333	6,4	0,02	ELV	323	14,7	0,03	ELV
343	6,8	0,03	ELV	333	16,8	0,08	ELV
$x_1 = 0,537$				343	18,9	0,03	ELV
$x_1 = 0,665$				$x_1 = 0,899$			
303	6,1	0,05	ELV	303	10,8	0,10	ELL
313	7,0	0,01	ELV	303	6,8	0,10	ELLV
323	7,9	0,02	ELV	313	12,8	0,08	ELV
333	9,1	0,02	ELV	323	15,1	0,02	ELV
343	10,0	0,03	ELV	333	17,1	0,02	ELV
$x_1 = 0,665$				343	19,2	0,10	ELV
$x_1 = 0,731$				$x_1 = 0,915$			
303	6,7	0,06	ELV	303	10,7	0,12	ELL
313	8,3	0,02	ELV	303	6,9	0,14	ELLV
323	9,7	0,01	ELV	313	12,7	0,05	ELV
333	11,3	0,02	ELV	323	15,1	0,12	ELV
343	12,8	0,02	ELV	333	17,0	0,07	ELV

313	8,8	0,13	ELV	343	19,2	0,03	ELV
323	10,7	0,07	ELV	$x_1 = 0,933$			
333	12,7	0,06	ELV	303	10,2	0,05	ELL
343	14,5	0,01	ELV	303	6,8	0,01	ELLV
$x_1 = 0,755$				313	12,7	0,10	ELV
303	7,0	0,05	ELL	323	15,2	0,02	ELV
303	6,8	0,03	ELLV	333	17,1	0,02	ELV
313	9,3	0,03	ELV	343	19,1	0,05	ELV
323	11,4	0,06	ELV	$x_1 = 0,949$			
333	13,5	0,06	ELV	303	9,7	0,01	ELL
343	15,4	0,04	ELV	303	6,9	0,01	ELLV
$x_1 = 0,802$				313	11,7	0,04	ELV
303	8,8	0,04	ELL	323	14,3	0,11	ELV
303	7,0	0,01	ELLV	333	16,5	0,01	ELV
313	10,6	0,06	ELV	343	18,5	0,17	ELV
323	12,7	0,05	ELV	$x_1 = 0,976$			
333	15,1	0,07	ELV	303	6,9	0,04	ELL
343	17,0	0,04	ELV	303	6,8	0,01	ELLV
$x_1 = 0,822$				313	9,5	0,05	ELV
303	9,7	0,15	ELL	323	12,4	0,02	ELV
303	7,0	0,08	ELLV	333	14,7	0,02	ELV
313	11,2	0,07	ELV	343	16,8	0,01	ELV
323	13,4	0,02	ELV	$x_1 = 0,996$			
333	15,7	0,01	ELV	303	7,0	0,03	ELV
343	18,0	0,03	ELV	313	8,6	0,09	ELV
$x_1 = 0,845$				323	10,7	0,05	ELV
303	10,3	0,01	ELL	333	11,9	0,06	ELV
303	6,9	0,01	ELLV	343	13,2	0,14	ELV
313	12,1	0,02	ELV				
323	14,1	0,05	ELV				
333	16,3	0,03	ELV				
343	18,4	0,01	ELV				

Como pode ser observado nas Tabelas 21, 22 e 23, as medidas experimentais mostram que o comportamento do equilíbrio de fases dos três sistemas avaliados se apresenta muito similar. Para os três sistemas foi verificada a ocorrência de dois tipos de equilíbrio bifásico: líquido-vapor (ELV), líquido-líquido (ELL) e também do equilíbrio trifásico líquido-líquido-vapor (ELLV) para a menor temperatura de 303 K. De outra forma, para as maiores temperaturas de 313 a 343 K foi observada somente a transição do tipo líquido-vapor para todas as composições globais de CO_2 .

Tabela 23: Dados de equilíbrio de fases para o sistema ternário formado por CO₂ + α -humuleno + *trans*-cariofileno (cariofileno:humuleno = 2,4:1,0 wt/wt composição).

T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição	T/K	p/MPa	σ /MPa	Tipo de transição
$x_1 = 0,874$				$x_1 = 0,949$			
303	10,0	0,01	ELL	303	9,9	0,01	ELL
303	6,6	0,02	ELLV	303	6,7	0,02	ELLV
313	12,1	0,06	ELV	313	11,5	0,03	ELV
323	14,2	0,12	ELV	323	13,6	0,05	ELV
333	16,4	0,05	ELV	333	16,0	0,07	ELV
343	18,5	0,08	ELV	343	18,4	0,09	ELV
$x_1 = 0,912$				$x_1 = 0,976$			
303	10,1	0,03	ELL	303	7,0	0,03	ELL
303	6,6	0,04	ELLV	303	6,9	0,06	ELLV
313	12,2	0,05	ELV	313	9,6	0,01	ELV
323	14,3	0,01	ELV	323	12,5	0,02	ELV
333	16,6	0,04	ELV	333	14,7	0,05	ELV
343	19,0	0,01	ELV	343	16,6	0,08	ELV

As Figuras 30 e 31 apresentam os diagramas pressão-composição para os sistemas binários estudados: CO₂ + α -humuleno e CO₂ + *trans*-cariofileno, respectivamente e as linhas representam os resultados do emprego da equação de estado de P-R apresentada no item 3.12.3 da Revisão Bibliográfica.

Como pode ser visto nestas figuras, à temperaturas abaixo da temperatura crítica do componente mais leve (CO₂, T_c=304,2K), os sistemas mostram regiões de imiscibilidade líquido-líquido (ELL e ELLV). O comportamento de ELL é caracterizado pelo aparecimento de duas fases líquidas no sistema. Na temperatura de 303 K onde ocorreram transições ELL, também foram observadas transições do tipo ELLV. Isto é, após ter ocorrido a transição ELL, provoca-se mais um decréscimo na pressão do sistema, acarretando o surgimento de uma terceira fase (vapor), passando assim o sistema a ter três fases, uma fase vapor e duas fases líquidas.

Quando a temperatura é elevada acima da temperatura crítica do solvente, dióxido de carbono (313 a 343K), somente transições do tipo líquido-vapor foram observadas. O comportamento de ELV é descrito com sendo o surgimento de uma fase vapor no sistema (devido a redução da pressão), antes totalmente líquido. Tais curvas de transição comumente são observadas em sistemas contendo CO₂ com alta

assimetria molecular entre os compostos (CHAROENSEMBUT-AMON *et al.* 1986; VAN KONYNENBURG & SCOTT, 1980) o que parece ser o caso dos sistemas estudados, pois o CO₂ apresenta massa molecular de 44,01 g/mol enquanto os demais compostos α -humuleno e *trans*-cariofileno apresentam massa molecular de 204 g/mol. A grande diferença entre a natureza química dos constituintes nestes fluidos pode ser a razão para o comportamento complexo de fases (ELL e ELLV).

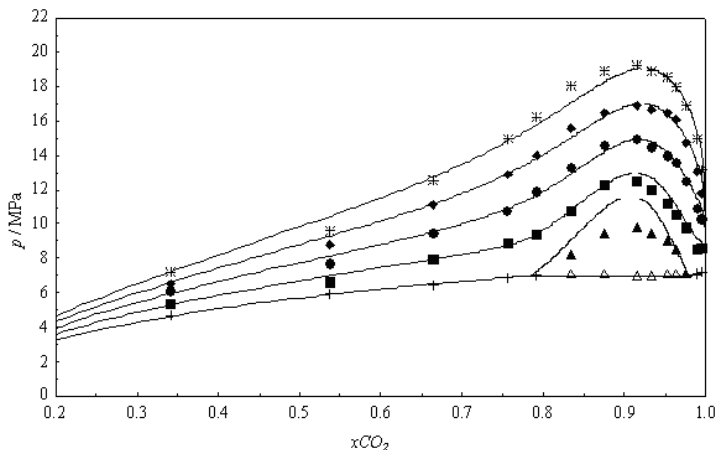


Figura 19: Pressão versus fração molar do CO₂ para demonstrar o diagrama (P-x-y) do sistema binário CO₂ + α -humuleno a 303 K (+ EVL, \blacktriangle ELL, \triangle EVLL); 313 K (\blacksquare EVL); 323 K (\bullet EVL); 333 K (\blacklozenge EVL) e 343 K ($*$ EVL). Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.

Souza *et al.* (2004), reportaram dados de equilíbrio para os sistemas formados por CO₂ + óleo de cravo nas temperaturas de 303,2, 308,2, 313,2, 318,2 e 328,2 K. Os sistemas apresentaram equilíbrio ELL e ELLV nas temperaturas de 303,2 e 308,2 K. A 313,2, 318,2 e 328,2 K, o sistema exibiu transições líquido-vapor. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho. Possivelmente, este comportamento possa ser consequência do fato da composição do óleo de cravo (eugenol, *trans*-cariofileno, eugenol acetato e α -humuleno) ser similar à composição do óleo de erva baleeira.

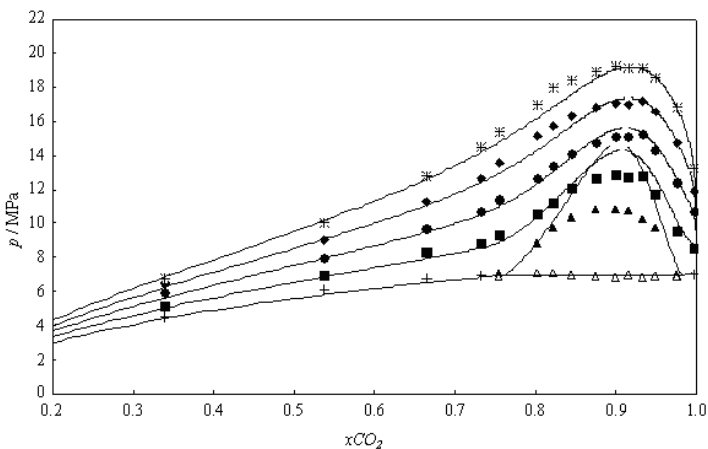


Figura 20: Pressão versus fração molar do CO_2 para demonstrar o diagrama (P-x-y) do sistema binário $\text{CO}_2 + \text{trans-cariofileno}$ a 303 K (+ EVL, \blacktriangle ELL, \triangle EVLL); 313 K (\blacksquare EVL); 323 K (\bullet EVL); 333 K (\blacklozenge EVL) e 343 K ($*$ EVL). Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.

Para a modelagem termodinâmica, os parâmetros de interação binária para a equação de Peng-Robinson (k_{ij} e l_{ij}) foram estimados usando os dados experimentais obtidos nas temperaturas de 303 a 343 K para cada sistema binário e os resultados são apresentados na Tabela 24. A comparação entre os dados de equilíbrio de fases experimentais e calculados pela EDE de P-R também é apresentada nas Figuras 30 e 31, onde pode-se ver que o modelo representou bem os dados na faixa de temperatura de de 313 a 343 K para ambos os sistemas. Para a temperatura de 303 K, o modelo superestimou os dados experimentais, principalmente para a transição líquido-líquido.

A Figura 33 apresenta o diagrama de pressão-composição experimental e compara dados experimentais e calculados (EDE de P-R) para o sistema ternário ($\text{CO}_2 + \alpha\text{-humuleno} + \text{trans-cariofileno}$) a 343 K. Nesta Figura também são apresentados os dados experimentais para os sistemas binários ($\text{CO}_2 + \alpha\text{-humuleno}$ e $\text{CO}_2 + \text{trans-cariofileno}$). Os três sistemas estudados apresentaram comportamento similar, com

curvas sobrepostas; este resultado é uma evidência de interações fracas entre os hidrocarbonetos estudados, um comportamento esperado devido à ausência de grupos polares tal como as hidroxilas.

Tabela 24: Parâmetros de interação binária para a EDE de P-R para os sistemas estudados.

Sistema	$k_{ij} \pm \sigma$	$l_{ij} \pm \sigma$	N	R
CO ₂ + α -humuleno	0,053910 \pm 0,01	-0,058300 \pm 0,01	59	0,995
CO ₂ + <i>trans</i> -cariofileno	0,060972 \pm 0,01	-0,054425 \pm 0,01	63	0,993

σ -desvio padrão; N - número de pontos experimentais; R - coeficiente de correlação.

k_{ij} e l_{ij} : parâmetros de interação binária.

As Figuras 34 e 35 apresentam o diagrama de comportamento de fases simulado a elevadas pressões com a EDE de P-R para os sistemas CO₂ + *trans*-cariofileno e CO₂ + α -humuleno. Nestas Figuras observam-se duas regiões de miscibilidade parcial. Um comportamento similar foi encontrado por Kassim *et al.* (2008) para o sistema binário formado por CO₂ + n-hexadecano. De acordo com estes autores a primeira região termina numa pressão chamada de “upper critical solution pressure” e a segunda numa pressão de solução crítica mais baixa ou “lower critical solution pressure” e persiste em pressões maiores. A Figura 34 mostra que as duas regiões de miscibilidade parcial se fundem numa única região para as temperaturas entre 298 e 299 K e na Figura 35 isto ocorre para temperaturas abaixo de 293 K.

De acordo com a classificação de Van Konynenburg *et al.* (1980), o comportamento de fases para os sistemas binários estudados neste trabalho pode ser classificado como do tipo IV, o qual representa a transição entre diferentes tipos, como tipo II e tipo III (SCHNEIDER *et al.* 2000).

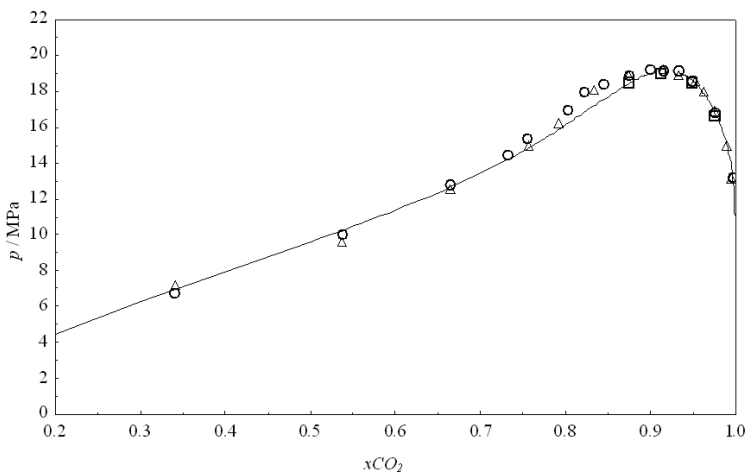


Figura 21: Pressão versus fração molar de CO_2 para comparar o diagrama P-x-y a 343 K dos sistemas binários $\text{CO}_2 + \textit{trans}$ -cariofileno (\circ) e $\text{CO}_2 + \alpha$ -humuleno (\triangle) e sistema ternário $\text{CO}_2 + \alpha$ -humuleno + \textit{trans} -cariofileno (\square) (cariofileno/humuleno razão = 2,4 : 1,0 wt/wt), Linhas contínuas: valores calculados pela EDE de P-R.

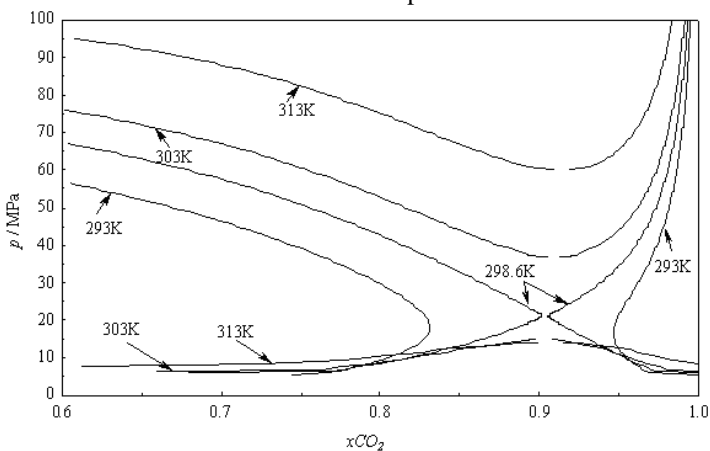


Figura 22: Diagrama de equilíbrio de fases: simulação a elevadas pressões com a EDE de P-R para o sistema $\text{CO}_2 + \textit{trans}$ -cariofileno.

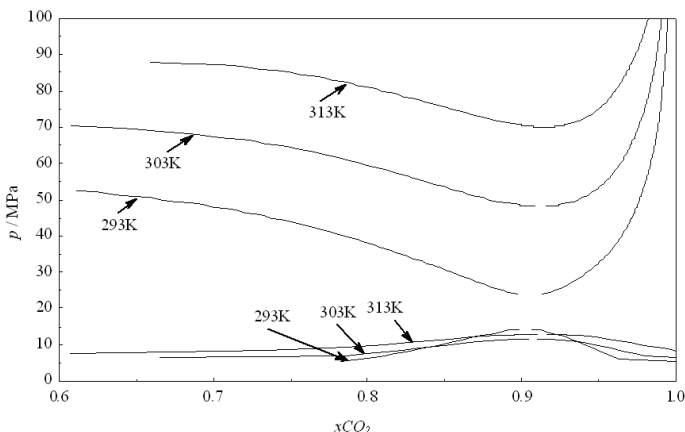


Figura 23: Diagrama de equilíbrio de fases: simulação a elevadas pressões com a EDE de P-R para o sistema $\text{CO}_2 + \alpha$ -humuleno.

