

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA - NÍVEL DE DOUTORADO

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CANDEIA
(*Eremanthus erythropappus*) COM FLUIDOS PRESSURIZADOS E SOLVENTE
ASSISTIDO POR ULTRASSOM**

KÁTIA ANDRESSA SANTOS

**TOLEDO – PR
Março de 2018**

KÁTIA ANDRESSA SANTOS

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CANDEIA
(*Eremanthus erythropappus*) COM FLUIDOS PRESSURIZADOS E SOLVENTE
ASSISTIDO POR ULTRASSOM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

**TOLEDO – PR
Março de 2018**

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

S237e Santos, Kátia Andressa
Estudo dos processos de extração do óleo de candeia
(*Eremanthus erythropappus*) com fluidos pressurizados e solvente
assistido por ultrassom / Kátia Andressa Santos. -- Toledo, PR : [s.
n.], 2018.
xv, 120 f. : il. (algumas color.), figs, tabs

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva
Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade
Estadual de Oeste do Paraná. Centro de Engenharias e Ciências
Exatas

1. Engenharia química - Teses 2. Óleo de candeia 3. Essências e
óleos essenciais 4. Extração com fluído supercrítico 5. Extração por
solventes 6. Ultrassom I. Silva, Edson Antônio da, orient. II. T

CDD 20. ed. 660.2842

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Kátia Andressa Santos à Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 02 de março de 2018.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Orientador(a)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Membro Interno



Prof. Dr. Fernando Palú
Membro Interno



Prof. Dr. Jaqueline Hoscheid
Membro Externo



Prof. Dr. Ricardo Schneider
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, dar força, coragem e capacidade para realizar mais esta etapa.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador, prof. Edson Antônio da Silva, pela confiança e ensinamentos ao longo desses anos de pesquisa.

Agradeço às Universidades UEM, UFPR, UNICESUMAR e UTFPR, em especial aos professores, Dr. Lúcio Cardozo-Filho, Dr. Marcos Lúcio Corazza, Dr. José Eduardo Gonçalves e Dra. Tatiana Shioji Tiuman pelo suporte oferecido na realização da parte experimental deste trabalho.

A professora Dra Jaqueline Hoscheid pela ajuda nos experimentos de fracionamento do óleo.

Aos amigos, em especial à Paula Frohlich e Elissandro Klein pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de descontração e apoio nos momentos de dificuldade.

A Capes pelo suporte financeiro.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto (Projeto 475701/2012-7).

Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Candeia (<i>Eremanthus erythropappus</i>): características e usos.....	4
3.2 Óleo essencial.....	7
3.2.1 α -Bisabolol.....	8
3.3 Métodos de extração de óleo essencial	10
3.3.1 Destilação	11
3.3.2 Extração com fluido no estado supercrítico	13
3.3.2.1 Aplicação do CO ₂ supercrítico na obtenção do óleo de candeia	16
3.3.2.2 Modelagem matemática da extração supercrítica.....	17
3.3.3 Extração com líquidos pressurizados – PLE	25
3.3.4 Extração com solvente assistido por ultrassom.....	26
3.4 Atividade antioxidante	29
3.5 Considerações parciais	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais.....	34
4.1.1 Madeira de candeia e resíduo industrial	34
4.1.2 Reagentes	34

4.2	Preparação da madeira para a extração do óleo	35
4.3	Caracterização da matéria-prima	35
4.3.1	Teor de umidade e substâncias voláteis.....	35
4.3.2	Diâmetro médio da partícula.....	35
4.3.3	Densidade real.....	36
4.4	Extrações do óleo	36
4.4.1	Extrações com CO ₂ supercrítico.....	37
4.4.2	Extrações com CO ₂ + cossolventes.....	38
4.4.3	Extrações com solventes orgânicos – Soxhlet	39
4.4.4	Extrações com líquidos pressurizados – PLE.....	40
4.4.5	Extrações com solvente assistido por ultrassom	41
4.5	Caracterização do leito de partículas – extrações supercríticas	41
4.5.1	Densidade	41
4.5.2	Porosidade	42
4.6	Modelagem matemática das curvas cinéticas da extração supercrítica..	42
4.7	Fracionamento do óleo de candeia e isolamento do α -bisabolol.....	43
4.8	Caracterização do óleo	44
4.8.1	Composição química	44
4.8.2	Concentração de α -bisabolol	44
4.8.3	Teor de compostos fenólicos totais	45
4.8.4	Atividade antioxidante.....	45
4.8.4.1	Redução do radical DPPH	46
4.8.4.2	FRAP – método de redução do ferro	46
4.8.5	Atividade antimicrobiana.....	47
4.9	Análise estatística	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48

5.1	Caracterização da madeira de candeia.....	48
5.2	Extrações do óleo	49
5.2.1	Extrações com CO ₂ supercrítico.....	49
5.2.1.1	Curvas cinéticas.....	55
5.2.1.2	Modelagem matemática das cinéticas de extração.....	57
5.2.2	Extrações do óleo da madeira de candeia com CO ₂ +cossolventes .	61
5.2.2.1	Modelagem matemática das cinéticas de extração supercrítica com cossolvente.....	65
5.2.3	Extrações com solventes orgânicos – Soxhlet e PLE.....	68
5.2.4	Extração do óleo de candeia com solvente assistido por ultrassom.	70
5.3	Caracterização do óleo	76
5.3.1	Composição química	76
5.3.2	Concentração de α-bisabolol	81
5.3.3	Fenólicos totais e atividade antioxidante	86
5.3.4	Atividade antibacteriana	91
6	CONCLUSÕES	93
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9	ANEXOS.....	118
9.1	ANEXO I - Determinação da densidade da mistura CO ₂ +cossolventes	118
9.2	ANEXO II - Artigos Publicados em Periódicos	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Candeia (<i>Eremanthus erythropappus</i>) (SCOLFORO <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figura 3.2 – Formas enantioméricas do (-)- α -bisabolol (KAMATOU & VILJOEN, 2010).	9
Figura 3.3 – Diagrama de fases para substância pura (Adaptado de SMITH, VAN NESS & ABBOTT, 2007).	13
Figura 3.4 – Curva típica da extração supercrítica com as três etapas do processo (Adaptado de MARTÍNEZ, 2005).	21
Figura 3.5 – Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo da planta (CHEMAT <i>et al.</i> , 2011).	28
Figura 4.1 – Representação do módulo de extração supercrítica. (A): cilindro de CO ₂ ; (B): bomba seringa do CO ₂ ; (C): bomba seringa do cossolvente; (D): reservatório do cossolvente; (E): leito de extração; (F): frasco coletor do óleo. ...	39
Figura 5.1 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis temperatura e pressão no rendimento da extração do óleo de candeia.....	51
Figura 5.2 - Superfície de resposta para o rendimento da extração do óleo de candeia em função das temperaturas e pressões empregadas.	53
Figura 5.3 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis temperatura e pressão e temperatura no rendimento da extração do óleo do resíduo industrial.....	54
Figura 5.4 - Superfície de resposta para o rendimento da extração do óleo do resíduo industrial em função das temperaturas e pressões empregadas.	55
Figura 5.5 – Curvas cinéticas das extrações do óleo da madeira de candeia.	56
Figura 5.6 - Curvas cinéticas das extrações do óleo do resíduo industrial.....	56
Figura 5.7 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO ₂ supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová.	60
Figura 5.8 – Curvas cinéticas de extração do óleo do resíduo industrial com CO ₂ supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová.	60

Figura 5.9 - Curvas cinéticas experimentais das extrações do óleo candeia com CO ₂ supercrítico e o cossolvente etanol.....	63
Figura 5.10 - Curvas cinéticas experimentais das extrações do óleo candeia com CO ₂ supercrítico e o cossolvente acetato de etila.	63
Figura 5.11 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO ₂ supercrítico e o cossolvente etanol ajustadas pelo modelo de Sovová.	67
Figura 5.12 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO ₂ supercrítico e o cossolvente acetato de etila ajustadas pelo modelo de Sovová.	67
Figura 5.13 - Curva cinética da extração do óleo da madeira de candeia com n-hexano assistida por ultrassom na condição de 50 °C, 15 mL g ⁻¹ e 60 % da potência nominal do equipamento.....	70
Figura 5.14 – Gráfico de Pareto dos efeito das variáveis temperatura (x_1), razão líquido/sólido (x_2) e potência do ultrassom (x_3) no rendimento da extração do óleo de candeia.....	73
Figura 5.15 – Superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e razão líquido/sólido, com potência do ultrassom de 60 %.....	75
Figura 5.16 – Superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e potência do ultrassom, com razão líquido/sólido de 15 mL g ⁻¹	75
Figura 5.17 – Superfície de resposta do rendimento em função da razão líquido/sólido e potência do ultrassom, com temperatura de 50 °C.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Indústrias que extraem o óleo essencial de candeia e/ou α -bisabolol natural (SCOLFORO <i>et al.</i> , 2012).	6
Tabela 5.1 - Condições experimentais e rendimentos das extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial empregando CO ₂ supercrítico.	49
Tabela 5.2 - Análise de variância para predição do rendimento da extração do óleo da candeia com CO ₂ supercrítico.	52
Tabela 5.3 - Análise de variância para predição do rendimento da extração do óleo do resíduo industrial com CO ₂ supercrítico.....	54
Tabela 5.4 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial com CO ₂ supercrítico.	59
Tabela 5.5 - Valores dos indicadores estatísticos para a modelagem de Sovová.	61
Tabela 5.6 - Resultados das extrações do óleo de candeia com CO ₂ puro e com adição de 1, 3 e 5 % dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc), na temperatura de 70 °C e pressão de 240 bar.	62
Tabela 5.7 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações do óleo da madeira de candeia com CO ₂ supercrítico e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila.	66
Tabela 5.8 – Condições experimentais e rendimentos das extrações Soxhlet e PLE com etanol, acetato de etila e n-hexano.....	68
Tabela 5.9 - Condições experimentais e rendimentos das extrações do óleo de candeia com n-hexano assistidas por ultrassom.....	71
Tabela 5.10 - Coeficientes de regressão da superfície de resposta para os rendimentos das extrações assistidas por ultrassom.	72
Tabela 5.11 - Análise de variância (ANOVA) para os rendimentos das extrações assistidas por ultrassom.....	74
Tabela 5.12 – Composição química da fração volátil do óleo extraído da madeira de candeia e do resíduo industrial.....	78

Tabela 5.13 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote I) e resíduo industrial com CO ₂ supercrítico.....	82
Tabela 5.14 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) com CO ₂ supercrítico e cossolventes.	83
Tabela 5.15 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) pelos métodos Soxhlet e PLE.....	84
Tabela 5.16 - Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) com n-hexano assistido por ultrassom.	85
Tabela 5.17 – Fenólicos totais e atividade antioxidante dos óleos da madeira de candeia extraídos com CO ₂ supercrítico puro e com a adição de cossolventes. .	87
Tabela 5.18 – Fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante dos óleos da madeira de candeia extraídos pelos métodos Soxhlet e PLE.	89
Tabela 5.19 – Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre resultados dos ensaios de atividade antioxidante obtidos para o óleo de candeia.....	90
Tabela 5.20 – Concentração inibitória mínima (MIC) do óleo de candeia extraído com CO ₂ , 70 °C e 240 bar, e do α -bisabolol para a inibição de S. aureus e S. aureus MRSA.....	91
Tabela 9.1 – Propriedades dos componentes puros.....	119