Os dados experimentais de equilíbrio de fases apresentados neste trabalho são importantes para a separação de compostos biologicamente ativos como α -humuleno e *trans*-cariofileno presentes nos extratos de erva baleeira e obtidos usando dióxido de carbono supercrítico como solvente. O presente trabalho representa o primeiro estudo a reportar dados de equilíbrio de fases destes compostos em dióxido de carbono supercrítico. No entanto, o extrato natural de erva baleeira apresenta uma grande variedade de constituintes como, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, flavonóides dentre outros. Por esta razão, mais estudos de equilíbrio de fases de outros compostos são necessários para a obtenção de parâmetros visando o fracionamento do extrato.

5.5.5 Conclusão do Artigo 4

O equilíbrio de fases do α -humuleno e *trans*-cariofileno em CO_2 foi investigado na faixa de temperatura de 303 a 343 K resultando em pressões de transição de fases de até 192 bar.

O comportamento do sistema ternário foi similar aos sistemas binários relacionados, mostrando que não há sinergismo entre os compostos (terpenos) mais pesados, dessa forma, não é necessário avaliar o comportamento do sistema ternário em todas as temperaturas. Além do equilíbrio líquido-vapor, os sistemas apresentaram

imiscibilidade líquido-líquido e transição trifásica líquido-líquido-vapor. A EDE de P-R forneceu uma representação satisfatória dos dados experimentais de equilíbrio de fases obtidos, detectando inclusive a região de imiscibilidade apresentada pelos sistemas binários.

6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a *C. verbenacea* apresenta forte atividade antibacteriana validando o emprego de vários extratos desta planta como agentes antimicrobianos.

Os extratos supercríticos foram mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*, com destaque para o extrato obtido com CO₂ puro a 30°C e 300 bar. O uso de co-solvente na ESC (EtOH e EtAc) não somente aumentou o rendimento de processo se comparado com CO₂ puro, mas também produziu extratos com forte inibição antimicrobiana. Além dos aspectos antimicrobianos, os resultados mostram a importância da ESC na obtenção de importantes compostos funcionais como β-cariofileno, α-humuleno, espatulenol, β-sitosterol e eugenol da erva baleeira, aumentando o valor dos extratos.

Os extratos obtidos por soxhlet apresentaram os maiores rendimentos de extração e foram os únicos a apresentar atividade contra o crescimento de *E. coli*.

Os extratos de *C. verbenacea* obtidos pelas diferentes técnicas apresentaram grande diversidade de grupos químicos de compostos com atividade biológica como lupeol, bisabolol, farnesil acetato e artemetina.

Nos ensaios realizados para avaliação da atividade antioxidante os extratos de erva baleeira apresentaram forte poder antioxidante, com destaque para os extratos soxhlet (acetato de etila), maceração (fração acetato de etila) e extratos soxhlet usando misturas água/etanol.

O estudo da cinética da ESC de erva baleeira em função da P, T e Q_{CO2}, indicou que estes parâmetros influem na taxa de transferência de massa, no rendimento da ESC e na facilidade de extrair o soluto da matriz sólida.

A avaliação da modelagem da ESC mostrou que o modelo matemático de transferência de massa que melhor se ajustou aos dados experimentais apresentando menor erro médio quadrático foi o modelo de Sovová (1994) o qual possui a vantagem de fornecer informações sobre os diferentes mecanismos de transferência de massa envolvidos no processo. Segundo resultados do modelo de Sovová (1994), o mecanismo de maior influência na extração é a convecção e desta forma, o fator limitante na ESC é a difusão. Esta informação é de utilidade na escolha do critério a ser avaliado num futuro estudo de ampliação de escala.

A avaliação do equilíbrio de fases dos sistemas investigados formados por CO₂, α -humuleno e trans-cariofileno apresentou transições do tipo líquido-vapor, além de imiscibilidade líquido-líquido e transição trifásica líquido-líquido-vapor. A EDE de P-R apresentou bom ajuste aos dados experimentais de equilíbrio de fases.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da avaliação dos resultados apresentados neste trabalho podem ser sugeridos alguns pontos para serem desenvolvidos em trabalhos futuros:

- Avaliação da atividade antioxidante utilizando metodologias *in vivo* (avaliação da peroxidação lipídica endógena, medida da lipoperoxidação pelo FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja), avaliação do dano ao DNA, avaliação do dano oxidativo às proteínas).
- Purificação dos extratos (coluna de sílica Flash) para isolamento das substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana.
- Obtenção de dados de equilíbrio de fases do extrato de erva baleeira visando o estudo do fracionamento.
- Estudar a ampliação de escala, para predizer o comportamento do processo de ESC em maior escala.
- Estudo de correlação entre atividade antioxidante, teor de α -humuleno e β -cariofileno em diferentes condições de ESC.
- Estudo da atividade antiinflamatória em diferentes condições de ESC.
- Avaliar atividade antioxidante em modelos que avaliem compostos lipossolúveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKISUE, M. K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M. S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* A. DC.- BORAGINACEAE. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.5, p.69-82, 1983.
- ALMEIDA, P. P. DE; FERREIRA, S. R. S. Crossover pressure for supercritical fluid extraction of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil with pure CO₂ and CO₂ plus ethanol. In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA), Foz do Iguaçu, Paraná, **Caderno de Resumos do PROSCIBA**, 2007.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P., BISHOP, C. D., PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Antifungal activity of the essential oils of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, v.57, p.99-102, 2001.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. International thermodynamic tables of the fluid state carbon dioxide, 1976.
- ANDRIAMBELOSON, E.; KLESCHYOV, A. L.; MULLER, B.; BERETZ, A.; STOCLET, J. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Nitric Oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v.20, p.1053-1058, 1997.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis of International, Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.
- ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F. F.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction of pupunha (*Guililema speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, n.3, p.297-306, 2000.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, p.5736-5742, 2001.
- ATOUI, A, K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P, Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n.1, p.27-36, 2005.

- BAGGIO, J. Avaliação dos Resíduos (Casca e Pó Orgânico) de Café (*Coffea Arabica* L.) como Provável Fonte de Substâncias Bioativas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis, 2006.
- BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P, R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 214, n, [s/n], p.143–147, 2002.
- BARWICK, V. J. Strategies for solvent selection – a literature review. **Trends in Analytical Chemistry**, v.16, n.6, p.293-309, 1997.
- BAUER, R.; TITTEL, G. B. Quality assesment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v.2, n. 3, p.193-99, 1996.
- BE-JEN, W; YEN-HUI, L.; ZER-RAN, YU. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v.86, n. 2, p.237-243, 2004.
- BENDER, J. P. Equilíbrio de fases de polímeros biocompatíveis e monômeros: Dados experimentais e modelagem, Tese de mestrado, URI-Campus de Erechim, Brasil, 2008.
- BERNARDO-GIL, M, G.; RIBEIRO, M, A.; ESQUÍVEL, M. M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 73, n,[s/n], p.14-21, 2002.
- BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M. DE, SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, M. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, VALDIR. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p.85-89, 1998.
- BOUSSAADA, O., AMMAR, S., SAIDANA, D., CHRIAA, J., CHRAIF, I., DAAMI, M., HELAL, A. N., MIGHRI, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. **Microbiological Research**, v.163, p.87-95, 2008.
- BRUNNER, G. Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt, Alemanha: Steikopff, Springer, p. 387, 1994.

- BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex, Acesso em 05 de Novembro de 2006, Disponível em:
<<http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>>.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. ^a Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytot. Research**, v.14, p. 401-18, 2000.
- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z., DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **J. of Supercritical Fluids**, v,34, p.163–170, 2005.
- CAMPOS, L.M.A.S., LEIMANN, F.V., PEDROSA, R.C., FERREIRA, S.R.S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *ioresource Technology*. v. 99, p. 8413-8420, 2008.
- CANTERLE, LIANA PEDROSO. Erva-Mate e Atividade Antioxidante. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Santa Maria, RS, 2005.
- CARBONARI, K. ^a Avaliação do potencial antioxidante (*In vitro e In vivo*) e antiinflamatório de *Ouratea Parviflora*, *Polymnia Sonchifolia* e *Marlierea Obscura*, Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2005.
- CARVALHO Jr., P. M. De; RODRIGUES, R. F. O.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARQUES, M. O. M., SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.297-301, 2004.
- CARVALHO Jr., R. N.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; MEIRELES, M. A. A. **J. Chem. Eng. Data**, v. 51, p.997-1000, 2006.
- CARVALHO Jr, R. N. DE. Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, Brasil, 2000.

- CARVALHO Jr., R. N.; MOURA, S. L.; QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P. T. V.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Determination of the global yield isotherms for the system Rosemary. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2003, Versailles. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, Versailles, França, p.129-134, 2003.
- CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; MARTÍNEZ, E. DE LA OSSA. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **J. of Supercritical Fluids**, v. 41, p.43–49, 2007.
- CATCHPOLE, O. J. & KING, M. B. Measurement and correlation of binary diffusion coefficients in near critical fluids. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 33, p. 1828–1837, 1994,
- CHASSAGNEZ-MÉNDEZ, A. L.; CÔRREA, N. C. F.; FRANÇA, L. F.; MACHADO, N. T.; ARAÚJO, M. E. A mass transfer model applied to the supercritical extraction with CO₂ of curcumins from turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, n.3, p.315-322, 2000.
- CHAROENSEMBUT-AMON, A.; MARTIN, J.; KOBAYASHI, J. R. **Fluid Phase Equil.** v.31, p.89-104, 1986.
- CECHINEL FILHO; YUNES, R. A. Breve Análise Histórica de Plantas Mediciniais, In: **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, YUNES, R.; A CALIXTO J. B.(orgs). Chapecó: Argos, p.18-34, 2001.
- CÉTKOVI, G. S.; DJILAS, S. M.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M.; TUMBAS, V. T. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food research International**, v.. 37, p. 643-650, 2004.
- CHEN, H. & TAPPEL. A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidations induced by CBrCl₃ in liver, lung, heart, and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.854-858, 1996.
- CLAVIER, J-Y. & PERRUT, M. Scale-Up Issues for Supercritical Fluid processing in Compliance with GMP. France: Champigneulle, 2004, 37 p.

- CORREIA, J.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica, Florianópolis: 2006, 31 p. Relatório de iniciação científica (PIBIC- CNPQ), Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.
- CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. **J. of Supercritical Fluids**, v. 14, n, 2, p, 139-144, 1999.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**, Reviews, 12: p.564-82, 1999.
- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Clarendon Press: Oxford, 85 p.1975.
- CYGNAROWICZ, M. L.; SEIDER, W. D. Design na control of supercritical extraction processes: A review. In: Bruno, T, J.; Ely, J, F, *Supercritical Fluid Technology: Reviews in Modern Theory and Applications*, 1a ed, Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 11, 383-403, 1991.
- DANIELSKI, L. Extraction and Fractionation of natural Organic Compounds from Plant Materials with Supercritical Carbon Dioxide. Tese de Doutorado, Technische Universität Hamburgo-Harburg, Hamburgo, Alemanha, 2007.
- DANIELSKI, L. Solubilidade das Oleoresinas de Calêndula (*Calendula officinalis* L) e Cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO₂ supercrítico, Florianópolis, 2002, Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.
- DAVIES, K. J., A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life, **Biochemistry Society Symposium**, v.61, p.1-31, 1994.
- DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUÉZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and purification of Compounds with Antioxidant Activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p.2441-2469, 2006.
- DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian

- medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.97, p.654-660, 2006.
- DOHRN, R. General Correlations for pure component parameters of two-parameter equations of state. **J. of Supercritical Fluids**. v.5, I.2, p. 81-90, 1992.
- DRAGSTED, L. O.; STRUBE, M.; LARSEN, J. C. Cancer protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. **Pharmacol. Toxicol.**, v.72, n1, p.116-135, 1993.
- DUARTE, M. C. T., LEME, E. E., DELARMELINA, C., SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.
- ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical Models for Supercritical Extraction of Olive Husk Oil. **J. of Supercritical Fluids**. v.16, p.43-58, 1999.
- FACINO, R. M.; CARINI, G.; ALDINI, G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites. **Drugs**, v.46, p.15-21, 1993.
- FENNEMA, O, R, **Química dos alimentos**, Zaragoza: Acribia S,A, 1.095p., 2000.
- FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European J. Pharmacology**. 569, p.228-236, 2007.
- FERREIRA, S. R. S. Extração com dióxido de carbono líquido subcrítico de óleo essencial de pimenta-do-reino. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- FERREIRA, S. R. S. Cinética de transferência de massa na extração supercrítica de óleo essencial de pimenta-do-reino. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **J. of Food Engineering**. v.54, n.4, p.263-269, 2002.

- FRANCESCHI, E.; GRINGS, M. B.; FRIZZO, C. D.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C. **Fluid Phase Equil.** 226, p. 1-8, 2004.
- FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. **Pharm. Biol.**, v.36, p.14-20, 1998.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.
- GEETHA, T, VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **J. Ethnopharmacol**, v.76, p.77-80, 2001.
- GÓMEZ, M. E. D. B. Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta, I, Estabilidade oxidativa, (Tese para obtenção de grau de DOUTOR) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 149 p., 2003.
- GOMIDE, R. Operações Unitárias, São Paulo, v.1, 1980.
- GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T.; extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan.** n. 26, p. 401-407, 1993.
- GREGORIO, G.; BARROS, D.; NEVES, J. R. L. Novas apresentações do Acheflan estão em estudo. Matéria do Jornal Phytomédica, ano 1, nº 2, 2005. Disponível em: <http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/nu_mero6.pdf>, Acesso em 24 de abril de 2007.
- GRUWALD, J. O. O. Crescente papel da plantas medicinais nos cuidados de Saúde na Europa. **Drug Information Journal.** n.32, p. 151-53, 1998.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3^aed, New York: Oxford University Press, 1999.
- HARBONE, J. B. & WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoids research since 1992. **Pyhochemistry.** v. 55, p. 481-504, 2000.

- HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **Journal of Chromatography**. v,776, p.233-243, 1997.
- HENSE, H. Estudo da dispersão axial e radial na extração de plantas naturais utilizando gases supercríticos. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Hamburgo-Harburg- Technische Uni. Hamburg-Harburg, TUHH, Alemanha, 1997.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S. - Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**. 63: 2-10, 1997.
- HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**. v. 71, n.2, p. 229-233, 2002.
- HU, Q.; HU, Y.; XU, J. Free radical-scavenging activity of Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**. v. 91, p. 85-90, 2005.
- JOCKMANN, A. Extração supercrítica de oleoresina de calêndula (*Calendula officinalis*). Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**. v.36, n. 7, p. 703- 725, 2001.
- KASSIM, K. M.; DAVARNEJAD, R.; ZAINAL, A. Phase equilibrium studying for the supercritical fluid extraction process using carbon dioxide solvent with 1.35 mole ratio of octane to ethanol mixture. **Chem. Eng. J**. v. 140, I.1-3, p. 173-182, 2008.
- KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; SEFIDKON, F.; BAHRAMIFAR, N. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**. v.86, p. 587-591, 2004.

- KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA, J. R. A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **J. of Food Engineering**. v. 80, p. 631–638, 2007.
- KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. *J. of Food Engineering*. v. 90, p. 35-43, 2009.
- KOTAN, R., KORDALI, S., ÇAKIR, A. Screening of antibacterial activities of twenty one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch. C* 62c, 507e514, 2007.
- LANZA, M. Comportamento de fases dos óleos de oliva, soja e mamona em n-butano e propano a alta pressão. Dissertação de mestrado, Departamento de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. URI- Campus de Erechim, 2004.
- LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. M. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n.9, p. 2520-2525, 2003.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, JEAN-MARIE. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quím. Nova**. v. 27, n.6, São Paulo, Nov./Dec., 2004.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p.98-104, 1998.
- LÓPEZ, M.; ARCE, L.; GARRIDO, J.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M., Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, n.3, p.726-731, 2004.
- LOULI, V.; RAGOUSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**. v. 92, n. 2, p.201–208, 2004.
- LUTERMANN, C. ; WILLEMS, E. ; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Effects os various binary and ternary supercritical phases on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Journal of Chromatography A**, v.816, p.201-211, 1998.

- MACHMUDAH, S.; SULASWATTY, A.; SASAKI, M.; GOTO, M.; HIROSE, T. Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. **J. of Supercritical Fluids**. v. 39, p. 30–39, 2006.
- MANTELL, C.; RODRÍGUES, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. Semi-Batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. **Chemical Engineering Science**. v. 57, p.3831-3838, 2002.
- MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. v. 45, p. 594-598, 1968.
- MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. Md. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.; Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**. v. 52, p. 487–496, 2007.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. A. J. Universidad de León y Hospital de León. **Nutr. Hosp.** v.17 (6), p. 271-278, 2002. Disponível em: <http://www.recursosdeenologia.com/rec/35/los-flavonoides-propiedades-y-acciones-antioxidantes/>. Acesso em 24 de abril de 2007.
- MARTÍNEZ, J. Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante processos de extração supercrítica, Campinas. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2002.
- MARTÍNEZ, J. Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2005.
- MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**. v. 42, n.5, p.1057-1063, 2003.

- MARTÍNEZ, J.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of clove and vetiver oils with supercritical carbon dioxide: modeling and simulation. **The Open Chemical Engineering Journal**. v. 1, p.1-7, 2007.
- MATILHA, A; CARDOZO FILHO, L.; WOLFF, F. Simulação do processo de desterpenação supercrítica do óleo essencial de laranja. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p.1433-1437, 2001.
- MATTEA, F.; CARDARELLI, D. A.; DAGHERO, J. D.; MATTEA, M. A. Natural antioxidants obtained with supercritical CO₂, In: Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos, V. Florianópolis, **Caderno de Resumos do V EBFS**, Florianópolis: EQA/CTC - UFSC, 70 p., 2004.
- MENDES, M., OLIVEIRA, J. V., ULLER, A. Fracionamento de óleos de citros utilizando fluidos supercríticos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 17, n. 4, Campinas Dec. 1997.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p. 127-130, 2001.
- MEZZOMO, N. Óleo de amêndoa de pêssego: Avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2008.
- MICHIELIN, E. M. Z. Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*). Florianópolis. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2002.
- MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **J. of Supercritical Fluids**. v. 33, n.2, p.131-138, 2005.
- MICHIELIN, E. M. Z.; ROSSO, S.; FRANCESCHI, E.; BORGES, G. R.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. High-

- pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and trans-caryophyllene. **J. Chem. Thermodynamics**. v. 41, p. 130-137, 2009.
- MILES, A.M. & GRISHAM, M.B. Antioxidant properties of aminosalicylates. **Methods enzymol.**, v 234, p.555-572, 1994.
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of experiments, 6^a edição, USA, 2005.
- MOREIRA, A. V. B. & MANCINI-FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, canela e Erva-doce em Sistemas Aquoso e lipídico. **Nutrire- Rev. Soc. Brás. Alim. Nutr. – Journal. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, v.5, p.44-45, 2003.
- MORRISON, R.; & BOYD, R. Química orgânica. 7.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981, 1510p.
- MOURA, L. S. de. Obtenção por extração supercrítica do extrato de funcho (*Foeniculum vulgare*): determinação das isotermas de rendimento global, de parâmetros cinéticos, e do equilíbrio de fases. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2004.
- MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press LLC, Florida, 339p, 2000.
- NAGARAJ, M., SUNITHA, S., VARALAKSHMI, P. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on the lipid peroxidation and antioxidant status in rat kidney after chronic cadmium exposure. **J. of Applied Toxicology**, v.20, p.413-7, 2000.
- NAIR, V. D. P., KANFER, I., HOOGMARTENS, J. Determination of stigmaterol β -Sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.731-737, 2006.
- NARDI, G. M. Avaliação da atividade antioxidante, antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto, frações, sub-frações e compostos isolados da *Croton celtidifolius*. Universidade Federal De Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Dissertação (Mestrado). Florianópolis, 2002.

- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- PASSOS, G. F.; FERNADES, E. S.; CUNHA, F. M. da; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. of Ethnopharmacology**. 110, p. 323-333, 2007.
- PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **J. of Supercritical Fluids**. v. 30, n,1, p. 51-61, 2004.
- PEREZ-GARCIA, F.; & MARIN, E. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis* involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**. v. 59, n.24, p. 2033-2040, 1996.
- PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid Extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**. v.77, p. 57-63, 2006.
- PEKER, H.; SRINIVASAN, M. P.; SMITH, J. M.; MCCOY, B. J. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **AIChE J.** 38, p. 761-770, 1992.
- PENG, D. Y.; ROBINSON, D. B. New two – Constant Equation of State. **Ind. Eng. Chem. Fundam.** v.15, p. 59-64, 1976.
- PRAUSNITZ, J. M.; ANDERSON, T. F.; GRENS, E. A.; ECKERT, C. A.; HSIEH, R.; O'CONNELL, J. P. Computer Calculation for Multicomponent Vapor-Liquid and Liquid-Liquid Equilibria, Prentice-Hall, New Jersey, p.353, 1980.
- PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; AZEVEDO, E. G. de. Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase equilibria, 2^a ed, Prentice Hall, New Jersey, p.860, 1999.
- PRESS, W. C.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. Numerical Recipes in FORTRAN: The Art of Scientific Computing, Cambridge University Press, 2nd ed., 1992.

- QUISPE-CONDORI, S.; S´ANCHEZ, D.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**. v.36, p.40–48, 2005.
- QUISPE-CONDORI, S.; ROSA, P. T. V.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A.; MEIRELES, M. A. A. Global yield of the Supercritical CO₂ extraction from *Cordia verbenacea* DC - Anticancer and antimycobacterial activities. **Pharmacognosy Magazine**. v.3, I. 9, Jan-Mar, 2007.
- QUISPE-CONDORI, S.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. ANGELA A. Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**. v. 46, p.27–32, 2008.
- RAMOS, C.; BARROS, D.; GREGÓRIO, G.; TINÊO, M.; BLUMM, V. F. *Cordia verbenacea*: planta contra a inflamação. Matéria do Jornal Phytomédica. Ano 1, nº 1, 2005. Acesso em 24 de abril de 2007.
Disponível em:
<http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/n_umero5.pdf>
- RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human helth in the twenty-first century. **Trends in Biotechnonology**. v. 20, n.12, p.522-531, 2002.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. The Properties of Gases and Liquids, 4th Edition, McGraw-Hill, New York, 1987.
- REBELLO, J. De M. Avaliação da Atividade Antioxidante e Antifúngica de Análogos Sintéticos da Acetofenona e Pró-Oxidante e Antitumoral de Chalconas Sintéticas. Dissertação de mestrado.

Universidade federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2005.

- REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **J. of Supercritical Fluids**. v.10, n.1, p.1-37, 1997.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **J. of Supercritical Fluids**. v. 38, p.146–166, 2006.
- RIBEIRO, É. T. S.; FETT, R.; FERREIRA, S.R. S. Supercritical fluid extraction of apple pomace: phenolics compounds and in vitro antioxidant activity. In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA), Foz do Iguaçu, Paraná. **Caderno de Resumos do PROSCIBA**, 2007.
- RIBEIRO, M. A.; BERNARDO-GIL, M. G.; ESQUÍVEL, M. M. *Melissa officinalis*, L. study of antioxidant activity in supercritical residues. **J. of Supercritical Fluids**. v. 21, n. 1, p. 51–60, 2001.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. and PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds, **Trends in Plant Science – Reviews**, v. 2, n. 4, 1997.
- ROBAK, J & GRYGLEWSKI, R. J. Flavonóides are scavengers of superoxide anions, **Biochem. Pharmacol**. v. 37, n°5, p. 837-841, 1988.
- ROSSI, J. A. Jr. & SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enol. Vitic**. v. 16, p. 144-158, 1965.
- RUIZ, A. P. Extração de glicosídeos da estévia com fluidos pressurizados. Campinas, 1999. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 1999.
- SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **J. of Supercritical Fluids**. v.39, p.330-337, 2007.
- SANDLER, S. I. Chemical and Engineering Thermodynamics. Ed, 3 th, Wiley, 1989.

- SANDLER, S. I.; ORBEY, H. Equations of State, In: SANDLER, I. S. Models for thermodynamic and phase equilibria calculations. Marcel Dekker, New York, p.87-186, 1994.
- SANT'ANA, H. B. Desenvolvimento de uma metodologia para determinação da solubilidade de óleos essenciais em dióxido de carbono pressurizado. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, Brasil, 1996.
- SANTOS, A. B.; ALVES, S. De M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DA ROCHA NETO, O. G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, EMBRAPA, Comunicado Técnico n. 99, ISSN 1517-2244, Belém, PA, Novembro, 2004.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 35, n.4, ISSN 1517-8382, São Paulo out./dez, 2004.
- SCHNEIDER, G. M.; SCHEIDGEN, A. L.; KLANTE, D. Complex Phase Equilibrium Phenomena in Fluid Mixtures up to 2 GPa–Cosolvency, Holes, Windows, Closed Loops, High-Pressure Immiscibility, Barotropy, and Related Effects. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.39, p.4476-4480, 2000.
- SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M. H.; MANSOURI, S. H.; KHODASHENAS, M.; KHOSHNOOD, M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control.** v. 18 p.800–805, 2007.
- SCHULDZ, E. Z.; CKLESS, K.; SIMAS, M. E.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE R. M. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. **J. Cardiovas. Pharmacol.** v. 35, p. 234-239, 2000.
- SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. P.; PENNA, S. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topic antiinflammatory and gastrotoxicity of

- a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v.31, p.239-247, 1991.
- SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R., Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**. v.56, p.36-40, 1990.
- SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extracts of the leaves. **Planta Medica**. v.54, n.1, p.7-10, 1988.
- SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**. v.12, p.338-344, 2005.
- SIES, H. **Strategies of antioxidant defense**. Eur. J. Biochem. v. 215, p. 213-219, 1993.
- SILVA, D. C. M. N.; BENEDETTI, B. A.; MENUT, C.; MEIRELES, M. A. A. Evaluation of the antiradicals, antioxidant and antibacterial activities of extracts obtained by supercritical fluid extraction. I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, PROSCIBA. Foz do Iguaçu, Brasil, 2007.
- SILVA, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Bacharis trimera Less*). Florianópolis. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2 ed, ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, p. 21, 2001.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, v.299, p.152-178, 1999.

- SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.* n.45, (3), p. 177-181, 1995.
- SMÂNIA, A., J. R.; SMÂNIA, E. F. A.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.; DELLE MONACHE, G. Derivatization does not influence antimicrobial and antifungal activities of applanoxidic acids and sterols from *Ganoderma* spp, *Zeitschrift fur Naturforschung.* 61C, 31-34, 2006.
- SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C. Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics. Fourth Ed., McGraw-Hill Company, New York, p. 698, 1987.
- SOUZA, A. T.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; GUIRARDELLO, R.; MEIRELES, M. A. A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. *J. Chem. Eng. Data.* v.49, p.352-356, 2004.
- SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I, Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science.* v.49, n.3, p. 409-414, 1994.
- SOVOVÁ, H. & PROCHÁSKA, J. Calculations of Compressed Carbon Dioxide Viscosities. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* v.32, p. 3162-3169, 1993.
- SUBRA, P.; CASTELLANI, S.; JESTIN, P.; AOUIFI, A. Extraction of β -caroteno with supercritical fluids experiments and modeling. *J. of Supercritical Fluids.* v.12, n.3, p.261-269, 1998.
- TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. *Aiche Journal.* v.35, n.6, p.1029-1031, 1989.
- TEPELLI, F.; O'CONNELL, J. P.; CHEN, C. S.; BRADDOCK, R. J. Thermodynamics Analysis of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Terpenes from Cold-Pressed Orange Oil. *Ind. Eng. Chem. Res.* v. 29, p.618-624, 1990.
- TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia*

- verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentation and molecular interaction. **Toxicon**. v.46, p.318-327, 2005.
- TONTHUBTHIMTHONG, P.; DOUGLAS, P. L.; DOUGLAS, S.; LUEWISUTTHICHAT, W.; TEPPAITOON, W.; PENG SOPA, L. Extraction of nimbin from seeds using supercritical CO₂ and a supercritical CO₂-methanol mixture. **J. of Supercritical Fluids**, v.30, p.287-301, 2004.
- TROUILLAS, P.; CALLISTE, C-A.; ALLAIS, D-P. ; SIMON, A., MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J-L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**, v.80, p.399-407, 2003.
- ULTEE, A.; KETS, E.; SMID, E. Mechanisms of actions of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4606-4610, 1999.
- VAN KONYNENBURG, P. H.; SCOTT, R. L. PHILOS. Trans. R. Soc. London, 298 495-540, 1980.
- VEIGA JUNIOR, V. F. E.; PINTO, A. C. O. GÊNERO Copaifera L, **Quím, Nova**, v, 25, n, 2, p, 273-286, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v.28, n.3 São Paulo, May/June, 2005.
- XU, Z. & GODBER, J. S. Comparison of supercritical fluids and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. **J. Am. Oil Soc. Chemical and Mateial Science**. v.77, p.547-551, 2000.
- WESTERMAN, D.; SANTOS, R. C. D.; BOSLEY, J. A.; ROGERS, J. S.; AL-DURI, B. Extraction of Amaranth seed oil by supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**. v. 37, p.38-52, 2006.
- WANG, YUN-SONG.; HE, HONG-PIN; YANG, JING-HUA; DI, YING-TONG; HAO, XIAO-JIANG. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**. 13, 931-937, ISSN 1420-3049, 2008.
- ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A., Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the

- antioxidant action of the extracts. **J. of Supercritical Fluids**. v.24, n.1, p.57-76, 2002.
- ZETZL, C.; LOZANO, G. A.; BRUNNER, G. Compilation of batch SFE-Models for natural products. In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA). Foz do Iguaçu, Paraná, **Caderno de Resumos do PROSCIBA**, 2007.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, n. 11, p.5165-5170, 2001.
- ZHENG, G.Q., KENNEY, P.M., LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia-caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **J. of Natural Products**. v. 55, n.7, p.999-1003, 1992.
- ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O. *et al.* 1999, p. 489-516.
- YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194–197, p. 879–884, 2002.
- YOKOTA, J.; TAKUMA, D.; HAMADA, A.; ONAGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.467-471, 2006.
- YUNES, R. A; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**. v. 24, n.1, p. 147-52, 2001.

9 APÊNDICES

APÊNDICE I – Modelos Matemáticos

9.1 Modelo de Sovová (1994)

O pré-tratamento da matéria-prima vegetal antes da formação do leito de extração envolve, entre outros processos, a moagem da estrutura na qual o soluto está retido. Este procedimento visa, a princípio, reduzir o tamanho das partículas do sólido, de forma que a área de contato entre este e o solvente seja aumentada. No entanto, outra consequência da moagem é o rompimento das estruturas celulares que contém o soluto, de forma que parte deste fica livre para o contato com o solvente. Por outro lado, parte das estruturas celulares pode permanecer intacta mesmo após o pré-tratamento, de forma que o soluto contido nelas será de difícil acesso ao solvente. Assim, o rendimento global X_0 pode ser dividido em duas frações: X_p , razão mássica de soluto de fácil acesso, e X_k , razão mássica de soluto de difícil acesso. Levando em conta esta transformação na matéria-prima, Sovová (1994) propôs um modelo matemático para representar as curvas de extração (FERREIRA, 1996, CAMPOS *et al.* 2005, MARTÍNEZ *et al.* 2005).

Desta maneira, as equações do balanço de massa, propostas pelo modelo de SOVOVÁ (1994) são as seguintes:

Fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{-J(X, Y)}{\rho_s(1-\varepsilon)} \quad \text{Eq. 9.1}$$

Fase fluida:

$$U \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\rho_f} \quad \text{Eq. 9.2}$$

Onde: X ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$) e Y ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$) são as razões mássicas de soluto (concentração) nas fases sólida e fluida respectivamente, t é o tempo (s), h é a coordenada axial (m), U é a velocidade superficial do solvente (m/s), ρ_s ($\text{kg}_{\text{sólido}}/\text{m}^3$) e ρ_f ($\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$) são as densidades da fase sólida e fluida respectivamente, ε é a porosidade do leito e $J(X, Y)$ é a taxa de transferência de massa interfacial ($\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$).

Como descrito anteriormente, a quantidade de óleo extraível, ou seja, o teor inicial de óleo no sólido (O) é dividido em óleo de fácil acesso

(P), que se concentra na superfície do sólido, e óleo de difícil acesso (K), que se encontra no interior das células. A concentração de soluto na fase sólida é descrita através do teor de sólidos totais livre de soluto, ou sólido inerte (N), através das relações:

$$X_0 = \frac{O}{N}; \quad X_K = \frac{K}{N}; \quad X_P = \frac{P}{N} \quad \text{Eq. 9.3}$$

As condições iniciais e de contorno para as equações diferenciais do balanço de massa para as fases sólida e fluida são:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (\text{C.I.1}) \quad \text{Eq. 9.4}$$

$$Y(h, t = 0) = 0 \quad (\text{C.I.2}) \quad \text{Eq. 9.5}$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (\text{C.C.}) \quad \text{Eq. 9.6}$$

Onde: X_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (g/g).