LISTA DE ABREVIATÖES E SIGLAS

<i>CER</i>	Período de taxa constante de extração	-
<i>D_{AX}</i>	Coeficiente de difusão axial na fase sólida	$L^2 T^{-1}$
<i>D_{AY}</i>	Coeficiente de dispersão axial na fase fluida	$L^2 T^{-1}$
<i>DC</i>	Período controlado por difusão intrapartícula	-
DMA	Desvio médio absoluto	-
<i>d_p</i>	Diâmetro médio superficial das partículas	L
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila	-
<i>FER</i>	Período de taxa decrescente de extração	-
FRAP	Método antioxidante de redução do ferro	-
GAE	Equivalente de ácido gálico	-
<i>h</i>	Coordenada direção axial do leito de extração	L
IC ₅₀	Concentração para reduzir os radicais DPPH em 50 %	$M L^{-3}$
<i>J(X,Y)</i>	Taxa de transferência de massa na interface sólido-fluido	$M L^{-3} T^{-1}$
<i>k_Fa</i>	Coeficiente volumétrico de transferência de massa no filme externo	T^{-1}
<i>k_Sa</i>	Coeficiente volumétrico de transferência de massa no sólido	T^{-1}
<i>m_F</i>	Vazão mássica de solvente	$M T^{-1}$
MIC	Concentração inibitória mínima	$M L^{-3}$
<i>m_{óleo}</i>	Massa total de óleo obtido na parte linear da curva de extração	M
<i>m_S</i>	Massa de inerte	M
<i>m_{solvente}</i>	Massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva	M
<i>m(t)</i>	Massa de óleo em função do tempo	M
PLE	Extração com líquido pressurizado	-
<i>r</i>	Fração de óleo de fácil acesso	$M M^{-1}$
<i>t</i>	Tempo	T

t_{CER}	Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito	T
t_{FER}	tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito	T
TPC	Teor de compostos fenólicos totais	M M ⁻¹
u	Velocidade intersticial do fluido	L T ⁻¹
V_{leito}	Volume total leito de extração	L ³
W	Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa no interior do sólido	-
X	Razão mássica de soluto na fase sólida	M M ⁻¹
X_0	Concentração inicial de soluto no sólido	M M ⁻¹
X_K	Razão mássica do soluto de difícil acesso, contido no interior do sólido	M M ⁻¹
X_P	Razão mássica do soluto de fácil acesso, contido na superfície do sólido	M M ⁻¹
Y	Razão mássica de soluto na fase fluida	M M ⁻¹
Y_S	Solubilidade do soluto no solvente	M M ⁻¹
Z	Parâmetro adimensional relacionado à transferência de massa na superfície do sólido	-
ρ_F	Densidade do fluido	M L ⁻³
ρ_{leito}	Densidade do leito	M L ⁻³
ρ_S	Densidade da matéria-prima	M L ⁻³
ε	Porosidade do leito	-

**ESTUDO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CANDEIA
(*Eremanthus erythropappus*) COM FLUIDOS PRESSURIZADOS E SOLVENTE
ASSISTIDO POR ULTRASSOM**

DOUTORANDA: KÁTIA ANDRESSA SANTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – nível Doutorado; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 02 de março de 2018. 136 p.

RESUMO

A candeia (*Eremanthus erythropappus*) é uma árvore nativa da Mata Atlântica da qual se extrai um óleo essencial com elevada concentração do sesquiterpeno α -bisabolol, princípio ativo de grande aplicação nas indústrias de cosméticos e farmacêutica devido às suas propriedades anti-inflamatória, antiespasmódica, sedativa, antialérgica, anti-irritante, cicatrizante e vermífuga. A obtenção deste óleo em escala industrial é realizada pelo processo de destilação por arraste a vapor, com elevado tempo de extração, além da degradação de compostos termossensíveis. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade dos óleos da madeira de candeia, obtidos por métodos não convencionais de extração (tecnologia supercrítica com dióxido de carbono e cossolventes, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom), em termos de rendimento, teor de α -bisabolol e atividade antioxidante. Ainda, avaliar a re-extração do óleo do resíduo industrial. As extrações foram realizadas com CO₂ nas temperaturas de 40, 55 e 70 °C e pressões de 160, 200 e 240 bar, com vazão mássica de solvente de $1,96 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ e tempo total de 120 minutos. O maior rendimento obtido para o óleo da candeia nas extrações supercríticas foi de 1,42 % e de 0,41 % para o resíduo, ambos em 70 °C e 240 bar, condição selecionada para os experimentos com cossolventes. Os solventes etanol e

acetato de etila foram utilizados nas concentrações de 1, 3 e 5 % (v/v) junto ao CO₂, proporcionando rendimentos de até 2,35 %. As extrações Soxhlet (360 min) e com líquidos pressurizados (40, 55 e 70 °C; 100 bar e 20 min) evidenciaram a afinidade dos compostos por solventes polares e o efeito positivo da temperatura sobre o rendimento, de 0,53 a 7,23 %. Um planejamento Box-Behnken foi empregado para avaliar efeitos da temperatura (40, 50 e 60 °C), razão volume de n-hexano/massa de madeira (10, 15 e 20 mL g⁻¹) e potência ultrassônica nominal do equipamento (150, 300 e 450 W) sobre rendimento em óleo, obtendo-se, em 7 minutos de extração, até 83 % do rendimento obtido na técnica convencional em Soxhlet (1,57 %), com volume de solvente 2,5 vezes menor. Os compostos majoritários identificados no óleo da candeia foram os sesquiterpenos α -bisabolol, eremantina e costunolida, e o conteúdo do α -bisabolol no óleo foi favorecido pela menor densidade do CO₂ supercrítico, sendo de até 74,5 % para a madeira de candeia e 50,6 % para o resíduo, ambos extraídos na condição de 70 °C e 160 bar. A adição dos cossolventes etanol e acetato de etila ao CO₂ elevou o rendimento de α -bisabolol em até 41 %. Também aumentaram a quantidade de fenólicos totais no óleo e, conseqüentemente, sua capacidade antioxidante. O fracionamento do óleo por cromatografia em coluna foi eficiente para o isolamento do α -bisabolol. No entanto, diferentemente do óleo da madeira de candeia, este composto não foi efetivo na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Em relação às cinéticas das extrações supercríticas, o modelo matemático de Sovová se ajustou aos dados experimentais em todas as condições utilizadas.

Palavras-chave: Candeia, resíduo industrial, extração supercrítica, cossolventes, extração com líquidos pressurizados, extração assistida por ultrassom, α -bisabolol.

STUDY OF CANDEIA (*Eremanthus erythropappus*) OIL EXTRACTION WITH PRESSURIZED FLUIDS AND ULTRASOUND-ASSISTED SOLVENT

AUTHOR: KÁTIA ANDRESSA SANTOS

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA

Doctoral Thesis; Chemical Engineering Doctoral Degree Program; State University of West Paraná; Faculdade St., 645; z/c: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on March 02th, 2018. 136 p.

ABSTRACT

Candeia (*Eremanthus erythropappus*) is a native species of the Brazilian Atlantic forest from which an essential oil with high concentration of sesquiterpene α -bisabolol is extracted. α -Bisabolol is an active principle of important application in the cosmetic and pharmaceutical industries due to its anti-inflammatory, antispasmodic, sedative, antiallergic, anti-irritant, cicatrizant and vermifugal properties. Steam distillation is the most common method used to obtain this oil, with requires long periods of time extraction besides the degradation of thermosensitive compounds. Within this context, the aim of this study was to evaluate the quality of the candeia wood oils obtained by non-conventional methods of extraction (supercritical technology by using carbon dioxide and cosolvents, pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction), in terms of oil yield, bisabolol content and antioxidant activity. In addition, the oil re-extraction from the industrial residue was also evaluated. The extractions were carried out with CO₂ at temperatures of 40, 55 and 70 °C and pressures of 160, 200 and 240 bar, with a solvent mass flow rate of $1.96 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ and 120 min of total extraction. The highest extraction yield obtained was 1.42 wt% for the candeia wood and 0.41 wt% for the residue, both at 70 °C and 240 bar, and this condition was selected to perform the extractions using cosolvents. Ethanol and ethyl acetate were added to supercritical CO₂ at concentrations of 1, 3 and 5 % (v/v), obtaining up to 2.35 wt% of yield. The Soxhlet (360 min) and pressurized liquid

(40, 55 and 70 °C; 100 bar and 20 min) extractions showed the affinity of the candeia compounds for polar solvents and the positive effect of the temperature on the yield, which varied from 0.53 to 7.23 wt%. A Box-Benhken design was employed to evaluate the effect of the variables temperature (40, 50 and 60 °C), n-hexane volume to wood mass (10, 15 and 20 mL g⁻¹) and nominal power (150, 300 and 450 W) on the yield of ultrasound-assisted extractions, obtaining in 7 minutes of extraction, up to 83% of the yield obtained in the conventional technique in Soxhlet (1.57 wt%), with a solvent volume 2.5 times smaller. The major compounds identified in the candeia oil were the sesquiterpenes α -bisabolol, eremanthin and costunolide, and the α -bisabolol content in the oil is favored by the lowest CO₂ density, with 74.45 % being obtained for the candeia wood and 50.62 % for the residue, in both cases in oil extracted at 70 °C and 160 bar. The addition of ethanol and ethyl acetate cosolvents to CO₂ increased the α -bisabolol yield by 41 %. Also, the cosolvents increased the amount of total phenolic content in the oil, and consequently, its antioxidant capacity. The oil fractionation by column chromatography was efficient for α -bisabolol isolation. However, unlike the candeia wood oil, this compound was not effective in inhibiting the *Staphylococcus aureus* growth. In relation to the supercritical extractions, the Sovová mathematical model presented a good adjustment to the experimental data for all the conditions used.

Keywords: Candeia wood, industrial residue, supercritical extraction, cosolvents, pressurized liquid extraction, ultrasound-assisted extraction, α -bisabolol.

1 INTRODUÇÃO

Eremanthus erythropappus, conhecida como candeia, é uma espécie nativa da Mata Atlântica brasileira, pertencente à família Asteraceae. Devido à sua elevada durabilidade e resistência, a madeira de candeia é utilizada como moirão para cercar terrenos, mas sua principal aplicação é na produção de óleo essencial (LONGHI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O óleo essencial extraído da madeira tem como principal componente, até 85 % (SOUZA *et al.*, 2008), o (-)- α -bisabolol ($C_{15}H_{26}O$), um álcool sesquiterpênico opticamente ativo com propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e antiespasmódicas (SOUZA *et al.*, 2008; KAMATOU *et al.*, 2010). A produção brasileira de α -bisabolol é enviada, quase que em sua totalidade, para o mercado externo, que consome em torno de 100 toneladas do sesquiterpeno nacional por ano, sendo este destinado principalmente para fabricantes de cosméticos e medicamentos (ADEODATO, 2015).

O valor comercial do óleo essencial de candeia, juntamente com as inconveniências contidas no processo tradicional de extração por arraste a vapor utilizado pelas destilarias, tais como, longo tempo de extração, altas temperaturas de operação, degradação de compostos termicamente lábeis e recuperação incompleta do óleo (DANH *et al.*, 2009), justifica a utilização de tecnologias que possibilitem a extração deste óleo sem perdas de qualidade.

Dentre essas técnicas, a extração supercrítica mostra-se bastante promissora por proporcionar rendimentos satisfatórios, extratos isentos de solventes e sem alterações em suas propriedades (SPARKS *et al.*, 2006; REVERCHON & MARCO, 2006). O dióxido de carbono (CO_2), fluido mais empregado, não deixa resíduos nos produtos, possui ponto crítico relativamente baixo (31 °C e 72,8 bar), tem alta disponibilidade, baixo custo e não degrada o meio ambiente (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007; DANH *et al.*, 2009).

A extração do óleo de candeia empregando CO_2 supercrítico já foi estudada em outros trabalhos (SOUZA *et al.*, 2008; RIBAS *et al.*, 2014) e os resultados mostraram que a tecnologia é vantajosa para este fim, obtendo-se

elevados rendimentos em termos de óleo (0,30 a 2,4 %) e do sesquiterpeno α -bisabolol (1,12 a 17,76 g $_{\alpha\text{-bisabolol}}$ kg $_{\text{madeira}}^{-1}$) em comparação com os obtidos pela técnica convencional de destilação, 0,14 a 1,05 % de rendimento e de 1,02 a 6,28 g de α -bisabolol por kg de madeira (GALDINO *et al.*, 2006; MORI *et al.*, 2009; SILVERIO *et al.*, 2013).

As técnicas de extração com líquidos pressurizados e solventes assistidos por ultrassom também são atrativas na obtenção de compostos bioativos de matrizes naturais, com redução do tempo de extração e consumo de solventes. O uso do ultrassom evita alguns dos inconvenientes das técnicas convencionais, como a perda e degradação dos compostos termossensíveis, pois permite operar em níveis brandos de temperatura, com rendimentos de extração similares, ou até mesmo superiores, aos obtidos pelos métodos convencionais (TIWARI, 2015; CHEMAT *et al.*, 2017; VINATORU *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, o presente projeto de pesquisa visa investigar diferentes métodos de extração do óleo de candeia: CO₂ supercrítico, mistura de CO₂ e cossolventes, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom, bem como avaliar o conteúdo de α -bisabolol, composição química e capacidade antioxidante, além da atividade antimicrobiana do óleo e do α -bisabolol obtido por cromatografia em coluna. Também, avaliar a re-extração em meio supercrítico do resíduo industrial (material que sobra da extração por arraste a vapor), visto que este é um material sem valor agregado destinado para as caldeiras das destilarias.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar diferentes técnicas de extração não convencionais do óleo da madeira de candeia: CO₂ supercrítico, mistura de CO₂ com os cossolventes etanol e acetato de etila, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom, com o intuito de se obter um óleo rico em α -bisabolol. Outro objetivo do projeto é avaliar a tecnologia supercrítica na recuperação de óleo do resíduo industrial (madeira após o processo de extração em escala industrial).