SOVOVÁ (1994) definiu quatro variáveis adimensionais para a solução das equações diferenciais e descrição das curvas de extração, apresentadas como segue:

$$z = \frac{k_{Y_a} h}{U} \quad \text{Eq. 9.7}$$

$$\tau = \frac{k_{Y_a} \cdot \rho_f \cdot Y^*}{(1 - \varepsilon) \rho_s \cdot X_k} t \quad \text{Eq. 9.8}$$

$$r = \frac{X_0}{X_k} \quad \text{Eq. 9.9}$$

$$Y = 1 - \frac{y}{Y^*} \quad \text{Eq. 9.10}$$

Onde: z uma coordenada adimensional, τ é o adimensional do tempo, k_{Y_a} é o coeficiente de transferência de massa na fase fluida em s^{-1} , r é a concentração adimensional na fase sólida, Y^* é a concentração de equilíbrio em g/g, X_k é a razão mássica de soluto de difícil acesso em g/g, Y é a concentração normalizada de soluto na fase solvente.

De acordo com Sovová (SOVOVÁ, 1994), o processo de extração pode ser dividido em três etapas:

- Etapa de taxa constante de extração (CER), onde a superfície externa das partículas está completamente coberta de óleo. Esta etapa é controlada pela convecção, estando na fase solvente a resistência à transferência de massa;
- Etapa de taxa decrescente de extração (FER), onde aparecem falhas na camada superficial de óleo (soluto) que cobre as partículas. Nesta etapa ambos os mecanismos de transferência de massa são importantes, convecção e difusão;
- Período difusional, controlado pela resistência à transferência de massa na fase sólida, ocorre o esgotamento do óleo de fácil acesso ao longo de todo o leito de partículas.

A solução da equação 9.2 foi expressa por SOVOVÁ (1994) empregando o modelo de Lack. Este modelo considera três equações para representar a concentração de soluto na fase solvente. Cada equação representa uma etapa do processo, desde a etapa CER até a etapa difusional. O perfil normalizado de concentração de soluto na fase fluida (Equação 9.2) pode ser expresso pelas seguintes equações, para as três diferentes etapas de extração:

Para $\tau < \tau_{CER}$

$$Y = \exp(-z) \quad \text{Eq. 9.11}$$

Para $\tau_{CER} \leq \tau < \tau_{FER}$ e $z > z_w$

$$Y = \frac{\tau_{CER} \exp(z_w - z)}{\{r_0 - \exp[k(\tau_{CER} - \tau)]\}} \quad \text{Eq. 9.12}$$

Para $\tau_{CER} \leq \tau < \tau_{FER}$, $z \leq z_w$ e para $\tau \geq \tau_{FER}$

$$Y = \frac{r_0 \exp[k(\tau - \tau_{CER})]}{\{\exp(r_0.k.z) + r_0 \exp[k(\tau - \tau_{CER}) - 1]\}} \quad \text{Eq.9.13}$$

Onde: z é uma coordenada adimensional, o subscrito w indica a coordenada adimensional da posição entre extração rápida e extração lenta; r_0 é a concentração na fase sólida considerando o teor inicial de óleo; τ é o adimensional do tempo; e k é o parâmetro do modelo de Lack

proposto por SOVOVÁ (1994), que representa uma constante entre 0 e 1, e indica o fator de extração.

A solução das Equações 9.1 e 9.2, pode ser representada pelas seguintes equações, que descrevem as curvas de extração para as três etapas do processo:

Para $t < t_{\text{CER}}$: período de taxa constante de extração (CER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{\text{CO}_2} \cdot t \quad \text{Eq. 9.14}$$

Para $t_{\text{CER}} \leq t < t_{\text{FER}}$: período de taxa decrescente de extração (FER)

$$m_{\text{ext}} = Y^* [t - t_{\text{CER}} \cdot \exp(z_w - Z)] Q_{\text{CO}_2} \quad \text{Eq. 9.15}$$

Para $t \geq t_{\text{FER}}$: período controlado pela difusão:

$$m_{\text{ext}} = N \left\langle X_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{W X_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\left(\frac{W \cdot Q_{\text{CO}_2}}{N} \right) (t_{\text{CER}} - t) \right] \frac{X_k}{X_0} \right\} \right\rangle$$

Eq. 9.16

Onde: m_{extr} é a massa de extrato (g), t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (s), t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (s), N é a massa de matéria-prima livre de soluto (g), Y^* é a solubilidade (g/g), Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/s), X_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida, X_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas e W é um parâmetro para o período de taxa de extração lenta.

Nas equações do modelo de Sovová pode-se dizer que a quantidade Z é um parâmetro para o período CER porque esta quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER:

$$Z = \frac{N \cdot k_{\text{Ya}} \cdot \rho_{\text{CO}_2}}{Q_{\text{CO}_2} \cdot (1 - \epsilon) \cdot \rho_s} \quad \text{Eq. 9.17}$$

Para a solução do modelo de Sovová, é necessário o conhecimento dos seguintes parâmetros (CAMPOS *et al.* 2005; MICHIELIN, 2002; POVH *et al.* 2001):

- M_{CER} : Taxa de extração na etapa CER (kg/s);
- Y_{CER} : Razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER ($kg_{extrato}/kg_{CO_2}$);
- t_{CER} : Duração da etapa CER (s).

Esses parâmetros podem ser obtidos pelo ajuste simultâneo de duas retas sob a curva de extração (massa de óleo acumulada versus tempo de extração) com o auxílio do pacote estatístico SAS. O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e a partir do mesmo obtêm-se o valor de Y_{CER} através da equação:

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}}$$

As demais restrições e definições são descritas a seguir:

$$t_{CER} = \frac{X_0 - X_k}{Y^* Z} \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. 9.19}$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{W \cdot X_0} \ln \left\{ \frac{X_0 \cdot \exp[(W \cdot Q_{CO_2} / N)(t - t_{CER})] - X_k}{X_0 - X_k} \right\}$$

$$W = \frac{N \cdot k_{Xa}}{Q_{CO_2} \cdot (1 - \varepsilon)} = k \frac{ZY^*}{X_k}$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2} \cdot W} \ln \left[\frac{X_k + (X_0 - X_k) \cdot \exp(WX_0 / Y^*)}{X_0} \right]$$

FERREIRA (1996) modelou o processo de extração de óleo essencial de pimenta-do-reino utilizando o modelo de SOVOVÁ (1994) considerando apenas o processo convectivo à transferência de massa, sendo necessário o ajuste de um parâmetro k para a avaliação da influência da resistência interna à transferência de massa, pois o

coeficiente de transferência de massa foi representado pelo coeficiente da fase solvente para descrever todo o processo de extração, inclusive a etapa difusiva. Este procedimento foi adotado, pois segundo DEAN & KANE (1993) e FERREIRA *et al.* (1999), as duas primeiras etapas do processo de extração representam mais de 70% do processo, sendo que aproximadamente 50% da eficiência do processo é devida à etapa de taxa constante de extração, ou seja, para se obter 99% de recuperação de soluto da matriz sólida, o tempo de extração requerido é aproximadamente 10 vezes maior do que o necessário para uma recuperação de 50% do soluto.

O parâmetro k_{Ya} que é o coeficiente de transferência de massa na fase fluida pode ser definido pela seguinte equação (FERREIRA *et al.* 2002) :

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} S H \Delta Y} \quad \text{Eq. 9.23}$$

Sendo:

$$\overline{\Delta Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln \left[\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}} \right]} \quad \text{Eq. 9.24}$$

Onde: $\overline{\Delta Y}$ é a concentração média logarítmica na fase fluida, (g/g), S é a área de seção transversal do leito (m²), H é o comprimento do leito (m)

POVH *et al.* (2001) modelaram o processo de extração de oleoresina de camomila, fazendo uma modificação no modelo de Sovová. POVH *et al.* (2001) definiram o coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{Xa}) segundo a Equação 9.25, tornando, desta maneira, o modelo capaz de descrever toda a curva de extração sem a necessidade do emprego de um parâmetro ajustável. MICHIELIN (2002) e CAMPOS *et al.* (2005) também utilizaram a definição proposta por POVH *et al.* (2001) para modelar as curvas de extração de oleoresina de cavalinha e oleoresina de calêndula, respectivamente. Neste trabalho, para descrever a cinética de extração dos extratos de erva baleeira, também foi utilizada esta definição. Assim:

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \rho_{CO_2} \overline{\Delta Y}}{\rho_s \Delta X} \quad \text{Eq. 9.25}$$

Sendo:

$$\Delta X = \frac{(X_p + X_k)}{2} \quad \text{Eq. 9.26}$$

Onde: ΔX é a concentração média na fase sólida (g/g).

9.2 Modelo Logístico – Martínez *et al.* (2003)

Assim como alguns modelos presentes na literatura: modelo de Sovová (SOVOVÁ, 1994), modelo proposto por FRANÇA & MEIRELES (2000) entre outros, o modelo LM se baseia no balanço de massa no leito de extração, considerando um leito cilíndrico com comprimento H muito maior que o diâmetro, no qual o solvente escoar na direção axial com velocidade U ; a matéria-prima está distribuída uniformemente ao longo do leito e a temperatura, a pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados porque esses fenômenos não têm influência significativa no processo quando comparados aos efeitos de convecção. Deste modo, o balanço de massa no leito de extração, na fase fluida, pode ser simplificado e apresenta-se da seguinte forma:

$$U \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\rho_f} \quad \text{Eq. 9.27}$$

Onde: X ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{sólido}}$) e Y ($\text{g}_{\text{óleo}}/\text{g}_{\text{solvente}}$) são as razões mássicas de soluto (concentração) nas fases sólida e fluida respectivamente, t é o tempo (s), h é a coordenada axial (m), U é a velocidade superficial do solvente (m/s), ρ_f ($\text{kg}_{\text{solvente}}/\text{m}^3$) é a densidade da fase fluida e $J(X, Y)$ é a taxa de transferência de massa interfacial ($\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$).

A condição de contorno é dada pela seguinte equação:

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad \text{Eq. 9.28}$$

O termo de transferência de massa interfacial $J(X, Y)$ é representado pela equação que segue:

$$J(X, Y) = S = \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq. 9.29}$$

Sendo:

$$S_i(t) = \frac{A_i b_i \exp[b_i(t_{mi} - t)]}{\{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]\}^2} \quad \text{Eq. 9.30}$$

Onde: A, b e t_m são parâmetros do modelo e o subscrito i corresponde a um único composto do soluto ou grupo de compostos com características semelhantes.

A elaboração do Modelo Logístico (LM) teve como motivação a necessidade de se tratar o soluto como uma mistura de substâncias, e não mais como um único pseudocomposto como acontece na maioria dos modelos presentes na literatura. Este modelo apresentou uma nova opção de ajuste para a função $S_i(t)$ presente no modelo de FRANÇA & MEIRELES (2000). Tanto no modelo LM como no modelo de FRANÇA & MEIRELES (2000) a taxa de transferência de massa interfacial $J(X,Y)$ foi definida como uma função S que depende da composição do extrato ao longo do processo (MARTÍNEZ *et al.* 2003).

Integrando a equação 9.27 e utilizando a condição de contorno dada pela equação 9.28, tem-se para a saída do extrator:

$$Y(h = H, t) = \frac{H}{u\epsilon} \sum_{i=1}^n S_i \quad \text{Eq. 9.31}$$

Onde: H é o comprimento total do leito de extração, u é a velocidade intersticial do solvente (m^3/s) e ϵ é a porosidade total do leito de extração.

A curva de extração total, representando a massa de óleo em função do tempo, pode ser obtida pela integração da equação 31, com a condição inicial da equação 9.32:

$$m(h = H, t) = 0 \quad \text{Eq. 9.32}$$

$$m(h = H, t) = \int_0^t Y Q_{CO_2} dt = \frac{Q_{CO_2} H}{u\epsilon} \sum_{i=1}^n \int_0^t S_i dt \quad \text{Eq. 9.33}$$

A curva obtida pela resolução da equação 9.33 é a soma das curvas de extração de cada grupo de compostos, que pode ser representada pela seguinte equação:

$$m_i(h = H, t) = \frac{Q_{CO_2} H A_i}{u\epsilon} \left\{ \frac{1}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - \frac{1}{1 + \exp[b_i t_{mi}]} \right\} \quad \text{Eq. 9.34}$$

A princípio o modelo LM possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos:

$$m_{\text{totali}} = \frac{\% m_t}{100} = X_{0i} m_t \quad \text{Eq. 9.35}$$

Onde: m_i é a massa total de sólidos na coluna de extração, X_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível e m_{totali} é a massa total de cada grupo de composto.

Desta forma, o modelo pode ser reduzido a dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , e a massa de cada grupo de compostos representada pela Equação 9.36:

$$m_i(h = H, t) = \frac{X_{0i} m_t}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. 9.36}$$

Quando o soluto é considerado como um pseudocomponente, a massa de soluto pode ser descrita como:

$$m_{\text{ext}}(h = H, t) = \frac{m_0}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. 9.37}$$

Sendo: $m_0 = X_0 m_t$

Onde: m_{ext} é a massa de óleo extraída (g), m_0 é massa inicial total de óleo (soluto) no leito de extração(g), t é o tempo de extração (s), b e t_m são parâmetros ajustáveis do modelo LM expressos em (s^{-1}) e (s), respectivamente. O parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou um máximo (MARTÍNEZ *et al.* 2003).

9.3 Modelo de TAN e LIOU (1989)

O modelo de dessorção apresentado por TAN e LIOU (1989) é descrito por um modelo convectivo sem o termo de dispersão. Este modelo considera a transferência de massa interfacial como um modelo cinético de primeira ordem, ou seja, a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida, sendo a transferência de massa

interfacial representada pela constante de dessorção (k_d). Este fenômeno pode ser interpretado como um processo de transporte com equilíbrio instantâneo, baseado na variação da concentração de soluto na matriz vegetal e uma pequena resistência à transferência de massa (CHASSAGNEZ-MÉNDEZ *et al.* 2000). O modelo de dessorção, assim como o de SOVOVÁ (1994), considera a unidade de extração como um leito cilíndrico no qual o sólido, devidamente pré-tratado (seco e moído), é acomodado. O solvente, com pressão e temperatura fixas flui axialmente através do leito, retirando do sólido os compostos de interesse. Desta forma, na saída do leito tem-se o extrato, formado pelos compostos solubilizados no CO₂ supercrítico (MARTÍNEZ, 2002).

O balanço de massa no leito de extração pode ser escrito da seguinte maneira:

Fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -k_d X \quad \text{Eq. 9.38}$$

Fase fluida:

$$\varepsilon \rho_f \frac{\partial Y}{\partial t} + U \rho_f \frac{\partial Y}{\partial h} = -(1 - \varepsilon) \rho_s \frac{\partial X}{\partial t} \quad \text{Eq. 9.39}$$

Onde: k_d é a constante de dessorção (min^{-1}), que é um parâmetro ajustável do modelo.

As condições iniciais e de contorno para a resolução das Equações 9.38 e 9.39 são as mesmas apresentadas nas Equações 9.4 a 9.6.

Com as condições de contorno e inicial, resolvemos as Equações 9.38 e 9.39 obtendo uma expressão para a razão mássica de óleo na fase solvente na saída do extrator, em função do tempo:

$$Y(h = H, t) = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho_f} \left[\exp\left(\frac{k_d \varepsilon H}{U}\right) - 1 \right] \exp(-k_d t) \quad \text{Eq. 9.40}$$

A massa de extrato na saída do extrator em função do tempo de extração pode ser obtida resolvendo a seguinte integral:

$$m_{\text{ext}}(h = H, t) = \int_0^t Y(h = H, t) Q_{\text{CO}_2} dt \quad \text{Eq. 9.41}$$

Substituindo a Equação 9.40 na Equação 9.41 e integrando, obtemos:

$$m_{\text{ext}}(h = H, t) = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(k_d B)] [\exp(-k_d t) - 1] \quad \text{Eq. 9.42}$$

Sendo:

$$A = Q_{\text{CO}_2} \cdot \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \quad \text{Eq. 9.43}$$

$$B = \frac{\varepsilon H}{u} = \frac{\varepsilon H S \rho_f}{Q_{\text{CO}_2}} \quad \text{Eq. 9.44}$$

Onde: k_d é a constante de dessorção, H é o comprimento do leito (m), S é a área da seção transversal (m^2), ρ_s é a densidade do sólido (kg/m^3), ρ_f é a densidade da fase fluida, ε é a porosidade do leito.