2.1 Objetivos Específicos

- Extração do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico e avaliação dos efeitos da temperatura e pressão na solubilidade e no rendimento;
- Análise dos rendimentos da extração supercrítica utilizando como matéria-prima o resíduo industrial (material que sobra da extração do óleo pela destilaria);
- Avaliação da eficiência do dióxido de carbono e da adição dos cossolventes (etanol e acetato de etila) na extração do óleo da madeira de candeia;
- Avaliação do efeito da temperatura na extração do óleo de candeia com os solventes de diferentes polaridades (etanol, acetato de etila e n-hexano) pressurizados;
- Avaliação dos efeitos das variáveis: temperatura, razão volume de solvente/massa de madeira e potência na extração assistida por ultrassom;
- Fracionamento do óleo de candeia e isolamento do α -bisabolol por cromatografia em coluna;
- Caracterização química dos óleos por cromatografia gasosa e líquida;
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos;
- Determinação da atividade antibacteriana do óleo de candeia e do α -bisabolol;
- Modelagem matemática da cinética de extração supercrítica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Candeia (*Eremanthus erythropappus*): características e usos

A candeia (*Eremanthus erythropappus* DC. Macleish) é uma árvore pertencente à família Asteraceae (Compositae), uma das maiores dentre as angiospermas, que compreende cerca de 1600 gêneros e 23000 espécies (ANDENBERG *et al.*, 2007). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 271 gêneros e 1965 espécies (FORZZA *et al.*, 2010). No gênero nativo *Eremanthus* estão incluídas as 24 espécies aceitas de árvores e arbustos conhecidas como “candeias”, sendo as espécies *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus* as de maior ocorrência e importância econômica (RIBEIRO *et al.*, 2010). A primeira utilizada como moirões para cercar terrenos, mas principalmente na produção de óleo essencial, e a segunda apenas para moirões.

A espécie ocorre na América do Sul, encontrada no Brasil, no nordeste da Argentina e no norte e leste do Paraguai (CARVALHO, 1994). No Brasil, a candeia está distribuída, principalmente, no centro-oeste (Goiás e Distrito Federal) e sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro). Em Minas Gerais os candeais formam uma ampla faixa do nordeste ao sul e seguem ao sentido oeste do estado (LONGHI *et al.*, 2009), abrangendo 457 municípios, o que corresponde a 34,4 % do estado (CAMOLESI *et al.*, 2010).

Considerada invasora de campos, a candeia se desenvolve em solos rasos e pouco férteis, principalmente, em campos abertos de altitude entre 400 e 2200 m (SCOLFORO *et al.*, 2012), ou seja, em locais nos quais seria difícil a implantação de culturas agrícolas ou mesmo, a implantação de alguma outra espécie florestal. A altura da árvore candeia varia de 2 a 10 m, com diâmetro de até 35 cm (SCOLFORO *et al.*, 2008), embora a altura e diâmetro de um candeal seja, em média, de 6 a 7 m e 15 cm, respectivamente (SCOLFORO *et al.*, 2012).

A árvore, Figura 3.1, possui fuste irregular e copa ampla (MORI *et al.*, 2010). O tronco possui a casca grossa e cheia de fendas no fuste; nos galhos mais novos, a casca torna-se menos rústica. Sua madeira é dura e resistente, de

coloração branca ou acinzentada e de cheiro característico, devido à presença de óleo essencial (MORI, 2008). As folhas tem coloração verde na parte superior e na parte inferior são esbranquiçadas e aveludadas (DUTRA *et al.*, 2010). Apresentam flores hermafroditas dispostas em inflorescências, de cor roxa e com grandes quantidades de pólen viável e néctar, atrativos às abelhas (VIEIRA *et al.*, 2012) e seu fruto é do tipo cápsela, com superfície cilíndrica e dez arestas, de cor parda-escura, com aproximadamente 2 mm de comprimento (SCOLFORO *et al.*, 2012).



Figura 3.1 – Candia (*Eremanthus erythropappus*) (SCOLFORO *et al.*, 2012)

A candia possui múltiplos usos. Antigamente, sua madeira era empregada na construção naval, construção de canoas, lenha e postes. Atualmente, os principais produtos obtidos da candia são moirões para cercas e seu óleo essencial, que apresenta altos teores do sesquiterpeno α -bisabolol (LONGHI *et al.*, 2009). Segundo SCOLFORO *et al.* (2012), os moirões destinados à construção de cercas são os de diâmetro entre 7 e 15 cm, enquanto os maiores

são empregados em galpões e currais. As peças de maior diâmetro também são as que possuem maior quantidade de óleo essencial, sendo estas também destinadas às indústrias.

Devido ao alto potencial econômico, a candeia foi explorada de forma predatória e desordenada desde os anos 80, até que, no ano de 2000, um importante jornal do Rio de Janeiro denunciou a “máfia da candeia”, uma rede clandestina de madeireiros e empresários que atuavam no corte indiscriminado da candeia, inclusive dentro de parques estaduais em Minas Gerais (DONADELLI, 2012). A partir daí, solicitado pelo Ministério do Meio Ambiente, a Universidade Federal de Lavras desenvolveu o “Projeto Candeias”, considerado o maior estudo de manejo sustentável de uma planta nativa, resultando na primeira legislação de uma árvore brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2011).

No Brasil, são sete indústrias (Tabela 3.1) que extraem o óleo essencial de candeia: duas em São Paulo, três em Minas Gerais, uma no Paraná e uma na Bahia, apresentando uma produção anual estimada em cerca de 170 mil quilos (MORI, 2008), que é destinada, em grande parte, para os países europeus. As destilarias brasileiras exportam o óleo essencial para esses países pelo preço de, em média, R\$ 70,00 por quilo, que por sua vez, refinam o óleo e o vende a R\$ 230,00 (VEIGA, 2013).

Tabela 3.1 - Indústrias que extraem o óleo essencial de candeia e/ou α -bisabolol natural (SCOLFORO *et al.*, 2012).

Empresa	Estado
Citróleo óleos essenciais indústria e comércio Ltda.*	São Paulo
Citrosul**	Minas Gerais
Citroflora Ltda.**	Minas Gerais
Citroflora Ltda.**	Bahia
Atina*	Minas Gerais
Purita óleos essenciais indústria e comércio Ltda.*	São Paulo
Destilaria Maripá – Óleos essenciais**	Paraná

* produção de óleo essencial de candeia e α -bisabolol natural.

** produção de óleo essencial de candeia.

Como mostrado na Tabela 3.1, a destilação do óleo essencial bruto para obter o α -bisabolol natural é realizada por duas indústrias situadas no estado de São Paulo e uma situada em Minas Gerais (SCOLFORO *et al.*, 2012).

3.2 Óleo essencial

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis líquidas, lipofílicas e, geralmente odoríferas, que podem ser sintetizadas nos diferentes órgãos das plantas aromáticas, tais como nas flores, botões, madeira, raízes, cascas, sementes, frutos e folhas, rizoma e raízes (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014). Desempenham várias funções de proteção das plantas contra o ataque de microrganismos e predadores herbívoros, bem como podem atrair insetos para dispersão de pólen e sementes ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI *et al.*, 2008).

Apenas 10 % das espécies de plantas contêm óleos essenciais e, devido à sua pequena fração na composição vegetal (geralmente menor que 5 % do material seco), são consideradas substâncias raras e valiosas (EL ASBAHANI *et al.*, 2015), com aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria, geralmente como agentes aromatizantes (BURT, 2004). As propriedades biológicas destes compostos voláteis, tais como, anticancerígena, antinociceptivo, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora e antioxidante, justificam seu uso na área medicinal (TEIXEIRA *et al.*, 2013; RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

A formação do óleo essencial está relacionada ao metabolismo secundário das plantas, ou seja, está incluído na classe de compostos orgânicos produzidos pelos vegetais que não possuem ação direta em seus processos vitais, tais como: fotossíntese, respiração, transporte de solutos, síntese de proteínas, carboidratos, proteínas e lipídios, assimilação de nutrientes, entre outras (TAIZ & ZEIGER, 2004). Esses líquidos aromáticos são biossintetizados e armazenados nas glândulas secretoras, localizadas na superfície da planta (papilas epidérmicas e tricomas glandulares), em órgãos internos da mesma (canais e bolsas

secretoras), ou no citoplasma de células secretoras de um ou mais órgãos da planta (SVOBODA & GREENAWAY, 2003, BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008).

Sua composição é, em geral, formada por hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos) e compostos aromáticos, como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, óxidos, lactonas, éteres e ésteres, e a combinação de todos esses componentes de baixo peso molecular confere o seu aroma característico (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007, BAKKALI *et al.*, 2008).

Os terpenos constituem a classe mais comum de compostos químicos presentes nos óleos essenciais (EDRIS, 2007). Sua estrutura está baseada em um número definido de unidades de isopreno (molécula com cinco átomos de carbono), sendo os monoterpenos constituídos de duas unidades de isopreno (dez átomos de carbono, $C_{10}H_{16}$) e os sesquiterpenos, como o α -bisabolol presente no óleo essencial de candeia, formados por três unidades da molécula (quinze átomos de carbono, $C_{15}H_{24}$).

3.2.1 α -Bisabolol

O (-)- α -bisabolol, (-)-6-Metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-5-hepten-2-ol, também conhecido por levomenol, é um álcool sesquiterpênico monocíclico com fórmula química $C_{15}H_{26}O$. É um líquido incolor com um fraco odor floral, densidade relativamente baixa ($0,93 \text{ g mL}^{-1}$) e ponto de ebulição de 153°C a 12 mmHg (PERBELLINI *et al.*, 2004).

O α -bisabolol pode ser encontrado sob quatro estereoisômeros (Figura 3.2): (-)- α -bisabolol, (-)-epi- α -bisabolol, (+)- α -bisabolol e (+)-epi- α -bisabolol, que se distinguem devido às suas diferentes rotações óticas (BRUNKE & HAMMERSCHMIDT, 1985). O enantiômero (+)- α -bisabolol é raro na natureza, encontrado como principal composto do óleo essencial do botão de *Populus balsamifera* (PIOCHON-GAUTHIER *et al.*, 2014) e do óleo de *Cymbopogon flexuosus*, até 39,8 % (THAPPA & AGARWAL, 1989). Desta forma, o termo α -bisabolol é geralmente utilizado para o enantiômero (-)- α -bisabolol, sendo este o mais comum e possui diversas atividades biológicas (KAMATOU & VILJOEN, 2010). Esta nomenclatura também foi adotada neste trabalho.

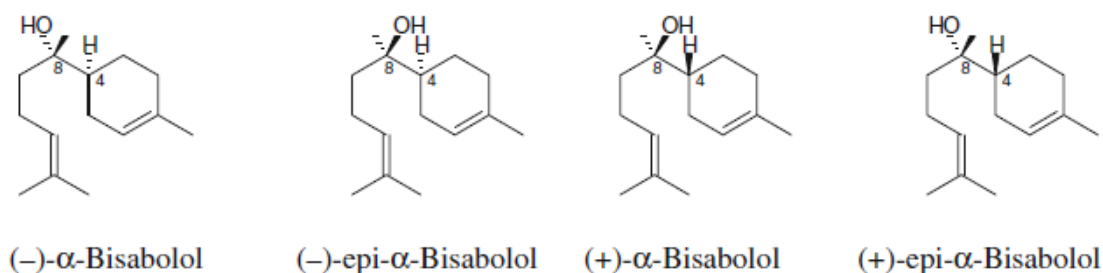


Figura 3.2 – Formas enantioméricas do (-)-α-bisabolol (KAMATOU & VILJOEN, 2010).

O sesquiterpeno α-bisabolol foi isolado pela primeira vez por Šorm e colaboradores em 1951, a partir do óleo das flores da camomila *Matricaria chamomilla* (ŠORM *et al.*, 1951), representando até 50 % da composição do óleo (ISAAC, 1979). Posteriormente, foi verificado que o α-bisabolol presente no óleo essencial da madeira de candeia (*Eremanthus erytropappus*) era idêntico ao da *Matricaria chamomilla* (FLASKAMP *et al.*, 1981), sendo constituído de até 85 % do sesquiterpeno (SOUZA *et al.*, 2008).

O α-bisabolol também é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de *Salvia runcinata* (>65 %) e *Salvia stenophylla*, até 46,5 %, (KAMATOU *et al.*, 2008), *Zanthoxylum tingoassuiba*, 11,60 % (DETONI *et al.*, 2009), *Smyrniopsis aucheri*, 19,9 % (FARIDI *et al.*, 2008), *Stachys obtusicrena*, 23,5 % (MASOUDI *et al.*, 2012), *Myrcia aff fosteri*, 19,2 % (TENORIO *et al.*, 2011), *Plinia cerrocampensis*, 42,8 % (VILA *et al.*, 2010), entre outros.