9.4 Modelo de Goto *et al.* (1993)

O modelo apresentado por Goto *et al.* (1993) considera que o leito de extração é formado por partículas com geometria de uma placa plana. A partícula sólida é tratada como um meio poroso, que tem espessura desprezível em relação às demais dimensões, de forma que a transferência de massa ocorre apenas entre as duas maiores superfícies da placa. O processo de transferência de massa é controlado pelo mecanismo de dessorção (da partícula para os poros, seguido de difusão do soluto nos poros da partícula) com dois parâmetros ajustáveis: ϕ , relativo ao coeficiente global de transferência de massa e k , constante de equilíbrio de dessorção. As equações a seguir mostram os balanços de massa na folha, nos poros e na fase fluida:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = k_{\text{des}} \left(C_i - \frac{C_s}{K} \right)$$

$$\beta \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \beta) \frac{\partial C_s}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_i}{\partial Y^2}$$

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + \frac{C}{t} = -(1 - \varepsilon) k_f a_p (C - C_i|_{y=e})$$

Onde:

Y= coordenada da partícula;

C= razão mássica de soluto na fase fluida;

C_i= razão mássica de soluto nos poros da folha;

C_s= razão mássica de soluto na folha;

β= porosidade da folha;

k= constante de equilíbrio de dessorção;

k_{des}= coeficiente de dessorção;

D= difusividade efetiva intrapartícula;

τ= tempo de residência do solvente no leito;

k_fa_p= coeficiente volumétrico de transferência de massa;

e= meia espessura da folha;

a_p= área específica de transferência de massa.

As condições inicial e de contorno para a resolução das equações de balanço de massa são as seguintes:

$$C_s(Y, t = 0) = C_{s0}$$

$$C(Y, t = 0) = C_i(Y, t = 0) = 0$$

$$D \left(\frac{\partial C_i}{\partial Y} \right)_{y=e} = k_f a_p (C - C_i|_{y=e})$$

Desta forma, Goto *et al.* (1993) resolveram o sistema analiticamente e obtiveram uma equação da curva de extração com dois parâmetros ajustáveis: φ e k. A Equação (9.51) é a solução do balanço de massa pelo modelo de Goto *et al.* (1993).

$$m_{\text{ext}}(h = H_B, t) = \frac{A[\beta/k + (1 - \beta)]X_0\rho_s Q_{\text{CO}_2}}{\rho} \left\{ \frac{\tau}{a_1} \left[\exp\left(a_1 \frac{t}{\tau}\right) - 1 \right] + \frac{\tau}{a_2} \left[1 - \exp\left(a_2 \frac{t}{\tau}\right) \right] \right\}$$

Onde:

$$a_1 = \frac{1}{2} \left(-b + \sqrt{b^2 - 4c} \right)$$

$$a_2 = \frac{1}{2} \left(-b - \sqrt{b^2 - 4c} \right)$$

$$A = \frac{(1-\varepsilon)\phi}{[\beta + (1-\beta)k]\varepsilon(a_1 - a_2)}$$

$$b = \frac{\phi}{\beta + (1-\beta)k} + \frac{1}{\varepsilon} + \frac{\phi(1-\varepsilon)}{\varepsilon}$$

$$c = \frac{\phi}{[\beta + (1-\beta)k]\varepsilon}$$

$$\phi = k_p a_p \tau$$

9.5 Modelo de Difusão – Crank (1975)

O modelo de difusão apresentado por REVERCHON (1997) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor, considerando-se cada partícula sólida como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio, e supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula sólida. Neste caso, a partícula sólida esférica é o sólido que contém o óleo a ser extraído e o meio é o solvente supercrítico (MARTÍNEZ, 2002; REVERCHON, 1997).

De acordo com a segunda Lei de Fick, restrita para o caso de difusão unicamente radial, com o coeficiente de difusão constante, a concentração de soluto na fase sólida é dada por:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 X = D_{AB} \frac{\partial^2 X}{\partial Y^2} \quad \text{Eq. 9.58}$$

Onde: D_{AB} é o coeficiente de difusão da segunda Lei de Fick (m^2/min), r é a direção radial (m) e α é o coeficiente de transferência de calor.

Aplicando a segunda Lei de Fick para a difusão, e resolvendo analiticamente o balanço de massa na superfície interna da partícula, tem-se a seguinte equação que representa a massa de uma substância que se difunde através de uma partícula:

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D \cdot t}{r^2}\right) \right] \quad \text{Eq. 9.59}$$

Onde: D é o coeficiente de difusão, um parâmetro ajustável do modelo, r é o raio da partícula sólida e n é um número inteiro.

9.6 Modelo de Esquível *et al.* (1999)

Esquível *et al.* (1999) se basearam na equação da cinética de crescimento microbiano de Monod para descrever curvas globais de extração. A equação empírica que representa a curva de extração está apresentada na Equação (9.60):

$$m_{\text{ext}} = X_0 F \left(\frac{t}{b + t} \right) \quad \text{Eq. 9.60}$$

Onde:

m_{ext} = massa de extrato em função do tempo (kg);

t = tempo de extração (s);

F = massa de matéria-prima (kg);

X_0 = razão mássica inicial de soluto na fase sólida (kg/kg).

b = parâmetro ajustável (s).

9.7 Modelo VTII - Brunner (1994)

Este modelo considera fenômenos termodinâmicos, como o equilíbrio entre as fases sólida e fluida do sistema, e de transferência de massa, como dispersão axial, difusão na partícula e convecção na fase fluida. Brunner (1994) resolveu numericamente o balanço de massa e obteve curvas de extração que não só se ajustaram bem a dados experimentais, como também permitiram o escalonamento de um processo de laboratório para uma planta piloto, na ESC de teobromina de cacau.

Neste modelo os seguintes parâmetros são considerados para representar o comportamento da extração:

- relação de equilíbrio entre o sólido e o solvente supercrítico (isoterma de adsorção);
- difusão no sólido (coeficiente de difusão efetivo);
- transferência de massa da superfície do sólido para a fase fluida,

- dispersão axial (coeficiente de dispersão efetivo).
O modelo é representado pelas seguintes equações:

Balço de massa para a fase fluida:

$$\frac{\partial c_F(z)}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c_F(z)}{\partial z^2} - \frac{u_z}{\varepsilon} \frac{\partial c_F(z)}{\partial z} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{\partial \bar{c}_S(z)}{\partial t} \quad \text{Eq. 9.61}$$

Balço de massa para a fase s3lida:

$$\frac{\partial \bar{c}_S(z)}{\partial t} = a k_{oG} \left(c_F(z) - \bar{c}_S(z) \frac{K(\bar{c}_S)}{\rho_S} \right) \quad \text{Eq. 9.62}$$

Relaço de equil3brio entre a fase fluida e a fase s3lida:

$$K(\bar{c}_S) = k_1 \bar{c}_S \exp^{-k_2} \quad \text{Eq. 9.63}$$

Coefficiente de transfer3ncia de massa global:

$$\frac{\beta_F}{k_{oG}} = 1 + \frac{\text{Bi}K(\bar{c}_S)}{6} \quad K(\bar{c}_S) = \frac{c_F}{\bar{c}_S} \quad \text{Eq. 9.64}$$

$$\text{Bi} = \frac{\beta_F R K}{D_{es}} \quad \text{N3mero de Biot} \quad \text{Eq. 9.65}$$

Onde:

\bar{c}_S = concentrao m3dia de extrato na fase s3lida;

c_F = concentrao de extrato na fase fluida (solvente supercr3tico);

D_{ax} = coeficiente de dispersao axial;

u_z = velocidade do solvente supercr3tico;

$K(\bar{c}_S)$ = coeficiente de equil3brio entre a fase s3lida e a fase fluida;

D_{es} = coeficiente de difusao efetivo na fase s3lida;

k_{oG} = coeficiente de transfer3ncia de massa global relacionado a fase fluida;

z = coordenada na direcao axial;

ε = porosidade do leito fixo;

t = tempo de extrao;

a = superf3cie espec3fica da fase s3lida (3rea da superf3cie para transfer3ncia de massa);

ρ_S = densidade do s3lido;

k_1, k_2 = coeficientes da isoterma de sorção (isoterma de Freundlich);

β_F = coeficiente de transferência de massa na fase fluida.

Para o balanço de massa na fase fluida são feitas algumas considerações: o gradiente de concentração na direção radial é desprezado, convecção na fase fluida e dispersão axial, processo de extração isotérmico.

Na fase sólida as seguintes considerações são feitas: o transporte no sólido pode ser considerado em uni-direcional, o sólido é uniforme e o extrato é igualmente distribuído em todo o material sólido. Os fenômenos de transporte como a transição pela membrana, difusão nos poros e difusão no sólido são atribuídos ao coeficiente de difusão efetiva. Na interface sólido/solvente é assumido uma relação de equilíbrio (isoterma de adsorção).

As equações deste modelo foram desenvolvidas para descrever a extração de uma mistura de compostos, mas também podem ser empregadas para descrever o comportamento de extração de componentes individuais. As interações entre os componentes do extrato e a influência no processo de extração são desprezadas. Este modelo pode ser utilizado para determinar parâmetros cinéticos a partir de dados experimentais medidos em laboratório e que após podem dar suporte para o scale-up de plantas de extração.

APÊNDICE II – Dados experimentais das curvas de extração.

Tabela 25: Tempo de extração e rendimento obtido nas curvas de extração.

$P(\text{bar})/T(^{\circ}\text{C})/Q_{\text{CO}_2}(\text{g}/\text{min})$.

100/50/3,33		150/40/3,00		150/40/8,33		200/30/5,00	
Tempo (min)	X ₀ (%)	Tempo (min)	X ₀ (%)	Tempo (min)	X ₀ (%)	Tempo (min)	X ₀ (%)
0	0,000	0	0,000	0	0,000	0	0,000
5	0,970	5	0,325	5	0,000	5	1,300
10	1,328	10	0,393	10	0,740	10	1,614
15	1,505	15	0,531	15	0,958	15	1,737
20	1,615	20	0,637	20	1,172	20	1,831
30	1,744	30	0,856	30	1,623	30	1,950
40	1,824	35	1,032	50	2,046	40	2,034
50	1,869	45	1,198	70	2,335	50	2,420
70	1,959	55	1,441	105	2,608	70	2,633
100	2,003	65	1,531	130	2,900	100	2,834
130	2,081	75	1,649	160	3,021	130	3,107
160	2,148	105	1,791	190	3,145	160	3,216
190	2,176	135	1,898	220	3,319	190	3,452
220	2,206	165	1,957	250	3,511	220	3,688
250	2,299	195	1,990	280	3,687	250	3,881
270	2,346	225	2,062	310	3,719	280	4,039
		255	2,103			310	4,081
		285	2,129				

Continuação da Tabela 25.

200/40/5,00		200/50/5,00		300/50/3,33	
Tempo (min)	X ₀ (%)	Tempo (min)	X ₀ (%)	Tempo (min)	X ₀ (%)
0	0,000	0	0,000	0	0,000
5	1,035	5	1,761	5	1,912
10	1,275	10	2,246	10	2,634
15	1,548	15	2,665	15	2,913
20	1,620	20	2,786	20	3,007
30	1,756	30	3,080	30	3,180
40	2,259	50	3,485	40	3,435
50	2,519	70	3,742	60	3,863
70	2,771	100	3,899	80	4,201
100	3,106	130	3,981	100	4,576
130	3,390	160	4,011	120	4,673
160	3,664	190	4,304	140	4,950
190	3,684	220	4,329	160	5,014
220	3,828	250	4,357	190	5,269
250	4,150	280	4,575	220	5,598
280	4,173	310	4,686	250	5,691
310	4,192			270	5,750

APÊNDICE III – Curvas de calibração.

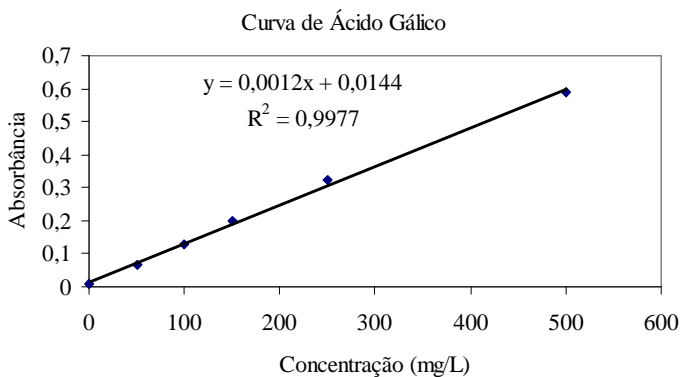


Figura 24: Curva padrão de ácido gálico utilizada na análise do conteúdo de fenólicos dos extratos de erva baleeira.

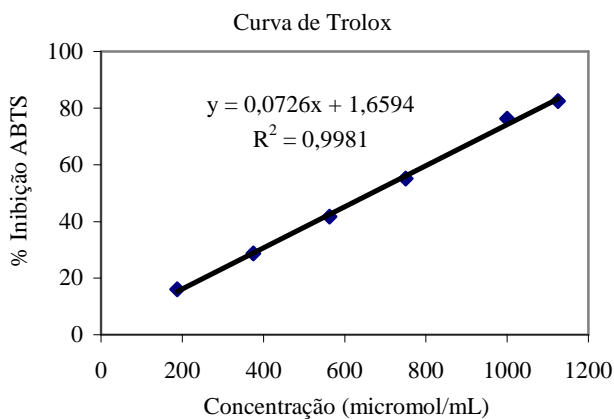


Figura 25: Curva padrão de Trolox utilizada na análise da atividade antioxidante pelo método ABTS dos extratos de erva baleeira.

APÊNDICE IV– Artigos produzidos a partir dos dados experimentais gerados neste trabalho.

Artigo 1 :

“Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods”.

Submetido ao Journal Bioresource Technology.

Artigo 2:

“High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and *trans*-caryophyllene”.

Publicado no periódico The Journal of Chemical Thermodynamics.

Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods

Eliane M. Z. Michielin^a, Ana A. Salvador^a, Carlos A. S. Riehl^b,
Artur Smânia Jr.^c, Elza. F. A. Smânia^c, Sandra R. S. Ferreira^{a, 1}

^a Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina - EQA/UFSC, C.P. 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Chemistry Institute - Federal University of Rio de Janeiro - IQ- UFRJ. C.P. 68535, CEP 21941972, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^c Microbiology and Parasitology Department, Federal University of Santa Catarina – CCB/UFSC, Brazil.

Abstract

The present study describes the chemical composition and the antibacterial activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. (Borraginaceae), a traditional medicinal plant that grows widely along the southeastern coast of Brazil. The extracts were obtained using different extraction techniques: high-pressure operations and low-pressure methods. The high-pressure technique was applied to obtain *C. verbenacea* extracts using pure CO₂ and CO₂ with co-solvent at pressures up to 30 MPa and temperatures of 30, 40 and 50°C. Organic solvents such as n-hexane, ethyl acetate, ethanol, acetone and dichloromethane were used to obtain extracts by low-pressure processes. The antibacterial activity of the extracts was also subjected to screening against four strains of bacteria using the agar dilution method. The extraction yields were up to 5.0 % w/w and up to 8.6 % w/w for supercritical fluid extraction with pure CO₂ and with ethyl acetate as co-solvent, respectively, while the low-pressure extraction indicates yields up to 24.0 % w/w in the soxhlet extraction using water and aqueous mixture with 50% ethanol as solvents. The inhibitory activity of the extracts in Gram-positive bacteria was significantly higher than in Gram-negative. The quantification and the identification of the extracts recovered were accomplished using GC/MS analysis. The most important components identified in the extract were artemetin, β-sitosterol, α-humulene and β-caryophyllene, among others.

Key-words: Supercritical fluid extraction, *C. verbenacea*, Chemical profile, Antibacterial Activity.

¹ Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 9448; fax: +55 48 3721 9687.
e-mail address: sandra@enq.ufsc.br (S.R.S. Ferreira).

1. INTRODUCTION

The bacteria resistance against the actual drugs, used in traditional therapy, caused the escalating development of new antibacterial agents present in a high number of sources such as plant materials (Eloff, 1998). In the last decades, essential oils and various plant extracts have been the focus of great interest from researchers because they represent natural resources. The potential use of these products as an alternative for the treatment of several infectious diseases has been extensively screened. Functional properties such as antimicrobial activity (antibacterial, antifungal and insecticidal) of essential oils and plant extracts are the base of its application in processed food preservation, pharmaceuticals, cosmetics, alternative medicine and natural therapies (Bakkali et al., 2008).

Cordia verbenacea D.C. is a native Brazilian medicinal plant widely distributed along the southeastern Brazilian coast and popularly known as erva baleeira. The aerial parts of this plant are used in folk medicine due to their anti-rheumatic, anti-inflammatory, analgesic and healing properties in the form of alcoholic extracts, decoctions and infusions (Sertié et al. 2005). A very promising initiative is that this plant has been recently exploited by pharmaceutical industries for the production of therapeutic products (Rosa et al. 2008).

According to Sertié et al. (1991, 2005) and Ticli et al. (2005), extracts from *C. verbenacea* exhibit important anti-inflammatory properties when administered orally or topically. Besides, an important anti-inflammatory action was attributed to artemetin, a flavone isolated from this plant (Sertié et al. 1990). Furthermore, an extract of *C. verbenacea* was found to be capable of inhibiting the growth of Gram-positive bacteria and yeast (De Carvalho et al. 2004), although extracts obtained using supercritical fluids did not exert any significant antibacterial effects against *M. tuberculosis* (Quispe-Condori et al. 2007). Passos et al. (2007) demonstrated that the essential oil of *C. verbenacea* displays noticeable oral anti-inflammatory actions in rodents, which are probably related to the presence of the sesquiterpene compounds α -humulene and β -caryophyllene, while the mechanism involved in their action was proposed by Fernandes et al. (2007).

Supercritical fluid extraction (SFE) is an alternative method commonly used for the separation of active compounds from herbs and natural products. Particularly, supercritical CO₂ is classified as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the United States - Food and Drug

Administration (U.S.-FDA, 2008) and is easily the most recognized supercritical solvent. Carbon dioxide is a non-polar compound and presents no dipole moment, which disqualifies its use as solvent for polar compounds and limits its solvent power. To overcome this disadvantage, polar co-solvents can be used to increase the overall polarity of the fluid phase during SFE. Moreover, co-solvents often enhance extractions from solid materials by disrupting the bonding between solutes and the solid matrix (Lang and Wai, 2001; Campos et al. 2008).

Besides the recognized importance of *C. verbenacea*, and to the best of our knowledge, there is a lack of studies related to the antimicrobial activity of erva baleeira extracts. Therefore, the present work has the objective to evaluate the use of various extraction methods, such as SFE with pure CO₂ and with co-solvents and low pressure extractions with solvents with different polarities, to obtain *C. verbenacea* extracts. The extracting techniques were studied in terms of process yield and product quality, represented by chemical composition and antibacterial activity of the extracts, in an attempt to seek the feasibility of the use of this alternative product as microbial control.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Raw material

The leaves of erva baleeira were collected from Barra de Ibraquera Beach, Imbituba, SC, Brazil in April, 2006. The plant authenticity was evaluated by Dr. Ana Zanin from the Botanical Department at Federal University of Santa Catarina (UFSC) and the voucher specimen was deposited at the Herbarium FLOR under number 34672 (UFSC, Florianópolis, SC, Brazil). The raw material, consisting of plant leaves, was washed and dried in oven at 45°C for 14 hours. The dried material, with moisture content of 10.5 ± 0.4 % w/w, was ground in a domestic blender (Black & Decker, SP, Brazil) and the particle size was classified with sieves. The fraction formed by mesh -20 +65 was used to set the fixed bed of particles for SFE and the low pressure extractions. The ground material was stored at -10°C prior to extraction.

2.2. Supercritical fluid extraction (SFE)

The supercritical extraction unit was used to obtain the erva baleeira oil and was previously described by Zetzel et al. (2003). The equipment contains a pressurized CO₂ reservoir, a thermostatic bath

(Microquímica – MQBTZ99-20, SC, Brazil) kept at 5°C, an air driven pump (Maximator M111, Germany) and a stainless steel jacketed column with 2 cm inner diameter, 32 cm long and 100 cm³ capacity. The extraction temperature was additionally controlled by a thermostatic bath (Microquímica – MQBTZ99-20, SC, Brazil), while the solvent flow was adjusted and monitored by high pressure valves, regulators and manometers. The high pressure equipment was modified according to Campos et al. (2008) by the insertion of a co-solvent pump (Constametric, 3200, EUA) connected to the extraction line in order to supply the modifier (organic solvent at high-pressure) at pre-established flow rate, mixture with CO₂ flow before the extraction vessel. The co-solvent pump works with flow rate from 0.01 to 9.99 mL/min. Ethanol (EtOH) and ethyl acetate (EtAc) were used as co-solvents in concentrations of 2%, 5% and 8% w/w, related to the CO₂ amount. The extracting condition for the assays with CO₂ and co-solvent was 30 MPa and 50°C, at constant flow rate of 0.30 (±0.03) kg/h. The process used 99.9% CO₂ (purity) delivered at a pressure up to 6 MPa (White Martins, Brazil). The experimental procedure, described by Michielin et al. (2005), consisted of using 20 g of ground particles to form the fixed bed for the high-pressure extractions. Samples were collected at 4 h extraction time and weighed in an analytical balance. The assays of SFE with CO₂ (without co-solvent) followed complete factorial design with two factors (temperature and pressure) and three levels (30, 40, 50°C and 10, 20, 30MPa), at constant at a flow rate of 0.30 (±0.03) kg CO₂/h, with replication.

2.3. Soxhlet Extraction (SE)

The extraction of soluble compounds from *C. verbenacea* by the soxhlet method was performed using water, acetone (ACE), ethanol (EtOH), ethyl acetate (EtAc), dichlormethane (DCM) and hexane (Hx) as solvents, in decreasing order of polarity. Aqueous solutions of 25% and 50% (v/v) of EtOH:water ratio were also used. The soxhlet procedure consisted of ground erva baleeira samples (5.0 g) placed inside a thimble loaded into the soxhlet extractor. The total extracting time was 6 h, and the total amount of solvent was 150 mL maintained continuously refluxing over the sample. The solvent assays were performed at solvent boiling temperature. After the extraction the solvent was removed from the solute mixture by reduced pressure with rotary evaporator (Fisatom, model 802, São Paulo, Brazil).

2.4. Classical organic solvent extraction (COSE)

Classical organic solvent extraction (COSE) was also employed to obtain extracts of *erva baleeira*. COSE method consists in a cold maceration of the ground particles to avoid thermal degradation. The extraction was performed with 100 g of dried sample material placed in ethanol for five days. The resulting extract was evaporated at reduced pressure to obtain a crude extract defined as the ethanolic extract. Then, the CE was partitioned with Hx, DCM and EtAc using 40 mL each (Kitzberger et al. 2007). The organic solvents used for soxhlet and COSE procedures were 99% pure (CAQ Ind. & Com., SP, Brazil).

2.5. Hydro-distillation (HD)

The essential oil of the *C. verbenacea* aerial parts (fresh leaves) was extracted using a Clevenger apparatus by the hydro-distillation technique. The extraction was performed using 50 g of ground samples placed inside the apparatus submerged in 800 ml of distilled water and distilled for 6 h. The HD assays were performed in triplicate. After extraction, the volume of essential oil obtained in extractions was measured and the essential oil was conditioned in hermetically sealed glass, covered with aluminum foil to protect the contents from light and stored at -10°C. The oil samples obtained for all extractions methods were storage following the above conditions in order to maintain sample integrity for quality evaluation (extract composition and antimicrobial activity).

2.6. Statistical Analysis

The extraction yields obtained by the low pressure and the high pressure methods (soxhlet, COSE, HD and SFE with CO₂ and with CO₂/co-solvent) were evaluated separately by analysis of variance (ANOVA) at 5% level of significance. The software STATISTICA for Windows (version 6.0 - Statsoft Inc., USA) was used to identify significant differences. The Tukey test was used to detect differences among treatments. The standard deviation of the yield results was also determined.

2.7. Characterization of the extracts

The main components of *C. verbenacea* extract, related to the lipophilic composition, were identified and quantified by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS) analysis at the Chemistry Institute from Federal University of Rio de Janeiro

(UFRJ, R.J., Brazil). The analysis were performed using GC-MS/MS (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L), column Zebron ZB-5HT (30 m x 0.25 mm, 0.10 μm) (Phenomenex, Torrance, CA). The GC analyses were performed using split-mode injection with split rate of 1:10. The injector temperature was 300°C. The flow rate for the carrier gas (helium) was 1 mL/min. The initial column temperature was 50°C, held for 1min, heating rate of 6°C/min up to 300°C and held for 5 min. The mass spectrum was acquired at Electron Impact (EI) mode at 70eV, and the range of mass was from 40 to 70 m/z.

The extract components were evaluated using the database for natural products Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology (NIST - Mass-Spectral Library with Windows search program – Version 2), where the mass spectrometer results were compared. The solute samples evaluated in chromatographic analysis were: supercritical extracts obtained with CO₂ at different operational conditions (solvent density) and with CO₂/co-solvent and soxhlet extracts.

Because in gas chromatography the polar components move slower than the non polar compounds, this analytical method is preferred for detecting non-polar substances. Therefore, GC method is adequate to characterize extracts obtained by supercritical CO₂ (a non polar solvent) and, as a consequence, verify the importance of this extraction procedure to obtain valuable substances present in the erva baleeira material.

2.8. Antimicrobial activity

2.8.1. Microbial strains

The erva baleeira extracts obtained by SFE (with CO₂ and with CO₂/co-solvent), by soxhlet and by COSE, were submitted for evaluation of antimicrobial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 (American Type Culture Collection) and *Bacillus cereus*, ATCC 11778 and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Mueller-Hinton agar and culture broth were used for growing the bacteria. An overnight culture of each bacterial species grown in Mueller-Hinton broth was diluted in fresh medium to achieve a final concentration of approximately 10⁸ CFU/mL. All bacterial cultures were incubated in aerobic conditions as described by Smânia et al. (1995).

2.8.2. Agar diffusion method (ADM)

The ADM was performed using cotton swabs for each bacterial suspension (10^8 CFU/mL) and inoculated onto plates where the bacteria were spread uniformly on the agar surface. The agar surface was perforated with 7 mm diameter holes, aseptically cut and filled with the various *C. verbenacea* extracts tested: SFE with CO₂, SFE with CO₂/co-solvent, soxhlet and COSE with different solvents. The extracts were used at concentration of 10 mg extract/mL of DMSO (dimethyl sulphoxide) because DMSO does not offer inhibition to the microorganism growth, as presented by Smânia et al. (1999). The plates were incubated at 36°C for 18 h and then examined in order to verify the inhibition. A positive result was defined as an inhibition zone (halo size) of 9 mm or more appearing around the holes, indicating therefore the presence of antibacterial substance, or group of substances, present in the extracts tested (Smânia et al. 1999; Kitzberger et al. 2007).

2.8.3. Minimum inhibition concentration (MIC)

The antimicrobial activity of different extracts of *C. verbenacea* was evaluated through the determination of the minimum inhibition concentration (MIC) by the microdilution method in culture broth (Smânia et al. 1999). The erva baleeira extracts that present inhibition zone (halo size of 9 mm or more) in the ADM were dissolved in 200 µL of DMSO and added to 1800 µL of Mueller-Hinton broth to a concentration of 4mg/mL. Further, serial dilutions of the extracts were performed to reach a final concentration range between 4000 to 7.8 µg/mL. One sample (100 µL) of each diluted solution and the samples for both growth and sterility controls (containing sterile culture medium and DMSO, and no antimicrobial agents, respectively) were distributed in the microdilution plates with 96 wells. For each test and for the growth control well, a 5 µL inoculum of the bacterial suspension (5×10^7 CFU/mL) was added. Tetracycline was used to assess the MIC values of the reference strains. All experiments were performed in duplicate and the plates incubated for 18 h at 36°C. Bacterial growth was first detected by optical density (ELISA reader, CLX800 – Biotek Instruments) and afterwards by addition of 20 µL of an alcoholic solution (0.5 mg/mL) of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchloride (INT) (SIGMA). The plates were again incubated at 36 °C for 3 h, and in those wells where bacterial growth occurred, INT changed from yellow to purple. Any remaining yellow color indicated absence of growth. The MIC was considered the lower concentration of the substance that

inhibited the bacterial growth, after the incubation period. The results were expressed in $\mu\text{g/mL}$ (Smânia et al. 1999, Kitzberger et al. 2007).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction yield

The yield results obtained for the different extraction methods and solvents (Soxhlet, COSE, HD and SFE) are presented in Table 1, together with the polarity index and the solvent density for SFE. Table 1 also compares the yield results from this work with literature data for erva baleeira oil extraction, obtained by Passos et al. (2007) and by Quispe-Condori et al. (2007).

The results for soxhlet extraction with Hx, DCM, EtAc, EtOH and ACE, presented in Table 1, show no significant difference at level of 5%, according to Tukey test. Besides, yield values for water and 50% EtOH:water solution are the highest values (24% w/w), with significant difference from other solvent results. This behavior is an indication that *Cordia verbenacea* contains high amount of components with polar characteristic. According to Barwick, (1997) and Markom et al. (2007), water presents high polarity index, dielectric constant and cohesive energy, if compared with other solvents, which provides strong bounding between water molecules and polar compounds from the solute, causing their dissolution. Also, soxhlet method showed the highest yield values (from 10 ± 1 to 24 ± 3 % w/w), compared with COSE, HD and SFE (from 0.6 ± 0.1 to 8.6 ± 0.3 % w/w). This behavior is probably due to the high temperature, solvent recirculation and solute-solvent interactions found in soxhlet extraction method.

The yield obtained by Hx in COSE, a non polar solvent, was 4.3 %. This value is similar to SFE with pure CO_2 , also a non polar solvent. From Tukey test, the fractions Hx and DCM were significantly different at level of 5%, while the fractions EtAc and water did not present significant difference between each other.

The HD yield was 0.9 % (w/w), lower than most other results, but similar to COSE fractions with Hx and DCM. This behavior was already expected because HD method is indicated for essential oil extraction, while other techniques solubilize different components, as discussed in section 3.4. The same performance was detected by Quispe-Condori et al. (2007) and Passos et al. (2007).

The SFE yield data (wet basis), for the different conditions studied, are also presented in Table 1, together with the solvent density

values obtained according to Angus et al. (1976). The results for SFE with CO₂ indicate the maximum yield of 5.0 ± 0.2 % (w/w) obtained at 30 MPa and 50°C, with solvent density of 0.871 g/cm^3 , while the lowest one was 2.2 ± 0.3 % (w/w) at 10 MPa and 50°C, with solvent density of 0.385 g/cm^3 . The extraction yield increases with pressure at constant temperature for the three isotherms studied (30, 40 and 50°C), probably due to the increase in the CO₂ density and consequently in the solvent power.

The temperature effect, however, is more complex. At 10 MPa, the enhancement in the extraction temperature produces a decrease in the yield, due to the reduction in solvent density from 0.772 to 0.385 kg/m^3 . On the other hand, at higher pressures, the increase in temperature enhances the yield because of the enlargement in solute (erva baleeira extract) vapor pressure with temperature. These opposite effects taking place on extraction yields were responsible for the inversion of the yield isotherms. Therefore, with the purpose to identify the crossover pressure for the system studied, the data from Table 1 are represented in Figure 1, where the experimental points are connected to detect the inversion of the isotherms. The crossover pressure was, therefore, identified between 14 and 15 MPa, for all isotherms. This result is an indication of a crossover pattern for the conditions studied. Consequently, we suggest that below crossover pressure, the density effect is dominant, while above this condition the solute vapor pressure is the leading mechanism affecting the extraction process. Similar behavior was also detected by several authors for different solid matrixes (Michielin et al. 2005; Danielski et al. 2007; Kitzberger et al. 2007).

The analysis of variance for the SFE with CO₂ indicates that the pressure effect and the interaction between pressure and temperature effect were significant at level of 5% ($p < 0.05$) for the *C. verbenacea* extraction yield. Otherwise, the temperature effect was not significant ($p = 0.116$) on yield results, probably because of the opposing influence of temperature.

The effect of different concentrations of modifiers EtAc and EtOH in the extraction yield was also investigated for SFE at 50°C and 30MPa. Results from Table 1 show an increase in yield up to 72% compared with pure CO₂, reaching the value of 8.6% (w/w) for extraction using 5% EtAc. This behavior is due to the increase in the number of soluble components in the mixture, reducing the selectivity and enhancing the yield. It is also relevant that EtOH and EtAc are

GRAS solvents that represent a positive contribution to the extraction yield when added to the supercritical CO₂ (Pacifichelth, 2008).

The influence of co-solvent concentration is observed in Figure 2 for both modifiers studied. The concentrations of 2, 5 and 8% (w/w), of EtOH and EtAc related to CO₂ amount, were evaluated in terms of extraction yield for SFE at 50°C and 30MPa. The use of co-solvent increases yield with raising concentration up to 5% (w/w) and then decreases with 8% (w/w) of co-solvent. The expanding amount of co-solvent (8%), enhances the solute/co-solvent bond, reducing the interactions with CO₂, and therefore decreasing the yield. Therefore, 5% (w/w) is the maximum co-solvent concentration which increases yield, due to rupture in solute/solid matrix interactions, and consequent substitution with co-solvent molecules in solid active sites (Hollender et al., 1997). This behavior was also discussed by Campos et al. (2008), during grape pomace extraction by means of CO₂/EtOH mixtures, and by Kitzberger et al. (2007), for shiitake oil extraction. The variance analysis of the yield results for co-solvent extractions shows significant difference only between 2 and 5% (w/w) of EtAc concentrations ($p = 0.015$).

3.2. Chemical composition of the extracts

According to Sertié et al. (1990, 1991), phytochemical screening of an ethanolic extract of *erva baleeira* leaves showed different flavonoid substances (quercetin, artemetin and hydroxyl-artemetin), mucilage, tannins, cordialin and essential oils. The main components of the essential oil are α -pinene, β -felandrene, citronelol acetate, β -elemene, β -caryophyllene, β -gurjunene, α -humulene, δ -cadinene, aloaromadendrene, bicyclogermacrene, spatulenol and epoxyariophyllene (De Carvalho et al. 2004).