Devido à sua baixa toxicidade, com dose letal LD₅₀ oral aguda em ratos e camundongos em torno de 15 mL kg⁻¹ (ANDERSEN, 1999), o α-bisabolol foi considerado pelo órgão governamental *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados como um ingrediente ativo seguro nos produtos comerciais (KAMATOU & VILJOEN, 2010). É empregado em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus e outros artigos de higiene. Também é usado em produtos de limpeza doméstica e em formulações farmacêuticas (MADHAVAN, 1999; BATHIA *et al.*, 2008; PIOCHON *et al.*, 2009). A principal aplicação do α-bisabolol no setor farmacêutico está relacionada às suas propriedades anti-inflamatória, antiespasmódica, sedativa, antialérgica e vermífuga (SOUZA *et al.*, 2008).

No Brasil, as duas destilarias que realizam a destilação do óleo essencial de candeia para obter o α -bisabolol, comercializam o produto por um preço que varia de US\$ 90,00 a US\$ 100,00 o quilo (SCOLFORO *et al.*, 2012). Cerca de 80 % da produção brasileira do sesquiterpeno é destinada ao mercado externo. Em 2005, estima-se que foram exportados 61308 kg de α -bisabolol (CLARK *et al.*, 2011), sendo atualmente requeridas 100 toneladas pelas distribuidoras internacionais, que o repassam para os grandes fabricantes de cosméticos e medicamentos (ADEODATO *et al.*, 2015).

O α -bisabolol natural pode ser substituído pelo sintético, obtido por um método patenteado a partir dos sesquiterpenos farnesol ou nerolidol. Neste método, o farnesol é transformado junto com uma mistura de cetona, ácido sulfônico e outro ácido forte adicional e precisa ser purificado, apresentando a desvantagem de conter traços de farnesol (0,5 %) mesmo após a purificação (SPIEGEL, 2012). Outra desvantagem é a presença dos estereoisômeros indesejáveis (+)- α -bisabolol e (+/-)-epi- α -bisabolol (SON *et al.*, 2014). Enquanto o produto natural possui 95 % de teor mínimo do isômero ativo (-)- α -bisabolol, o sesquiterpeno sintético possui somente cerca de 42,5 %, sendo requerido um processo adicional de purificação para se alcançar uma alta pureza no composto de interesse (SCOLFORO *et al.*, 2012).

3.3 Métodos de extração de óleo essencial

Os óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes partes das mais diversas plantas. O método empregado na extração depende, normalmente, das características do material vegetal e da aplicação do óleo. Um procedimento inadequado de extração pode causar danos ou alteração química do óleo essencial, resultando na perda de bioatividade e de suas características naturais ou ainda, perda de coloração ou odor e alterações físicas, como aumento da viscosidade (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014).

Embora a extração de óleos essenciais por destilação seja a mais empregada, o desenvolvimento de novas técnicas de separação para as indústrias química, de alimentos e farmacêutica têm recebido muita atenção nos

últimos anos (BOUSBIA *et al.*, 2009), levando ao surgimento de processos mais eficientes, com redução no tempo de extração e consumo de energia, aumento no rendimento e qualidade dos produtos obtidos (EL ASBAHANI *et al.*, 2015). Dentre as tecnologias emergentes, destacam-se a extração supercrítica, com líquidos pressurizados e a extração assistida por ultrassom (FLAMINI *et al.*, 2007; POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007; CRAVOTTO *et al.*, 2008; KHODDAMI & WILKES, 2013).

3.3.1 Destilação

A extração por destilação é o processo mais tradicional e simples para a obtenção de óleos essenciais e consiste, basicamente, na evaporação do líquido volátil seguida de sua condensação. Neste tipo de extração, o material vegetal pode ficar imerso na água, técnica conhecida como hidrodestilação, ou em contato com o vapor, destilação por arraste de vapor (DIMA & DIMA, 2015).

Na hidrodestilação, o princípio da extração se baseia na destilação azeotrópica. Durante o aquecimento à pressão atmosférica, as moléculas de água e de óleo essencial formam uma mistura heterogênea que atinge a temperatura de ebulição abaixo de 100 °C, e a mistura é destilada simultaneamente (EL ASBAHANI *et al.*, 2015). Devido à imiscibilidade da água com a maioria das moléculas terpênicas dos óleos essenciais e diferença de densidade entre ambos, após a condensação, o óleo essencial pode ser recuperado.

É um método simples e fácil que apresenta a vantagem de permitir a destilação do óleo essencial a uma temperatura abaixo da temperatura de ebulição dos seus componentes (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014). No entanto, a hidrodestilação apresenta vários inconvenientes, tais como: longo tempo de extração, alta suscetibilidade às alterações químicas das moléculas pelo contato prolongado com a água fervente (REYES-JURADO *et al.*, 2014), perda de compostos polares solúveis em água, como por exemplo os fenóis, que não são completamente recuperados com a destilação (RANJITHA & VIJAYALAKSHMI, 2014), e extração incompleta do óleo (DANH *et al.*, 2009).

No processo por arraste a vapor, o vapor produzido na caldeira é encaminhado para passar através da matéria-prima. O calor aplicado causa o rompimento da estrutura celular da planta, liberando o óleo essencial. Similarmente à hidrodestilação, o vapor contendo os compostos extraídos é condensado para a recuperação do óleo essencial (REYES-JURADO *et al.*, 2014). Embora apresente desvantagens, tais como, perda de compostos voláteis pela degradação térmica, longos tempos de extração e alto consumo de energia, este é o processo mais empregado na extração de óleos essenciais (BOŽOVIĆ *et al.*, 2017) devido à simplicidade da tecnologia, baixo investimento e alta capacidade de processamento (CERPA *et al.*, 2008).

O processo industrial de extração do óleo de candeia é por arraste a vapor, sendo este descrito por LONGHI *et al.* (2009) e SCOLFORO *et al.* (2012). Inicialmente, a madeira é irrigada antes de ser enviada ao picador, o que reduz o atrito entre as facas do equipamento e a madeira. Os cavacos de candeia são colocados nos reatores (autoclaves ou dornas) e vapor d'água é injetado pela sua parte inferior. O vapor com o óleo essencial é coletado por uma tubulação na parte superior da dorna, que conduz essa mistura para o condensador e, então, o óleo é separado da água por diferença de densidade. A duração do processo é de 8 horas.

LONGHI *et al.* (2009) relatam que, após a obtenção do óleo essencial, o mesmo é neutralizado com uma solução alcalina e destilado sob vácuo durante 40 horas. Desse processo, 95 % do produto é o sesquiterpeno α -bisabolol, que é acondicionado para ser exportado e o restante é denominado de resina. Segundo os autores, essa resina pode ser empregada para o tratamento de madeiras.

O resíduo da candeia, cavacos após a extração do óleo, embora seja empregado, em parte, nas caldeiras da destilaria (SANTOS *et al.*, 2008), grande quantidade do material fica armazenada no pátio da indústria, gerando problemas de armazenamento e contaminação do meio ambiente. Assim, estudos visando à aplicação deste material têm sido relatados. SANTOS *et al.* (2008) e SANTOS *et al.* (2009) tiveram resultados positivos com a adição do resíduo na produção de chapas de madeira aglomerada e de painéis cimento-madeira, respectivamente. RESENDE *et al.* (2010) e BORGES *et al.* (2015) verificaram eficiência de seu carvão ativado na adsorção de certas moléculas orgânicas.

3.3.2 Extração com fluido no estado supercrítico

A extração com fluido supercrítico é uma técnica considerada promissora para a obtenção de óleo essencial (WANG, 2008). É um método geralmente mais rápido, mais seletivo e ambientalmente correto quando comparado às técnicas tradicionais de extração (MENDIOLA *et al.*, 2007). A facilidade do aumento do poder de solvatação do fluido pelo simples ajuste das condições operacionais torna essa tecnologia vantajosa na recuperação seletiva das substâncias de interesse (IBÁÑEZ *et al.*, 2016).

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico quando sua temperatura e pressão são superiores aos seus valores críticos, T_c e P_c , respectivamente. O ponto crítico, como mostrado na Figura 3.3, é caracterizado pela mais alta temperatura em que um gás pode ser liquefeito pelo aumento da pressão e pela mais alta pressão em que um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura (BRUNNER, 2005).

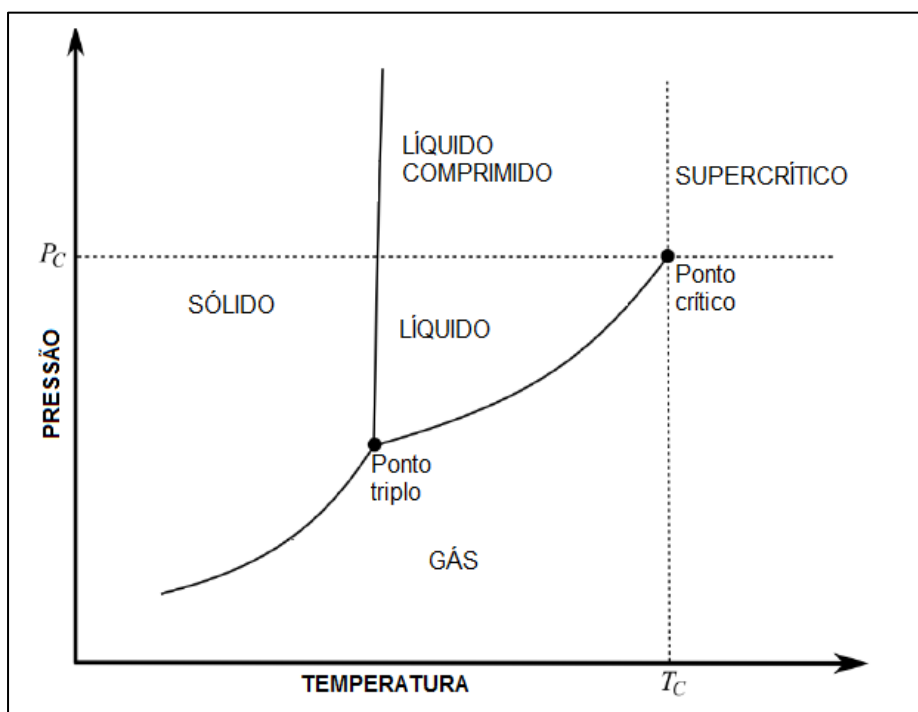


Figura 3.3 – Diagrama de fases para substância pura (Adaptado de SMITH, VAN NESS & ABBOTT, 2007).

No estado supercrítico o fluido apresenta-se em uma única fase, com propriedades similares tanto às de líquidos quanto de gases. Apresenta densidade próxima à de líquidos, e, portanto, poder de solvatação similar. Por outro lado, sua viscosidade e tensão superficial próxima a de gases, bem como difusividade relativamente alta (cerca de duas ordens de grandeza maior que de líquidos comuns), fortalecem suas propriedades de transporte, podendo difundir-se facilmente em matrizes sólidas (HERRERO *et al.*, 2006), e, portanto, favorável de ser empregado na extração a partir de plantas.

A extração supercrítica de matrizes sólidas consiste basicamente de duas etapas: extração e separação do extrato do solvente (BRUNNER, 1994). As partículas do material sólido do qual se deseja extrair é colocado numa célula de extração, formando um leito fixo. O solvente supercrítico é alimentado continuamente no extrator sendo absorvido pelo sólido, o que promove a dilatação das estruturas celulares e, conseqüentemente, diminui a resistência à transferência de massa. Simultaneamente, os compostos solúveis são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para a superfície do sólido e então, transportados pelo fluido. Na saída do extrator, a mistura soluto-solvente é separada pela despressurização do sistema e o solvente pode ser recuperado (SOVOVÁ, 2005; PEREIRA & MEIRELES, 2010).

Mais de 90 % das extrações supercríticas são realizadas com dióxido de carbono (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007) devido, principalmente, à sua baixa temperatura e pressão crítica (31 °C e 72,8 bar, respectivamente), permitindo a operação em condições amenas e adequadas para a extração de compostos de plantas (REYES-JURADO *et al.*, 2014). Além disso, o CO₂ não é tóxico, apresenta alta disponibilidade a um custo relativamente baixo, é ambientalmente seguro (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; MEDINA, 2012) e, por ser gasoso na temperatura e pressão ambiente, fornece extratos isentos de solvente (SILVA *et al.*, 2016). Devido ao seu caráter apolar, o dióxido de carbono é um solvente eficiente na extração de óleos essenciais por estes serem constituídos de compostos lipofílicos (FORNARI *et al.*, 2012).