A chromatogram from the GC-MS analysis of the *erva baleeira* extract, obtained by SFE at 50°C and 30 MPa (this work), is presented in Figure 3. The peak numbers of the major components are also showed in Figure 3. A total of eighty-two components, from different classes, were separated and identified by GC-MS analysis for the various extracts of *C. verbenacea* studied. The composition results are presented in Table 2, with the name of the compounds and the relative composition (integrated composition) for the following extracts: (1) SFE with 5% EtOH at 50°C and 30 MPa; (2) SFE with 5% EtAc at 50°C and 30 MPa, (3) SFE with CO₂ at 50°C and 30 MPa, (4) SFE with CO₂ at 30°C and 10 MPa; (5) soxhlet with EtOH and (6) soxhlet with EtAc.

The major identified components from the terpene family, in terms of % area peak, are: (1) α -curcumene, (2) calamenene, (13) aromadendrene, (18) α -sesquiphellandrene and (24) spathulenol. Other important substances also detected in most extracts are α -humulene, β -caryophyllene, caryophyllene oxide, lupeol and artemetin.

The results from Table 2 show the presence of lupeol, a pentacyclic triterpene with several bioactivities like strong antioxidant potential and antimutagenic, anti-inflammatory and antiarthritic effects in vitro and in vivo (Nagaraj et al. 2000, Geetha et al. 2001). The sesquiterpene β -caryophyllene presents anticarcinogenic and anti-inflammatory activities (Zheng et al. 1992), while spathulenol and β -caryophyllene oxide contain antibacterial properties (Limberger et al. 2004, Veiga and Pinto, 2002).

The sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene are important components extensively studied in the literature. According to Passos et al. (2007) and Fernandes et al. (2007) the anti-inflammatory activity attributed to erva baleeira extracts are due to the presence of those compounds. Therefore, because of the allegedly vital action of these two sesquiterpenes, Michielin et al. (2008) evaluated the phase behavior of a ternary system containing α -humulene, β -caryophyllene and CO₂, an information necessary for the fractionation of erva baleeira extract.

Other important substances were detected in erva baleeira extracts, such as the flavonoid artemetin. The artemetin presents important anti-inflammatory action and was firstly isolated and identified in *C. verbenacea* by Sertié et al. (1990). The component β -Sitosterol, extracted by SFE at 30 MPa or by soxhlet with EtAc, is a phytosterol used for therapeutic treatment of several diseases such as atherosclerosis, benign prostatic cancer and colon cancer (Nair et al. 2006, Yokota et al. 2006).

The extract obtained by SFE with CO₂ at 50°C and 30MPa presented 52 identified compounds, while the extracts by SFE with 5% of EtOH and 5% EtAc presented 26 and 29 identified components, respectively. It is well known that the use of co-solvent in SFE reduces the process selectivity, but the above result is contradictory (Reverchon and De Marco, 2006). A possible explanation for this performance came from the GC characteristic, where non polar substances are firstly detected over polar ones. Then, we suggest that although reducing the number of components from Table 2, the co-solvents affect selectivity by increasing the extraction of polar substances, not detected by GC-MS

analyses. This behavior is corroborated by the chemical profile of the soxhlet extracts, which provided 17 and 43 identified components for the extracts obtained by EtOH and EtAc, respectively. Therefore, different methods could detect other substances, not observed by the GC analysis performed, evidencing the reduction of process selectivity. Results from Table 2 also show an increase in the number of identified components with increasing extracting pressure in SFE with CO₂.

Additionally, *C. verbenacea* extracts contain high relative amount of oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes, which, according to Kotan et al. (2007), are the main responsible for antibacterial activity. Besides that, it is important to consider synergistic or antagonistic effects from the different components present in natural extract in order to define their efficiency for bacteria inhibition (Alvarez-Castellanos et al. 2001).

A very important group of components present in erva baleeira extracts is the flavonoid fraction, which confers high quality characteristics to this plant. This fraction is well represented by the component artemetin, detected in supercritical and in soxhlet extracts. The relative composition of artemetin was higher in soxhlet EtOH (10.14%). This result was probably caused by the presence of others high polar substances, not evidenced by the GC method used in this analysis, which increases the relative concentration of the detected compounds. Nevertheless, supercritical extracts also present a significant concentration of the compounds from flavonoid fraction, qualifying the supercritical technology to obtain high valuable extracts from *Cordia verbenacea*.

3.3. Antibacterial activity

3.3.1 Agar diffusion method (ADM)

Although the ADM should not be recommended to quantify the antimicrobial activity of a substance based on the size of the inhibition zone, this method is sensitive to detect microbial growth and presents a qualitative character (Rios et al. 1988). Therefore, several *C. verbenacea* extracts were tested in ADM in order to provide indication for further detection of MIC, as proposed by Kitzberger et al. (2007).

Samples of supercritical extracts obtained at different conditions, SFE with 5% of EtAc and 5% EtOH as co-solvent, soxhlet and COSE extracts were tested against the bacteria *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* by the ADM.

Table 3 shows the results of agar diffusion assays in terms of size of inhibition zone (mm) for the extracts tested against the studied microorganisms. All the tested extracts were more effective against the Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*), compared to the results for the Gram-negative ones (*E. coli* and *P. aeruginosa*). The same behavior was detected by Kitzberger et al. (2007) and Boussaada et al. (2008) when studying extracts from other raw materials. The higher resistance of the Gram-negative bacteria could be due to the complexity of the cell wall of this group of microorganisms. Indeed, the external membrane of Gram-negative bacteria renders highly hydrophilic surfaces (Smith-Palmer et al. 1998) whereas the negative charge of the surface of the Gram-positive wall may reduce their resistance to antibacterial compounds (Ultee et al. 1999).

The results from Table 3 show the importance of *C. verbenacea* as a source of antibacterial components, especially against Gram-positive bacteria and independent of extraction method used. From the microorganisms studied in this work, the *E. coli* was the most resistant one, because only four soxhlet extracts with inhibition zone were observed: 25% EtOH, water, hexane and EtAc. The ADM results were 16, 12, 11 and 12 mm, respectively. In general, the soxhlet extraction with aqueous solution with 25% EtOH was effective (halo size higher than 9 mm) against all bacteria tested by ADM.

The supercritical extract obtained at 40°C and 20 MPa was the most efficient against the growth of *S. aureus*, with an inhibition zone of 31 mm, and all extracts tested showed antimicrobial activity by ADM against *S. aureus*. The antimicrobial analysis indicates higher efficiency of the supercritical extracts compared to COSE for all microorganisms and was as effective as soxhlet extracts except against *E. coli*. Therefore, the results point toward the use of SFE and soxhlet extraction to obtain erva baleeira extracts with antimicrobial activity against different microorganisms.

Because the ADM is a qualitative and not a quantitative method, there is not a direct relation between halo size and antibacterial potential. Therefore, further evaluation of the extracts behavior was conducted to detect the MIC values for the extracts against the bacteria strains studied in this work.

3.3.2. Minimum inhibition concentration (MIC)

The *C. verbenacea* extracts that showed suitable results in ADM, (above 9 mm halo size) were selected for the test of

microdilution in culture broth. The MIC results and standard error of the means are presented in Table 4.

In general there is not an agreement on the acceptable inhibition level of plant materials when compared with standards. Although, according to Duarte et al. (2007), Wang et al. (2008), and Sartoratto et al. (2004), plant materials can be classified as antimicrobial agent based on the MIC values of its extracts. This classification is: strong inhibitors for MIC lower than 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; moderate inhibitors for MIC between 600 and 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; weak inhibitors for MIC above 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This classification is very useful to detect the potential of various plant materials with biological activity.

The supercritical extracts obtained with CO_2 at 30°C and 30MPa and with 5% EtAc and 5% EtOH (at 50°C and 30MPa) showed the lower MIC values against *B. cereus*, reaching 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These low MIC values designate the SFE as the best method to obtain extremely strong inhibitors of *B. cereus* from *C. verbenacea*. Moreover, by reducing the CO_2 density (enhancing temperature and decreasing pressure) the MIC value against *B. cereus* increases, indicating that the antimicrobial potential enhances at higher solvent power.

The lowest MIC results for *S. aureus* were obtained by the supercritical extracts with co-solvents (EtAc and EtOH) and by COSE with EtAc, with value of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the bacteria *P. aeruginosa* the most effective extracts were: SFE with 5% EtOH, Sx with 25% EtOH and Sx with water, with similar MIC value of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The above results designate the SFE as a powerful technology to obtain antimicrobial components from *C. verbenacea*, for several microorganism strains.

Duarte et al. (2007) studying the antimicrobial action of the essential oil obtained by water-distillation of *C. verbenacea* against 13 different serotypes of *E. coli*, show that the extracts tested were not effective against this microorganism, due to the MIC values higher than 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. They also evaluated the performance of a commercial sample of β -caryophyllene against two serotypes of *E. coli*, obtaining the same behavior (MIC > 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Therefore, the β -caryophyllene, identified by Passos et al. (2007) as one of the main responsible for the anti-inflammatory activity of this plant, does not contribute to its activity against *E. coli*.

The antibacterial potential presented by *C. verbenacea* can be attributed to the presence of the aromatic compounds from its extracts. According to Lis-Balchin et al. (1998), aromatic compounds, especially eugenol, are well known by its important antibacterial activity. This component was detected in SFE with 5% EtOH, as presented in Table 2.

Boussaada et al. (2008) suspected that the antibacterial properties of plants extracts are associated with the high content of oxygenated sesquiterpenes, especially bisabolol and farnesyl acetate which are effective against Gram-positive bacteria. Both components were detected in this work only in SFE extracts, as presented in Table 2.

It has been shown that bisabolol has a synergistic effect with eugenol (Pauli, 2001). Therefore, bacteriostatic activity can be related to the chemical profile of the extracts by considering the presence of the substances, the ratio between components and also their interactions (Lis-Balchin et al. 1998, Boussaada et al. 2008). Then taking into account the different groups of chemical compounds present in *C. verbenacea* extracts, the antimicrobial activity is most likely attributable to bisabolol, eugenol and viridiflor, among other essential oil components.

The antimicrobial analysis of the *C. verbenacea* extracts show that the supercritical extracts were in general the most effective ones against Gram-positive bacteria, if compared to low pressure extraction (soxhlet and COSE). Therefore, the results point toward the use of SFE to obtain erva baleeira extracts with antimicrobial activity against different microorganisms according to the extracting conditions used.

CONCLUSION

This study shows that *Cordia verbenacea* presents very strong antibacterial activity, validating the use of several extracts of this plant as antimicrobial agent. Supercritical extracts were very effective against the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *B. cereus*, with especial attention to the extract obtained by pure CO₂ at 30°C and 30 MPa. The use of co-solvent in SFE (EtOH and EtAc) not only increases the process yield, compared with CO₂ extraction, but also produced extracts with strong microbial inhibitors. Besides the antimicrobial aspects, the results from this work show the importance of SFE to obtain important functional compounds such as β -caryophyllene, α -humulene, spathulenol, β -sitosterol and eugenol from erva baleeira, increasing the extract value. The soxhlet method presented the highest yield with the only extracts that contain activity against *E. coli*. Although, it is

important to evaluate the amount of solvent used and the energy consumption for solvent separation, compared with extracts by supercritical method. Finally, *Cordia verbenacea* extracts obtained by means of different techniques presented large diversity of chemical groups with allegedly biological activity, like lupeol, bisabolol, farnesyl acetate and artemetin. These aspects place this study as an essential start point for the screening of this important plant material.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge CAPES for the financial support of this research.

REFERENCES

- Alvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobos, M.J., 2001. Antifungal activity of the essential oils of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57, 99-102.
- Angus, S., Armstrong, B., De Reuck, K. M., 1976. International thermodynamic tables of the fluid state carbon dioxide.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. 2008. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46(2): 446-475.
- Barwick, V.J., 1997. Strategies for solvent selection - a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, (6), 293-309.
- Boussaada, O., Ammar, S., Saidana, D., Chriaa, J., Chraif, I., Daami, M., Helal, A. N., Mighri, Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiological Research*, 163, 87-95.
- Campos, L.M.A.S., Leimann, F.V., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S., 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99, 8413-8420.
- Danielski, L., Campos, L. M.A.S., Bresciani, L. F.V., Hense, H., Yunes, R. A., Ferreira, S. R.S., 2007. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 99-106.
- De Carvalho Jr., P.M., Rodrigues, R.F.O., Sawaya, A.C.H.F., Marques, M.O.M., Shimizu, M. T., 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D. C. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 297-301.

- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 197-201.
- Eloff, J.N., 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60, 1-8.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., Cunha, F.M., Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski L.F., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal Pharmacology*, 569, 228-236.
- Geetha, T, Varalakshmi, P., 2001. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol*, 76, 77-80.
- Hollender, J., Shneine, J., Dott, W., Heinzl, M., Hagemann, H.W., Gotz, G.K.E., 1997. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. *Journal of Chromatography*, 776, 233-243.
- Kitzberger, C.S.G., Smânia Jr, A., Pedrosa, R.C., Ferreira, S.R.S., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 80, 631-638,
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch*, 62c, p. 507-513.
- Lang, Q.; Wai, C. M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review. *Talanta*, 53, 771-782.
- Limberger, R.P., Sobral, M., Henriques, A.T., Menut, C., Bessi ere, Jean-Marie., 2004.  leos vol ateis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, 27, n. 6, p. 916-919, São Paulo.
- Lis-Balchin M, Deans Sg, Eaglesham E., 1998, Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 98-104.
- Markom, M., Hasan, M., Daud, W. R. W., Singh, H., Jahim, J. Md., 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.:Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52, 487-496.
- Michielin, E. M. Z., Bresciani, L. F. V., Danielski, L., Yunes, R. A., Ferreira, S. R. S., 2005. Composition profile of horsetail

- (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 33, 131-138.
- Michielin, E. M. Z., Rosso, S. R., Franceschi, E., Borges, G. R., Corazza, M. L., Oliveira, J. V., Ferreira, S.R. S., 2008. High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α -humulene and *trans*-caryophyllene. *Journal of Chemical Thermodynamics*, In Press.
- Nagaraj, M., Sunitha, S., Varalakshmi, P., 2000. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on the lipid peroxidation and antioxidant status in rat kidney after chronic cadmium exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 20, 413-7.
- Nair, V.D.P., Kanfer, I., Hoogmartens, J., 2006. Determination of stigmasterol β -Sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 731-737.
- Pacifichelth - Pacific Health Sciences, October. Available at: http://www.pacifichealth.com/gras_list.htm. Accessed - October, 13, 2008.
- Passos, G. F., Fernades, E. S., Cunha, F. M. Da, Ferreira, J., Pianowski, L. F., Campos, M. M., Calixto, J. B., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 323-333.
- Pauli A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromather.* 11 (3), 126-33.
- Quispe-Condori, S., Rosa, P.T. V., Sato, D. N., Carvalho, J. E., Foglio, M. A., Meireles, M. A. A., 2007. Global yield of the Supercritical CO₂ extraction from *Cordia verbenacea* DC - Anticancer and antimycobacterial activities. *Pharmacy Magazine*, 3, I. 9.
- Reverchon, E.; De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
- Rios, J. L., Recio, M. C., Viller, A., 1988. Screening as methods for natural products with antimicrobial activity: Review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127-149.
- Rosa, D.D., Basseto, M.A., Feliciano, F., Neves, M.B., Baldin, E.L.L., 2008. Occurrence of *Dictyla monotropidia* Stål (Hemiptera: Tingidae) on *Cordia verbenacea* Al. DC in Brazil. *Neotrop. entomol.* 37, no.2, 236-238.

- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, n.4, 1517-8382.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Medica*, 56, 36-40.
- Sertié, J.A.A., Basile, A.C., Panizza, S., Oshiro, T.T., Azzolini, C.P., Penna, S., 1991. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: Oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 239-247.
- Sertié, J.A.A., Woisky, R. G., Wiezel, G., Rodrigues, M., 2005. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine*, 12, 338-344.
- Smânia, A., Jr., Delle Monache, F., Smânia, E. F. A., Cuneo, R. S., 1999. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) fruit body. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 325-330.
- Smânia, A., Jr., Monache, F. D., Smânia, E. F., Gil, M. L., Benchetrit, L. C., Cruz, F. S., 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, Inglaterra, 45, 177-181.
- Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118-22.
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon.*, 46, 318-327.
- Ultee A, Kets Epw, Smid Ej., 1999. Mechanisms of actions of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610.
- US-FDA. United States - Food and Drug Administration. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1240>. Accessed - October, 13, 2008.

- Wang, Yun-Song., He, Hong-Pin, Yang, Jing-Hua, Di, Ying-Tong, Hao, Xiao-Jiang, 2008. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*, 13, 931-937, ISSN 1420-3049.
- Zheng, G.Q., Kenney, P.M., Lam, L.K.T., 1992. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia-caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, 55, n.7, 999-1003.
- Zetzel, C., Meireles, M. A. A., Brunner, G. 2003. Standardized Low-cost batch SFE-Units for University Education and Comparative Research. *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*. Versailles, France.
- Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onagawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y., 2006. Scavenging of reactive oxygen species by *Eriobotrya japonica* seed extract. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 467-471.