Uma importante característica desse processo é a possibilidade de alteração das propriedades físico-químicas do solvente, como a densidade, viscosidade, constante dielétrica e difusividade, por uma alteração em sua

temperatura e pressão (PRONYK & MAZZA, 2009). A densidade (relacionada ao poder do solvente) é a propriedade mais afetada pelas variações de temperatura e pressão (MELO *et al.*, 2014), principalmente na região próxima ao ponto crítico, em que o fluido é altamente compressível. Uma elevação da pressão a uma determinada temperatura resulta num aumento da densidade do fluido, que influencia diretamente na sua viscosidade e constante dielétrica (CASTRO *et al.*, 1994). Por outro lado, o aumento da temperatura a uma dada pressão resulta no aumento na difusividade do fluido supercrítico e conseqüentemente, nas taxas de transferência de massa (MEDINA, 2012).

O aumento na eficiência da extração também pode ser conseguido com a adição de pequenas quantidades de cossolventes (ou solventes modificadores) ao CO₂ (RUCKENSTEIN & SHULGIN, 2001). A presença de modificadores aumenta a solubilidade devido ao aumento nas forças de interação química dos solutos com o solvente e/ou devido o aumento na densidade, com a conseqüente melhora na solvatação (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006). Também, podem ocasionar o inchamento do sólido, facilitando o transporte do soluto dos poros intersticiais até a superfície da matriz (HOLLENDER *et al.* 1997).

O álcool etílico é o solvente mais empregado como modificador, sendo utilizado em 53 % dos trabalhos de extração supercrítica de matrizes vegetais que empregaram cossolventes (MELO *et al.*, 2014). O etanol é um solvente inócuo para a saúde humana e para o meio ambiente, podendo ser utilizado em aplicações na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica. É um solvente polar (REID *et al.*, 2001), capaz de induzir as interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio com grupos funcionais polares (HAMBURGER *et al.*, 2004) e a solubilidade de substâncias polares tende a ser incrementada.

O uso de cossolventes polares ao CO₂ também tem sido relatado como forma de elevar o conteúdo de compostos antioxidantes nos extratos de plantas (FORNARI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016). Devido à baixa volatilidade destes compostos de maior peso molecular e polaridade, a adição de pequenas concentrações de solventes líquidos tende a aumentar sua solubilidade no CO₂ supercrítico (BRUNNER, 1994).

Foram verificados aumentos significativos no rendimento e concentração de compostos antioxidantes para a adição de até 10 % do cossolvente etanol ao CO₂ supercrítico na extração a partir de diversas fontes vegetais de compostos bioativos, tais como folhas (ZULKAFI *et al.*, 2014; BERMEJO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2018), frutas (BENELLI *et al.*, 2010; SERRA *et al.*, 2010; AKAY *et al.*, 2011; KAGLIWAL *et al.* 2012; REÁTEGUI *et al.*, 2014); sementes (KRAUJALIS & VENSKUTONIS, 2013; GUINDANI *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2017), madeira (BRAGA *et al.*, 2008; CONDE *et al.*, 2013), entre outros.

Além do etanol, o acetato de etila também é recomendado como cossolvente junto ao CO₂, especialmente para extração de produtos de grau alimentício ou farmacêutico (MARTÍNEZ, 2008; FALCO & KIRAN, 2012). Embora o acetato de etila não possua átomos de hidrogênio doadores para a formação de pontes de hidrogênio (BERMEJO *et al.*, 2016), vários trabalhos mostraram a efetividade deste como cossolvente.

YANG *et al.* (2007) verificaram que a adição de 7,5 % de acetato de etila ao CO₂ aumentou a pureza do composto bioativo capillarisin no extrato de *Artemisia capillaris*. LEE *et al.* (2007) empregaram 6 % de acetato de etila na extração supercrítica de artepillin C a partir do própolis brasileiro e a recuperação do composto aumentou substancialmente de 3,7 para 13,9 %. A adição de 5 % de acetato de etila ao CO₂ na extração de *Cordia verbenacea* elevou o rendimento de 5,0 para 8,6 %, além de recuperar um extrato com elevada atividade antimicrobiana (MICHIELIN *et al.*, 2009).

3.3.2.1 Aplicação do CO₂ supercrítico na obtenção do óleo de candeia

Poucos trabalhos empregaram a tecnologia supercrítica com CO₂ na extração do óleo de candeia (*Eremanthus erythropappus*). Foram encontrados três trabalhos (SOUZA *et al.*, 2008; RIBAS *et al.*, 2014; QUEIROZ & CAJAIBA, 2016) e os dados disponíveis são escassos em relação à composição química, concentração de α -bisabolol e atividade antioxidante dos óleos obtidos.

SOUZA *et al.* (2008) realizaram as extrações do óleo em pressões de 100, 150 e 200 bar e temperaturas de 35, 40 e 60 °C. Posteriormente, os autores

avaliaram o equilíbrio de fases do sistema CO₂+óleo com composições variando de 10 a 90 % em massa de CO₂, com temperaturas de 35 a 60 °C e pressões até 250 bar.

RIBAS *et al.* (2014) estudaram a extração do óleo de candeia com CO₂ nas condições de temperatura e pressão de: 40 °C e 200 bar; 60 °C e 120 bar; 50 °C e 200 bar; 60 °C e 245 bar, com vazão de solvente de 3 mL min⁻¹. Os autores avaliaram também a extração em aparato Soxhlet com os solventes hexano e diclorometano e a purificação do óleo de candeia pelo método combinado de extração e adsorção em coluna de leito fixo utilizando sílica gel e alumina como adsorvente. Neste trabalho, os óleos foram analisados quanto à concentração de α -bisabolol.

QUEIROZ & CAJAIBA (2016) empregaram um planejamento experimental para avaliar o efeito das variáveis temperatura (40, 50 e 60 °C), pressão (80, 115 e 180 bar), tempo (1, 2 e 3 h) e quantidade do cossolvente etanol (0, 100 e 200 mL) no rendimento de extração do α -bisabolol da madeira de candeia e verificaram que o etanol teve efeito significativo no aumento do rendimento do sesquiterpeno. Embora os autores tenham estudado o efeito da adição de etanol na extração pelos métodos estático e dinâmico, não são fornecidas informações sobre a porcentagem do cossolvente utilizada em relação ao CO₂. Também não foram encontrados dados sobre a cinética de extração e rendimento do óleo de candeia empregando CO₂ e cossolventes.

3.3.2.2 Modelagem matemática da extração supercrítica

Modelos matemáticos são comumente utilizados para a correlação dos dados experimentais obtidos na extração supercrítica. A modelagem matemática permite avaliar o comportamento cinético da extração, possibilitando a generalização dos resultados experimentais e, através da simulação de processos, obter dados sobre condições diferentes das estudadas (REVERCHON & MARCO, 2006). No entanto, o objetivo mais importante da modelagem é a predição de curvas de extração em processos de maior escala,

pois experimentos reais nesse nível são extremamente caros (HUANG *et al.*, 2012).

Segundo REVERCHON (1997), são três os tipos de abordagem matemática que descrevem as curvas de extração supercrítica: empíricos, baseados em analogia com a transferência de calor, e modelos baseados no balanço de massa diferencial ao longo de uma seção do extrator.

Os modelos empíricos usam funções matemáticas simples, similares à isoterma de Langmuir (ESQUÍVEL *et al.*, 1999; NAIK *et al.*, 1989), equação de reação química de primeira ordem (BARTON *et al.*, 1992), entre outras, para expressar o rendimento em função do tempo de extração. No entanto, estes modelos se limitam a condições operacionais específicas e não são adequados para as previsões de aumento de escala, pois não fornecem nenhuma descrição fenomenológica dos processos de transferência de massa (HUANG, 2012; SOVOVÁ, 2012).

Na segunda categoria se encontra o modelo proposto por REVERCHON *et al.* (1993), em que o modelo de CRANK (1975), para a transferência de calor no resfriamento de partículas sólidas em um meio uniforme, foi adaptado pelos autores para a extração supercrítica. A segunda lei de Fick para a difusão foi aplicada para se obter o modelo de transferência de massa e esse é um dos seus principais inconvenientes, já que a transferência de massa por convecção predomina no início do processo da extração supercrítica (ROSA & MEIRELES, 2009).

A maioria dos modelos propostos para descrever o processo de extração supercrítica se baseia em equações de balanços de massa e leva em consideração a existência de duas fases: uma fase sólida composta da matriz vegetal, de onde se busca extrair os compostos de interesse e uma fase fluida composta do solvente supercrítico mais o extrato dissolvido nele (BRUNNER, 1994).

Nessa abordagem, o processo de extração supercrítica é, geralmente, realizado em um leito cilíndrico preenchido por partículas da matéria-prima através do qual o solvente flui axialmente. Os fenômenos de transferência de

massa que ocorrem neste processo são: difusão na matriz sólida, transferência de massa na interface sólido-fluido e dispersão e convecção no fluido.

Em geral, nos balanços de massa, assume-se que as partículas da matéria-prima que preenchem o leito de extração estão dispostas de forma homogênea e o comprimento do cilindro é infinitamente maior do que seu diâmetro, de modo que todas as formas de transferência que ocorrem nas direções radiais e tangenciais são desprezíveis (MARTÍNEZ, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2003). Considerando-se, ainda, que as fases fluida e sólida são sistemas não reativos, os balanços de massa para as duas fases são dados pelas Equações 3.1 e 3.2.

Para a fase fluida:

$$[Acúmulo] + [convecção] = [Dispersão] + [transferência de massa interfacial]$$

$$\frac{\partial Y}{\partial t} + u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{AY} \frac{\partial Y}{\partial h} \right) + \frac{J(X,Y)}{\rho_F \varepsilon} \quad (3.1)$$

Para a fase sólida:

$$[Acúmulo] = [Difusão] + [transferência de massa interfacial]$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial h} \left(D_{AX} \frac{\partial X}{\partial h} \right) - \frac{J(X,Y)}{(1-\varepsilon)\rho_S} \quad (3.2)$$

Onde: X e Y são as razões de massa de soluto na fase sólida e fluida, respectivamente, ($M M^{-1}$), t é o tempo de extração (T), u é a velocidade intersticial do solvente ($M T^{-1}$), h é a coordenada axial no leito de extração (L), D_{AY} é o coeficiente de dispersão axial na fase fluida ($L^2 T^{-1}$), D_{AX} é o coeficiente de difusão axial na fase sólida ($L^2 T^{-1}$), ε é a porosidade do leito, ρ_F e ρ_S são as densidades do solvente e do sólido, respectivamente, ($M L^{-3}$), e $J(X,Y)$ é a taxa de transferência de massa na interface sólido-fluido ($M L^{-3} T^{-1}$).

Pela integração das equações diferenciais obtêm-se os perfis de concentração para ambas as fases fluida e sólida e a curva de extração, em função do tempo, pode ser construída a partir dos dados de concentração do soluto no solvente na saída da unidade de extração (REVERCHON & MARCO, 2006).

Para o desenvolvimento desses modelos fenomenológicos, ou seja, que consideram os balanços de massa para as fases fluida e sólida, são requeridos dados cinéticos e de equilíbrio, assim como características da matriz vegetal. Devido à complexidade destas informações, modelos simplificados foram adotados por vários autores no processo de extração supercrítica (MELO *et al.*, 2014).

São exemplos de modelos simplificados, os propostos por TAN & LIOU (1989) e MARTÍNEZ *et al.* (2003). Os primeiros autores propuseram o chamado modelo de dessorção, que despreza a dispersão axial e considera a variação da concentração da fase sólida com o tempo como uma equação cinética de primeira ordem, cujo parâmetro k_d é a constante de dessorção e único parâmetro ajustável do modelo. O modelo logístico de MARTÍNEZ *et al.* (2003) considera desprezíveis o acúmulo e dispersão na fase fluida por serem insignificantes em relação ao efeito convectivo. Os autores descrevem o termo de transferência de massa interfacial como uma função logística que depende da composição do extrato durante o processo da extração supercrítica.

Embora estes modelos tenham utilidade na obtenção de informações fenomenológicas, somente abordagens mais amplas permitem uma compreensão mais completa e real do processo de separação. Dentre esses modelos, o proposto por SOVOVÁ (1994), com o conceito de células quebradas e intactas, é um dos mais empregados para descrever as curvas de extração supercrítica (SILVA & MARTÍNEZ, 2014) e, portanto, será descrito neste trabalho.

A maioria das matérias-primas vegetais passa por um pré-tratamento antes da extração supercrítica, como moagem ou esmagamento, com a finalidade a redução do tamanho das partículas e aumento da superfície de contato entre o sólido e solvente. Durante esse processo, parte das paredes

celulares é rompida, deixando seu conteúdo facilmente acessível pelo solvente de extração, e outra parte permanece intacta, ou seja, com soluto de difícil acesso. Dessa forma, a concentração inicial de soluto no sólido (X_0) é dividida entre o soluto que se encontra na superfície das partículas sólidas (X_p), e o soluto contido no interior do sólido (X_k).

Portanto, o processo de extração pode ser dividido em três etapas (Figura 3.4), controladas por diferentes mecanismos de transferência de massa. No primeiro período, (*CER*), considera-se que as superfícies das partículas estão cobertas com o soluto de fácil acesso, de modo que a extração ocorre rapidamente à uma taxa constante, controlada pela transferência de massa por convecção. No segundo período, (*FER*), ocorre uma redução na taxa de extração devido ao esgotamento do soluto de fácil acesso e início da extração do soluto de difícil acesso. Nesta etapa, a extração ocorre pelos mecanismos de convecção e difusão no interior do sólido. Na última etapa, (*DC*), somente o soluto contido nas células intactas está disponível para a extração, sendo então, a transferência de massa baixa e limitada pela difusão intrapartícula.

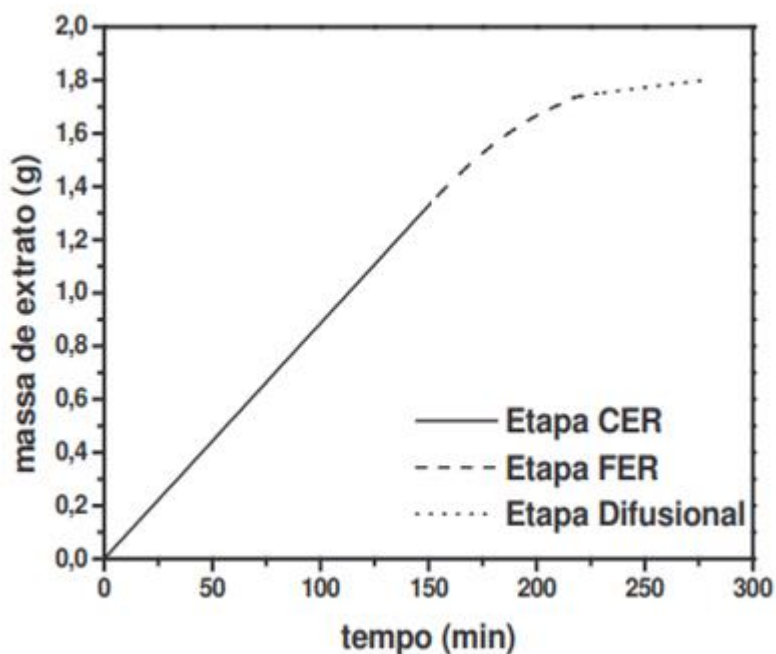


Figura 3.4 – Curva típica da extração supercrítica com as três etapas do processo (Adaptado de MARTÍNEZ, 2005).

No modelo de SOVOVÁ (1994), balanços de massa são utilizados para descrever o escoamento axial do solvente através de um leito fixo com seção transversal cilíndrica. Os parâmetros de temperatura, pressão e as propriedades físicas do solvente são considerados constantes ao longo de todo o processo de extração. O leito é assumido ser homogêneo quanto à concentração inicial de soluto e distribuição de tamanho de partícula e o solvente entra puro no extrator.

A autora despreza nas equações diferenciais de balanço de massa os termos referentes ao acúmulo do soluto no solvente, à dispersão axial e à difusão na fase sólida, por considerá-los insignificantes quando comparados à transferência de massa por convecção na fase fluida. Desta forma, as equações de balanço de massa para as duas fases, fluida e sólida, são dadas , respectivamente, pela Equações 3.3 e 3.4.

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X,Y)}{\rho_F \varepsilon} \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = - \frac{J(X,Y)}{\rho_s (1-\varepsilon)} \quad (3.4)$$

O termo de transferência de massa interfacial, $J(X,Y)$, é descrito pelas Equações 3.5 e 3.6, aplicadas, respectivamente, quando $X > X_K$ e $X \leq X_K$.

$$J(X,Y) = k_F a \rho_F (Y_s - Y) \quad (3.5)$$

$$J(X,Y) = k_s a \rho_s X \left(1 - \frac{Y}{Y_s}\right) \quad (3.6)$$

Onde: Y_s é a solubilidade do soluto no solvente ($M M^{-1}$), e $k_F a$ e $k_S a$ são, respectivamente, os coeficientes volumétricos de transferência de massa nas fases do solvente e sólido (T^{-1}).

E as condições iniciais e de contorno são, respectivamente:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (3.7)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (3.8)$$

A resolução das Equações 3.3-3.8, do balanço de massa para as fases sólida e fluida, em conjunto com as Equações 3.9, 3.10 e 3.11 (que fornecem a massa extraída em função do tempo) resulta na curva cinética do modelo:

Para $t < t_{CER}$:

$$m(t) = \dot{m}_F Y_S t [1 - \exp(-Z)] \quad (3.9)$$

Para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$:

$$m(t) = \dot{m}_F Y_S \left[t - t_{CER} \exp \left(\frac{ZY_S}{WX_0} \ln \left\{ \frac{1}{1-r} \left(\exp \left(\frac{W\dot{m}_F}{m_s} \right) (t_{CER} - t) - r \right) \right\} - Z \right) \right] \quad (3.10)$$

Para $t > t_{FER}$:

$$m(t) = m_s \left[X_0 - \frac{Y_s}{W} \ln \left\{ 1 + \left(\exp \left(\frac{WX_0}{Y_s} \right) - 1 \right) \exp \left(\frac{W\dot{m}_F}{m_s} \right) (t_{CER} - t)r \right\} \right] \quad (3.11)$$

Em que:

$$Z = \frac{k_F a m_s \rho_F}{\dot{m}_F \rho_S} \quad (3.12)$$

$$W = \frac{m_s k_S a}{\dot{m}_F (1 - \varepsilon)} \quad (3.13)$$

$$t_{CER} = \frac{(1-r)m_s X_0}{Y_s Z \dot{m}_F} \quad (3.14)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_s}{W \dot{m}_F} \ln \left[r + (1-r) \exp \left(\frac{WX_0}{Y_s} \right) \right] \quad (3.15)$$

Onde: $\dot{m}_F$ é a vazão mássica de solvente ($M T^{-1}$), X_0 é a concentração inicial do óleo na matriz sólida ($M M^{-1}$), m_s é a massa de sólido isenta de óleo (M), r é a fração de óleo facilmente acessível (X_p / X_0), t_{CER} é o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (T), t_{FER} é o tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (T), Z e W são os parâmetros adimensionais do modelo.

3.3.3 Extração com líquidos pressurizados – PLE

A extração com líquidos pressurizados (PLE - *Pressurized Liquid Extraction*), também conhecida como extração acelerada com solvente (ASE – *Accelerated Solvent Extraction*), extração com fluido pressurizado (PFE – *Pressurized fluid extraction*), extração com solvente pressurizado e aquecido (PHSE – *Pressurized hot solvent extraction*), extração com água subcrítica (SWE – *Subcritical water extraction*), entre outras designações (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005), é uma técnica que envolve altas temperaturas e pressões, sempre abaixo do seu ponto crítico, de modo que o solvente se mantenha no estado líquido durante o processo (HERRERO *et al.*, 2013). É uma alternativa aos métodos convencionais e, apresenta como principais vantagens, a redução no tempo de extração (5–30 min) e no consumo de solventes e ainda, a facilidade de ser automatizada (ZAIBUNNISA *et al.*, 2009).

A temperatura é o principal fator que afeta a eficiência e seletividade da extração com líquidos pressurizados (OSORIO-TOBÓN & MEIRELES, 2013). O uso de altas temperaturas, geralmente entre 40-200 °C, reduz a viscosidade e tensão superficial do solvente, o que aumenta a molhabilidade da amostra e solubilização dos compostos. Também favorece a quebra das interações entre analitos e matriz, além de aumentar os coeficientes de difusão, e consequentemente, as taxas de transferência de massa (MENDIOLA *et al.*, 2007).

Embora a pressão não seja uma variável de grande influência nos resultados da PLE, devido à incompressibilidade dos líquidos, valores altos o suficiente para que o solvente se mantenha no estado líquido com o uso de temperaturas acima do ponto de ebulição, são necessários. Altas pressões também podem facilitar a extração de compostos localizados dentro dos poros da matriz, devido à maior penetração do solvente (MUSTAFA & TURNER, 2011). Devido a essas razões, geralmente são empregadas pressões entre 50 e 100 bar (SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2017).

A PLE pode ser realizada em modo estático ou dinâmico. No primeiro, um volume de solvente, nas condições desejadas de pressão e temperatura, é mantido em contato com a amostra no leito de extração por um determinado

período de tempo. Após, a válvula de saída é aberta, liberando a mistura de solvente e extrato. Na condição estática, é possível que ocorra o equilíbrio entre os componentes da amostra já solubilizados no solvente e os ainda ligados à matriz, sendo que a eficiência da extração não é aumentada a partir deste ponto (HERRERO *et al.*, 2013). Neste caso, uma solução é o emprego de ciclos de extração, em que o extrator é novamente pressurizado com solvente limpo (MUSTAFA & TURNER, 2011). Na extração dinâmica, o solvente limpo é continuamente introduzido no extrator, mantendo-se a válvula de saída aberta, o que evita a saturação do solvente e possibilita que maiores rendimentos sejam obtidos.

A possibilidade da PLE ser realizada sob uma atmosfera inerte e na ausência de luz (PALMA *et al.*, 2001), juntamente às outras vantagens já citadas, justifica o amplo uso recente da técnica na extração de bioativos de matrizes naturais, tais como flavonóides (ZHANG *et al.*, 2008; SØLTOFT, *et al.*, 2009; WIANOWSKA & DAWIDOWICZ, 2016), antocianinas (LIAZID *et al.*, 2014, FEUEREISEN *et al.*, 2017; GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017), ácidos fenólicos e outros polifenóis (ÇAM & HIŞİL, 2010), saponinas (SARAVANA *et al.*, 2016) e óleos essenciais (DAWIDOWICZ *et al.*, 2008; ZAIBUNNISA *et al.*, 2009; BERMEJO *et al.*, 2015), representando uma grande vantagem quando os compostos são sensíveis à degradação oxidativa.

3.3.4 Extração com solvente assistido por ultrassom

O uso do ultrassom tem sido considerado uma inovadora e promissora técnica no século 21, com diversas aplicações na área farmacêutica, cosmética, química e alimentícia (ROSTAGNO & PRADO, 2013). No caso da extração sólido-líquido, a adição do ultrassom como fonte de energia pode acelerar a extração (DAI *et al.*, 2010), permitindo a obtenção de elevados rendimentos com redução do tempo de extração e consumo de solvente em relação aos métodos convencionais (CHEMAT *et al.*, 2017, VINATORU *et al.*, 2017). É um método simples e versátil, de investimento relativamente baixo e eficiente na obtenção de vários produtos de importância comercial, tais como óleos essenciais,

polissacarídeos, proteínas, corante, pigmentos, moléculas bioativas, entre outros (TIWARI, 2015).

Ultrassons são ondas mecânicas que necessitam de um meio elástico para se propagar e se diferenciam do som audível devido à sua frequência (PICÓ, 2013). Sons audíveis pelos seres humanos são os de frequência compreendida entre 16 Hz e 20 kHz, enquanto as frequências ultrassônicas estão entre 20 kHz e 10 MHz (CHEMAT *et al.*, 2011).

Ao ser propagada em um meio líquido, a onda de ultrassom induz a ocorrência de fases de compressão e descompressão, resultando em um deslocamento longitudinal das moléculas que o compõe (SORIA & VILLAMIEL, 2010). Durante os ciclos de compressão, as moléculas do meio podem colidir entre si e, nas fases de descompressão, a intensidade é alta o suficiente para superar suas forças de atração, possibilitando a formação de bolhas de gás entre as moléculas, as chamadas bolhas de cavitação (PINGRET *et al.*, 2013).

As bolhas de gás formadas nessas regiões têm maior área superficial durante o ciclo de expansão, o que aumenta a difusão de gás, fazendo-as expandir. Quando o tamanho da bolha chega a um nível crítico, ela colapsa no ciclo de compressão, liberando grandes quantidades de energia (CHEMAT *et al.*, 2011; PICÓ, 2013). O colapso da bolha produz um intenso e muito curto aquecimento local, com temperaturas até aproximadamente 5000 K e pressões estimadas de 50-1000 atm (SORIA & VILLAMIEL, 2010; CHEMAT *et al.*, 2017), o que implica a existência de taxas de aquecimento e resfriamento extremamente elevadas, $>10^9 \text{ K s}^{-1}$ (SILLANPÄÄ *et al.*, 2011).