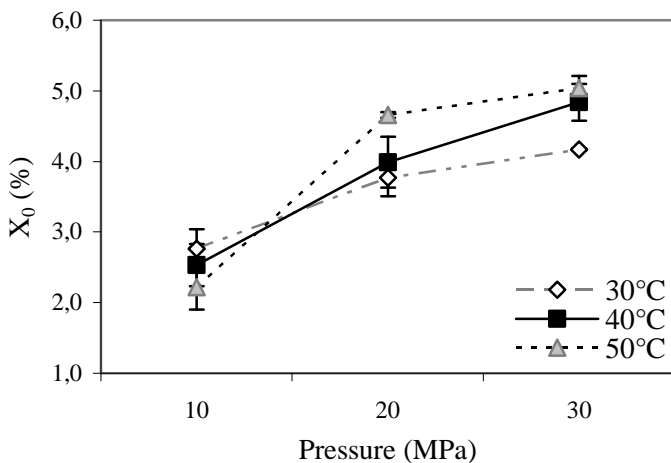


Figure 1 - Yield isotherms of SFE of *C. verbenacea*. The experimental points are connected to evidence the isotherms crossover.

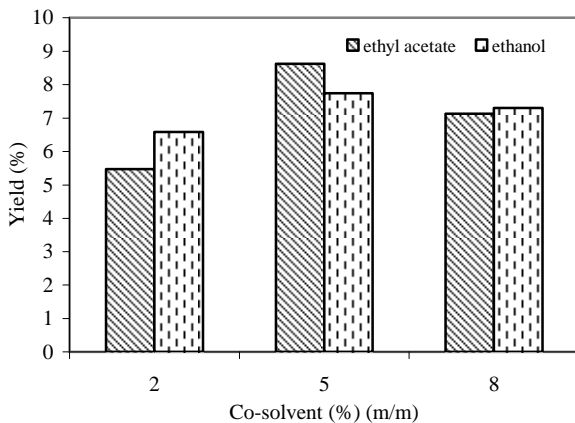


Figure 2- Effect of co-solvent concentration in extraction yield of *C. verbenacea*.

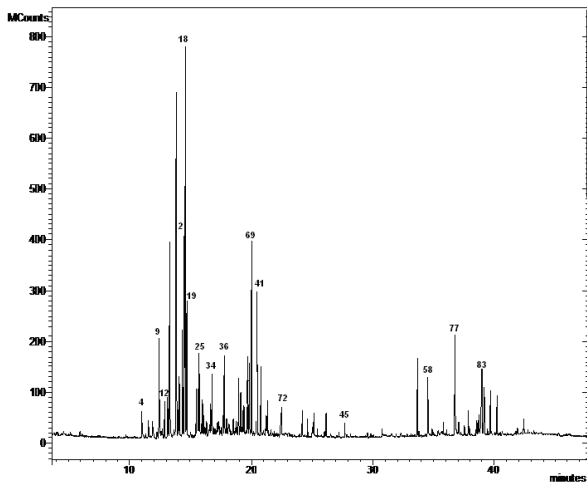


Figure 3. GC-MS of extract *erva baleeira* obtained of supercritical pure CO₂ at 50°C and 30 MPa.

Table 1. Yield results for *C. verbenacea* extraction at different methods and solvents.

Extraction Method	SPI ⁽¹⁾	Extract yield (% g/g sample)	
		This work ⁽²⁾	Literature
Soxhlet Extraction⁽³⁾			
Hx	0.00	14.9 ± 0.4 ^{ad}	
DCM	3.40	12 ± 2 ^{ad}	
EtAc	4.30	14.8 ± 0.5 ^{ad}	
EtOH	5.20	14.2 ± 0.1 ^{ad}	8.13 ⁽⁶⁾
ACE	5.40	10 ± 1 ^a	
EtOH 50%	7.10	24 ± 3 ^{ce}	
EtOH 25%	8.05	15 ± 2 ^d	
Water	9.00	24 ± 2 ^{be}	
COSE			
Hx	0.00	4.30 ± 0.3 ^a	
DCM	3.40	2.69 ± 0.07 ^b	
EtAc	4.30	0.26 ± 0.01 ^c	
Water	9.00	0.6 ± 0.1 ^c	
Hydrodistillation		0.9 ± 0.2	1.1 ⁽⁵⁾ ; 0.55 ⁽⁶⁾
SFE with CO₂	ρ_{CO2}(g/cm³)⁽⁴⁾		
30°C/10 MPa	0.772	2.8 ± 0.3	1.60 ⁽⁶⁾
30°C/20 MPa	0.890	3.8 ± 0.3	
30°C/30 MPa	0.948	4.2 ± 0.1	2.87 ⁽⁶⁾
40°C/10 MPa	0.629	2.5 ± 0.3	
40°C/20 MPa	0.840	3.9 ± 0.4	3.35 ⁽⁶⁾
40°C/30 MPa	0.911	4.8 ± 0.3	
50°C/10 MPa	0.385	2.2 ± 0.3	0.47 ⁽⁶⁾
50°C/20 MPa	0.785	4.5 ± 0.2	
50°C/30 MPa	0.871	5.0 ± 0.2	4.25 ⁽⁶⁾
SFE: CO₂ + Co-solvent⁽⁷⁾			
2% EtAc	0.871	5.4 ± 0.1	
5% EtAc	0.872	8.6 ± 0.3	
8% EtAc	0.873	7.1 ± 0.2	
2% EtOH	0.869	6.5 ± 0.3	
5% EtOH	0.866	7.7 ± 0.2	
8% EtOH	0.864	7.3 ± 0.1	

¹ SPI: Solvent polarity index according to Gu *et al.* 2004. SPI for aqueous solutions was calculated by $(IA/100 \times PA) + (IB/100 \times PB)$, where *IA* and *IB* are polarity index of solvents A and B respectively, *PA* and *PB* the percentage of solvents A and B respectively (Markom *et al.* 2007).

²Data are expressed as mean value \pm standard deviation (SD).

³ Soxhlet: results with same letters are not significantly different (Tukey test at $P < 0.05$).

⁴CO₂ density by ANGUS et al. (1976).

⁵ Passos et al. 2007.

⁶ Quispe-Condori et al. 2007.

⁷ Extraction performed at 50°C and 30 MPa.

Table 3- Antibacterial activity of the *C. verbenacea* extracts, by ADM.

Extract	Extract	ADM ^a (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	CO ₂ 10 MPa/30 °C	09	11	00	12
2	CO ₂ 10 MPa/40 °C	15	12	00	00
3	CO ₂ 10 MPa/50 °C	15	15	00	11
4	CO ₂ 20 MPa/30 °C	15	13	00	00
5	CO ₂ 20 MPa/40 °C	31	12	00	00
6	CO ₂ 20 MPa/50 °C	15	13	00	00
7	CO ₂ 30 MPa/30 °C	16	13	00	11
8	CO ₂ 30 MPa/40 °C	15	13	00	10
9	CO ₂ 30 MPa/50 °C	17	11	00	00
10	CO ₂ + 5% EtAc	17	14	00	10
11	CO ₂ + 5% EtOH	15	12	00	09
12	COSE EtAc	19	16	00	11
13	COSE Hx	18	23	00	09
14	COSE Water	20	13	00	00
15	COSE DCM	19	14	00	00
16	Soxhlet 25% EtOH	25	15	16	21
17	Soxhlet 50% EtOH	18	11	00	00
18	Soxhlet EtOH	16	13	00	00
19	Soxhlet Water	20	10	12	16
20	Soxhlet Acetone	15	13	00	00
21	Soxhlet DCM	18	14	00	00
22	Soxhlet Hx	15	13	11	12
23	Soxhlet EtAc	21	16	12	00

^a ADM: agar diffusion method. Diameter of inhibition zone (mm).

Table 4. MIC values and standard error of the means of *C. verbenacea* determined by the microdilution method.

Extract	Extraction method	MIC ^b ± SEM(µg/mL)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
3	CO ₂ 10 MPa/50 °C	1000	125	NT	>4000
5	CO ₂ 20 MPa/40 °C	500	46±22	NT	NT
7	CO ₂ 30 MPa/30 °C	375±176	<7.8	NT	>4000
10	CO ₂ + 5% EtAc	250	15.6	NT	>4000
11	CO ₂ + 5% EtOH	250	31.25	NT	1000
12	COSE EtAc	250	46±22	NT	1500±707
16	Soxhlet 25% EtOH	2000	1000	2000	1000
19	Soxhlet Water	2000	2000	2000	1000
22	Soxhlet Hx	NT	NT	2000	>4000
23	Soxhlet EtAc	500	46±22	2000	NT

^b MIC: minimum inhibitory concentration (µg/mL).

NT: non-tested.

APÊNDICE V- Cromatogramas dos extratos de erva baleeira.

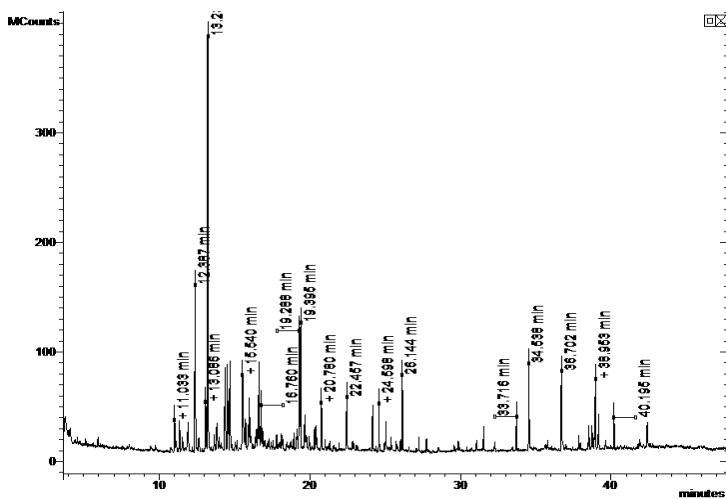


Figura 26: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC com CO_2 + 5% de etanol como co-solvente.

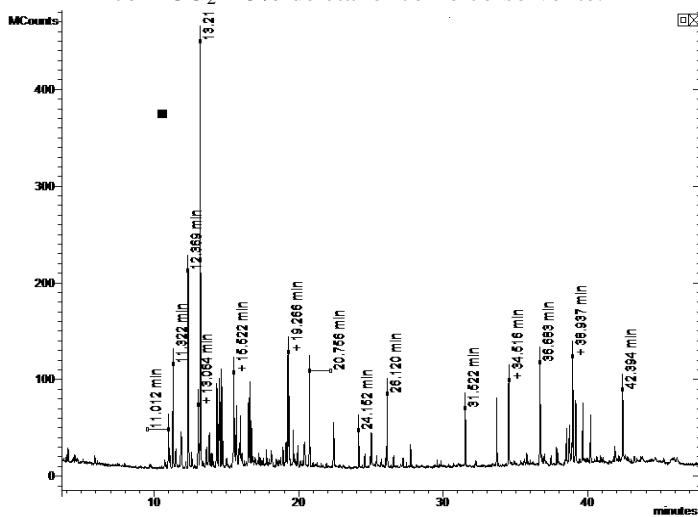


Figura 27: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC com CO_2 + 5% de acetato de etila como co-solvente.

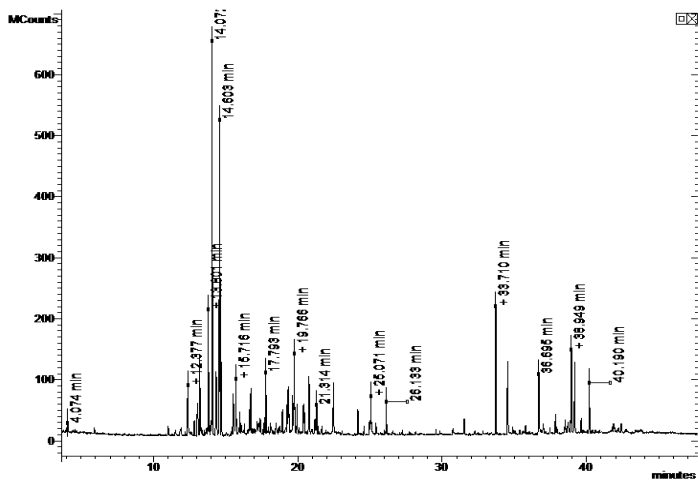


Figura 28: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 100 bar e 30 °C.

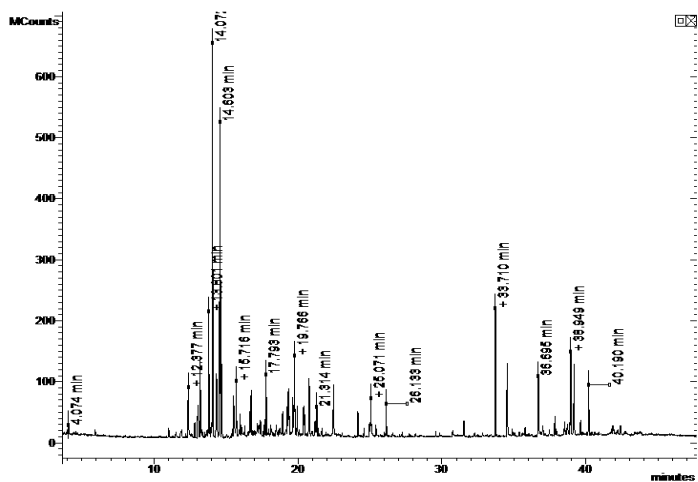


Figura 29: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 200 bar e 30 °C.

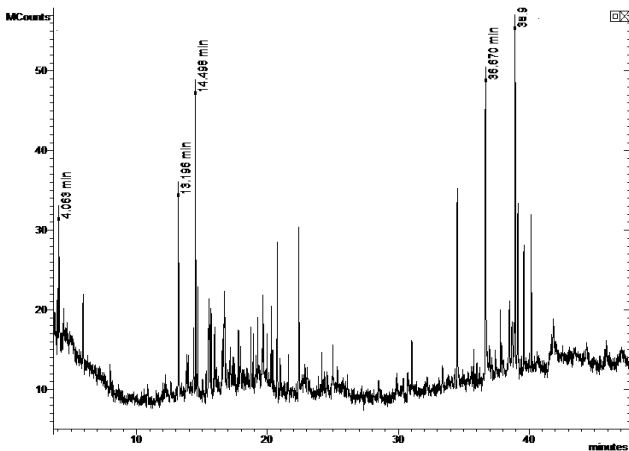


Figura 30: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por extração soxhlet com etanol.

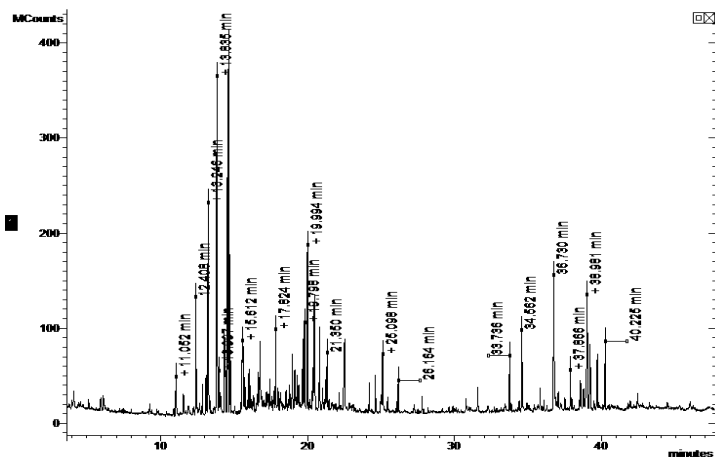


Figura 31: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por extração soxhlet com acetato de etila.

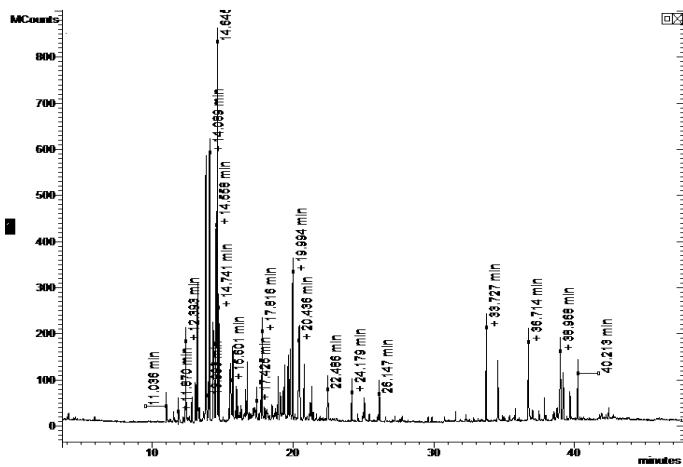


Figura 32: Cromatograma do extrato de erva baleeira obtido por ESC a 200 bar e 40 °C.