Quando as bolhas colapsam sobre a superfície de um material sólido, a alta temperatura e pressão geram microjatos de solvente voltados para a superfície sólida, e é este o fenômeno aplicado na extração de compostos vegetais. Como mostrado na Figura 3.5, uma bolha de cavitação é gerada próxima da superfície do material vegetal (a), a bolha entra em colapso durante um ciclo de compressão (b), liberando um microjato voltado para o sólido (b e c). A alta pressão e temperatura envolvidas neste processo são capazes de destruir as paredes celulares da matriz vegetal e o seu conteúdo é liberado para o meio líquido (d) (CHEMAT *et al.*, 2011; VINATORU *et al.*, 2017).

O aumento da pressão favorece a penetração e transporte do solvente, enquanto o incremento na temperatura melhora a solubilidade e difusividade (SHIRSATH *et al.*, 2012; PICÓ, 2013). As ondas de ultrassom podem ainda, causar um aumento nos poros da parede celular, o que melhora o processo de difusão e, portanto, reforça a transferência de massa (VINATORU, 2001).

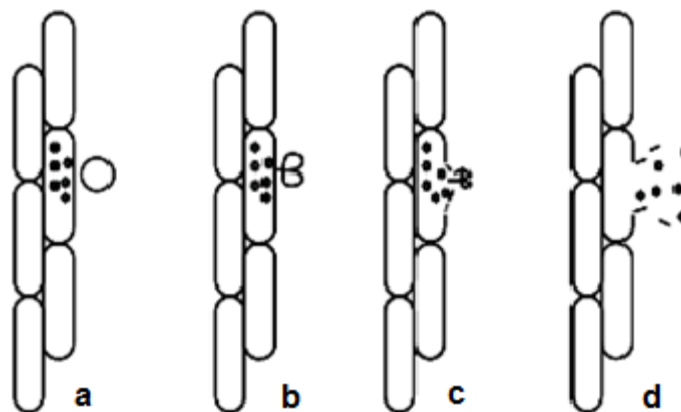


Figura 3.5 – Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo da planta (CHEMAT *et al.*, 2011).

Na extração de matrizes vegetais, dois tipos de equipamentos de ultrassom são comumente empregados em escala laboratorial; o ultrassom de banho, no qual a amostra fica em contato indireto com as ondas ultrassônicas, e o de sonda, de contato direto. No primeiro, a intensidade do ultrassom é baixa, devido à atenuação causada pela água e paredes do recipiente no qual a amostra está contida. Já as sondas de ultrassom garantem uma cavitação mais eficiente do líquido devido à localização da energia na zona de amostra (MASON *et al.*, 1996). O ultrassom de sonda é amplamente utilizado para a sonicação de pequenos volumes de amostra, sendo considerado um sistema poderoso na extração sólido-líquido. Uma desvantagem é o rápido aumento da temperatura, devendo esta ser controlada (PICÓ, 2013; CHEMAT *et al.*, 2017).

Muitos fatores estão relacionados à eficiência do processo de extração utilizando o ultrassom, tais como, características da planta (umidade e tamanho de partícula), tipo de solvente, e as variáveis do processo (frequência, temperatura, tempo e intensidade de sonicação) (WANG & WELLER, 2006). Em relação à frequência, de acordo com o aumento desta variável menor a produção

e intensidade da cavitação (AMEER *et al.*, 2017) e seu efeito na extração como forma de melhorar a transferência de massa somente é considerável para frequências de 18 a 40 kHz, e praticamente desprezível em frequências de 400-800 kHz (CRAVOTTO *et al.*, 2008). Intensidades ultrassônicas superiores a 1 W cm^2 com frequência entre 18 e 100 KHz são as capazes de alterações na matéria-prima, como a ruptura celular (DOLATOWSKI *et al.*, 2007).

De forma geral, a aplicação do ultrassom representa uma tecnologia atrativa com grande potencial exploração comercial de plantas aromáticas (VELIČKOVIĆ *et al.*, 2010), e tem como principal vantagem a redução drástica do tempo de extração e volume de solventes utilizados (YANG *et al.*, 2010), e consequentemente apresenta um menor custo em termos energéticos. Outra importante vantagem é a possibilidade de extração de compostos sensíveis ao calor com elevado rendimento empregando baixas temperaturas, ou seja, sob condições não favoráveis à extração pelos métodos convencionais (HEMWIMOL *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2008; JADHAV *et al.*, 2009; TIWARI, 2015).

3.4 Atividade antioxidante

Extratos de plantas constituídos de compostos bioativos, assim como o α -bisabolol da candeia, têm grande aplicação como aditivos em produtos alimentícios ou na produção de cosméticos e medicamentos. Atualmente, mais de 80 % dos compostos ativos em alimentos e mais de 30 % dos medicamentos são produzidos a partir de bioativos naturais (LAGOS *et al.*, 2015). Estes, geralmente compreendem os componentes minoritários da planta, tais como terpenos ou terpenóides, compostos fenólicos, pigmentos, vitaminas, fibras, enzimas, minerais, entre outros (AZMIR *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2016a). Desses compostos, os que possuem caráter antioxidante são de crescente interesse para a conservação de alimentos e na proteção do corpo humano contra as doenças associadas ao estresse oxidativo (SHAHIDI & ZHONG, 2015).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, têm a capacidade de atrasar ou prevenir a oxidação deste substrato (HALLIWELL, 1990). O termo substrato

oxidável inclui todas as moléculas orgânicas encontradas *in vivo*, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Nos processos metabólicos das células, continuamente são produzidos radicais livres a partir dos elementos oxigênio, nitrogênio e enxofre, sendo estes denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (CAROCHO & FERREIRA, 2013). Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons não emparelhados altamente instáveis e ativos para a ocorrência de reações químicas com outras moléculas (HALLIWELL, 2007), não apenas no corpo humano, mas praticamente em todos os organismos vivos e sistemas biológicos, sendo muito comum nos alimentos, principalmente os ricos em lipídios (SHAHIDI & ZHONG, 2015).

Devido à constante exposição ao oxigênio, as espécies ROS, que incluem os radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, ânion superóxido, entre outros, são as principais geradas no corpo humano. Em condições normais, o mecanismo de defesa fisiológico, pela ação dos antioxidantes sintetizados no organismo (endógenos), é capaz de controlar seus efeitos. No entanto, o desequilíbrio entre esse balanço, com uma produção excessiva de ROS, leva à oxidação uma variedade de biomacromoléculas, como enzimas, proteínas, DNA e lipídios, situação chamada de estresse oxidativo (AMES *et al.*, 1993; RAHMAN, 2007).

O estresse oxidativo, favorecido pelos fatores externos ao metabolismo, como a poluição, pesticidas, radiações, uso de drogas, entre outros, tem sido relacionado ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios renais e hepáticos, hipertensão arterial, doença de Alzheimer, Parkinson, lúpus, úlceras gástricas, entre outras (RAHMAN, 2007; LOBO *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010). Assim, apesar de sua eficiência, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente para manter baixas as concentrações de radicais livres e, portanto, há a necessidade do consumo dos antioxidantes exógenos (CAROCHO *et al.*, 2018), como os compostos fenólicos, vitaminas, carotenóides, minerais e compostos organossulfurados, sendo as principais fontes desses compostos as frutas e vegetais (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são os principais antioxidantes inseridos na dieta humana, encontrados em frutas, vegetais, sucos, chás, vinhos, entre outros (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Derivam do metabolismo secundário das plantas e, estruturalmente, compreendem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilas, variando desde moléculas simples até compostos polimerizados.

A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada à capacidade destes em eliminar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio e elétrons, além disso, inibem sua formação pela quelação de metais. Devido à ampla diversidade estrutural, esses compostos são divididos em classes, sendo as principais representadas pelos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (CONG-CONG *et al.*, 2017).

São diversos os ensaios analíticos desenvolvidos para estimar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos obtidos de matrizes vegetais. Segundo o mecanismo das reações químicas envolvidas, estes são classificados em duas categorias (HUANG *et al.*, 2005), os baseados na transferência de átomo de hidrogênio (HAT - *Hydrogen Atom Transfer*) e os de transferência de um elétron (SET - *Single Electron Transfer*). Os ensaios HAT medem a capacidade do antioxidante em eliminar os radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio, enquanto os métodos baseados no mecanismo SET detectam a capacidade do antioxidante em transferir um elétron para reduzir o agente oxidante, incluindo os radicais livres, compostos carbonílicos e metais (PRIOR *et al.*, 2005).

Os métodos SET envolvem dois componentes na mistura de reação, os antioxidantes e oxidantes (também chamados de sonda). Ao abstrair um elétron do antioxidante, a cor da sonda oxidante é alterada, permitindo mensurar a reação e determinar a capacidade antioxidante da amostra através da absorbância em espectrofotômetro (CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011). Dentre estes, estão incluídos os ensaios mais populares para a determinação da capacidade antioxidante de extratos vegetais, tais como o de fenólicos totais com o reagente de Folin-Ciocalteu, o ensaio de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o teste de redução de íons férricos (FRAP).

Embora tenha sido inicialmente destinado à análise de proteínas, o reagente amarelo de Folin-Ciocalteu foi estendido por SINGLETON & ROSSI (1965) para a determinação do conteúdo fenólico em vinhos. O método baseia-se na redução do reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas do antioxidante em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul, com máximo de absorbância em aproximadamente 760 nm. É um ensaio simples, sensível, reprodutível e, por isso, tem sido empregado há anos na rotina das análises de compostos fenólicos em extratos de plantas (AINSWORTH & GILLESPIE, 2007; SANCHEZ-RANGEL, 2013).

O método DPPH é baseado na capacidade do antioxidante em reduzir o radical DPPH[•], um dos poucos radicais de nitrogênio orgânicos estáveis, coloridos e disponíveis comercialmente (PRIOR *et al.*, 2005). O reagente é solúvel em solventes orgânicos e, em etanol, apresenta uma banda de absorção máxima em aproximadamente 517 nm, sendo possível o monitoramento do progresso da reação com o antioxidante pela medida da perda da coloração violeta.

Originalmente desenvolvido por BENZIE & STRAIN (1996) para avaliar a capacidade de redução férrica do plasma, o ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) foi adaptado para a determinação da atividade antioxidante em plantas. O método está baseado na redução do íon Fe³⁺ a Fe²⁺ presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), com consequente alteração da cor da mistura reacional para azul, que pode ser monitorada a 595 nm.

Devido aos diferentes mecanismos de reação dos métodos, a atividade antioxidante de uma amostra não deve ser concluída a partir dos resultados de um único método *in vitro*, sendo recomendada a avaliação por pelo menos dois para assegurar resultados confiáveis (SCHLESIER *et al.*, 2002; PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008). Os métodos DPPH e FRAP são uns dos mais utilizados na avaliação da atividade antioxidante de substâncias naturais devido a sua simplicidade, baixo custo e obtenção rápida dos resultados (HUANG *et al.*, 2005; LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013).

3.5 Considerações parciais

A revisão da literatura apresentou características da candeia (*Eremanthus erythropappus*), uma árvore nativa conhecida pelo seu principal produto, o óleo essencial rico em α -bisabolol, um sesquiterpeno de alto valor empregado na indústria farmacêutica e de cosméticos.

A extração de óleos por tecnologias não convencionais, com CO₂ supercrítico, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom, apresenta-se como uma alternativa ao método de destilação, usualmente empregado pelas indústrias para a obtenção de óleos essenciais. Na extração supercrítica, além de elevados rendimentos, a técnica é considerada limpa, pois o solvente é removido do extrato pela despressurização do sistema. A pressurização de solvente líquido, bem como o uso do ultrassom, tem como principais vantagens a redução no tempo de extração e no consumo de solvente, com obtenção de elevados rendimentos.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa avaliar métodos não convencionais de extração do óleo de candeia (tecnologia supercrítica com CO₂ e cossolventes, líquidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom), bem como a caracterização dos óleos obtidos. Além disso, avaliar a re-extração do óleo do resíduo industrial empregando CO₂ supercrítico.

A literatura apresenta a utilização do CO₂ supercrítico na extração do óleo da candeia. No entanto, as informações sobre caracterização do óleo são escassas, notadamente quanto à composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana. O presente trabalho também se destina ao estudo da re-extração e caracterização do óleo do resíduo industrial, visto que, para este material não foram encontrados informações a respeito. Dessa forma, um estudo mais completo a respeito do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial pode conduzir a novas aplicações destes produtos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Madeira de candeia e resíduo industrial

Os cavacos de madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*), lotes I (02/2013) e II (03/2015), e do resíduo industrial (material após a extração do óleo essencial por arraste a vapor) foram fornecidos pela empresa Citróleo Óleos Essenciais Indústria e Comércio Ltda (Torrinha – SP, Brasil).

4.1.2 Reagentes

Nas extrações foram utilizados os seguintes solventes: dióxido de carbono de alta pureza >99,9 % (White Martins) nas extrações supercríticas; álcool etílico absoluto (Panreac), acetato de etila (Anidrol) e n-hexano (Anidrol), nas extrações convencionais em Soxhlet, PLE e assistidas por ultrassom.

Os reagentes utilizados nas análises de fenólicos totais e capacidade antioxidante foram: Ácido gálico (Vetec), reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica), carbonato de sódio (Anidrol), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina), procedentes da Sigma Aldrich, cloreto férrico hexahidratado (Biotec), acetato de sódio trihidratado, sulfato férrico heptahidratado e persulfato de potássio (Neon). Ácido acético, ácido clorídrico e álcool etílico 99,5 % procedentes da Anidrol.

Nas análises de atividade antimicrobiana foram utilizados: caldo Mueller Hinton (Himedia), dimetilsulfóxido (Synth) e 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto (Dinâmica).

Na análise de α -bisabolol foi utilizado o padrão (-)- α -bisabolol (Sigma Aldrich) e os solventes hexano (Panreac), acetonitrila (Panreac) e ácido fosfórico 85 % (Sigma Aldrich), reagentes grau HPLC.

4.2 Preparação da madeira para a extração do óleo

Os cavacos da madeira de candeia e resíduo industrial foram secos em estufa a 40 °C por 12 h e moídos em triturador forrageiro (Trapp, TRF 400 Trapp). Após, o material foi classificado por peneiramento de acordo com a série Tyler (16-42 mesh), sendo utilizadas nos experimentos as frações retidas nas peneiras de 28 e 32 mesh, 30 e 70 %, respectivamente, que corresponderam às frações com maior quantidade de massa.

4.3 Caracterização da matéria-prima

4.3.1 Teor de umidade e substâncias voláteis

A determinação da umidade das amostras foi realizada por meio do método gravimétrico que se baseia na perda de umidade e substâncias voláteis quando a amostra é submetida a 105 °C (AOAC, 2012). Foram pesados aproximadamente 2 g de amostra em placa de petri e, esta colocada em estufa a 105 °C por 3 horas, sendo posteriormente acondicionada em dessecador com sílica gel até atingir a temperatura ambiente e pesadas. O procedimento foi repetido até a massa ficar constante e o teor de umidade e voláteis calculado pela diferença entre a massa antes e após a secagem. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Diâmetro médio da partícula

O diâmetro médio das partículas de madeira utilizadas nos experimentos, correspondentes às frações mássicas retidas nas peneiras, foi estimado de acordo com GOMIDE (1983), dado pela Eq. 4.1.

$$d_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{m_i / M}{\overline{d_i}}}{\sum_{i=1}^n \frac{m_i / M}{\overline{d_i}^3}}} \quad 4.1$$

Em que: d_p é o diâmetro médio superficial das partículas (m); $\overline{d_i}$ é o diâmetro médio da abertura da peneira (m); m_i é a massa da amostra retirada na peneira i (g); M é a massa total de amostra (g) e n é o número total de frações.

4.3.3 Densidade real

A determinação da densidade da madeira de candeia, ρ_s , já triturada e peneirada, foi realizada em picnômetro (Micromeritics®, modelo Accupyc 1330) utilizando gás hélio, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. O resultado final de densidade real foi obtido pela média de 10 determinações.

4.4 Extrações do óleo

Nesta seção serão apresentados os procedimentos das extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial com dióxido de carbono em condições supercríticas, bem como das extrações do óleo de candeia com CO₂ supercrítico adicionado dos cossolventes etanol e acetato de etila. Além destes, serão descritas as metodologias para obtenção dos extratos da madeira com solventes orgânicos pelas técnicas Soxhlet, extração com líquidos pressurizados (PLE) e ultrassom. O lote I de cavacos de candeia somente foi empregado nas extrações com CO₂ puro, em que foram avaliados os efeitos da pressão e temperatura no rendimento de óleo e teor de α -bisabolol.

4.4.1 Extrações com CO₂ supercrítico

As extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial com CO₂ foram realizadas em uma unidade de extração de escala laboratorial do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), da UFPR, campus Politécnico. O módulo constitui de um reservatório para o solvente, uma bomba seringa (Isco, 500D) e dois banhos termostáticos - o primeiro (Julabo, F25-ME) com a finalidade de resfriar o fluido na bomba seringa e o segundo (Quimis, Q214M2) para manter o extrator aquecido nas temperaturas desejadas, e um extrator de aço inox com capacidade de aproximadamente 80 cm³ (diâmetro de 2,52 cm e altura de 16 cm).

Empregou-se um planejamento experimental completo 2² com triplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis temperatura e pressão no rendimento da extração. Os experimentos foram conduzidos em temperaturas de 40, 55 e 70 °C, pressões de 160, 200 e 240 bar e vazão mássica de 1,96 x 10⁻³ (± 0,03) kg min⁻¹. Em cada experimento, o extrator foi preenchido com aproximadamente 29 g do material triturado. O óleo extraído foi coletado em frasco âmbar e sua massa determinada a cada 10 minutos durante 120 minutos de extração. Os rendimentos foram calculados pela razão entre a massa do óleo extraída e a massa de madeira utilizada (base úmida). Os dados experimentais foram analisados utilizando o StatisticaTM, versão 7.0, software (Statsoft) a 5 % de significância.

A solubilidade do óleo no solvente foi calculada pelo método dinâmico. No início da extração, considera-se que, devido à extração da fração de óleo de fácil acesso, o solvente que sai do extrator está saturado e, portanto, sua concentração é igual à concentração de equilíbrio. Assim, os valores da solubilidade foram calculados a partir da inclinação da parte linear das curvas de extração, conforme a Equação 4.2.

$$Y_s = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{solvente}}} \quad (4.2)$$

Onde:

Y_s : solubilidade do óleo no solvente (g g^{-1});

$m_{\text{óleo}}$: massa total de óleo obtido no início da extração, durante a etapa de taxa constante (g);

m_{solvente} : massa de solvente consumido no início da extração, referente à parte inicial (linear) da curva de extração (g).

4.4.2 Extrações com CO_2 + cossolventes

A partir dos resultados de rendimento e concentração de α -bisabolol das extrações do óleo de candeia com CO_2 supercrítico, selecionou-se uma condição de temperatura e pressão para a realização das extrações com a mistura de CO_2 supercrítico e os cossolventes etanol e acetato de etila. Os experimentos foram realizados com CO_2 puro e com a adição de 1, 3 e 5 % v/v dos cossolventes, em modo contínuo. As concentrações foram selecionadas com base em outros estudos (MICHIELIN *et al.*, 2009; BERMEJO *et al.*, 2016; GUINDANI *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2016b), nos quais aumentos significativos no rendimento foram obtidos com o uso de pequenas quantidades destes solventes modificadores (≤ 5 %) ao CO_2 .

Os experimentos foram realizados em um módulo experimental (representado na Figura 4.1), do Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Equilíbrio de Fases da UEM, constituído de duas bombas seringa (Isco, modelo 500D), uma para o CO_2 e outra para o solvente orgânico, dois banhos termostáticos (Quimis, Q214M2), um para controle da temperatura das bombas e outro para controle de temperatura do extrator, e um extrator de aço inox com capacidade de aproximadamente 58 cm^3 (diâmetro de 1,95 cm e altura de 19,4 cm).

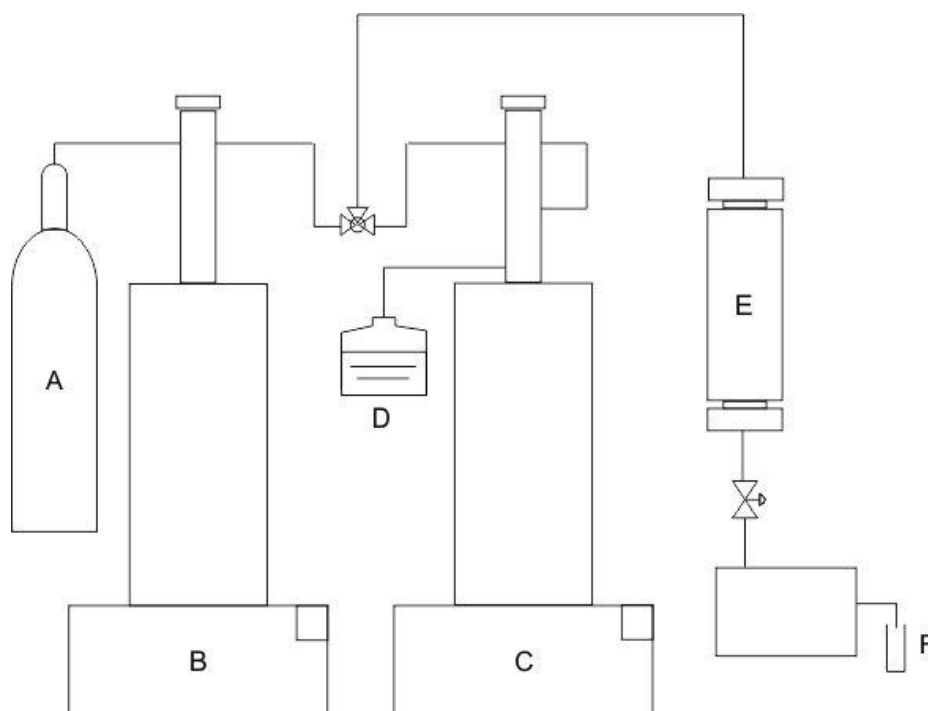


Figura 4.1 – Representação do módulo de extração supercrítica. (A): cilindro de CO₂; (B): bomba seringa do CO₂; (C): bomba seringa do cossolvente; (D): reservatório do cossolvente; (E): leito de extração; (F): frasco coletor do óleo.

As extrações foram conduzidas com vazão mássica de $2,05 \times 10^{-3} (\pm 0,01) \text{ kg min}^{-1}$ da mistura de solventes (CO₂ + etanol/acetato de etila). Em cada experimento, o extrator foi preenchido com aproximadamente 19 g do material triturado. O óleo extraído foi coletado em frasco âmbar e sua massa determinada a cada 10 minutos durante 120 minutos de extração total. Os experimentos foram realizados em duplicata e o rendimento dado pela média $\pm$ desvio padrão.

A densidade da mistura CO₂+cossolventes foi calculada pela equação de estado de Peng Robinson com regra de mistura quadrática de van der Waals (vdW2) (PENG & ROBINSON, 1976), apresentada no Anexo I.

4.4.3 Extrações com solventes orgânicos – Soxhlet

As extrações em aparato Soxhlet foram realizadas com os solventes orgânicos n-hexano, acetato de etila e etanol, índices de polaridade de 0,0, 4,4 e

5.2, respectivamente (PHENOMENEX, 2010). Aproximadamente 10 g da madeira triturada foram submetidos à extração por 6 horas com os solventes (250 mL) nas suas respectivas temperaturas de ebulição. O tempo foi selecionado com base em outros trabalhos que também empregaram a técnica (BISCAIA & FERREIRA, 2009; QUEIROZ & CAJAIBA, 2016; ESPINOSA-PARDO *et al.* 2017). Após a extração, a mistura de solvente e extrato foi concentrada em rotaevaporador (IKA, RV 10 Control) e levada à estufa a 60 °C para remoção do solvente residual. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.4.4 Extrações com líquidos pressurizados – PLE

As extrações PLE, em modo contínuo, foram realizadas em uma unidade experimental constituída basicamente de um reservatório do solvente, uma bomba de líquido de alta pressão (Waters, 515), uma coluna de aço inox de 14,3 cm³ (7,8 mm de diâmetro e 30 cm de comprimento), aquecida por resistências elétricas, e uma válvula micrométrica de controle de pressão no final do extrator.

Em cada extração, o extrator foi preenchido com aproximadamente 5 g da madeira de candeia triturada para formar o leito, suportado por um filtro de aço inox com diâmetro de poro de 2 µm para evitar a passagem das partículas. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 40, 55 e 70 °C e pressão constante de 100 bar, assim como também empregada nos trabalhos de GARCIA-MENDOZA *et al.* (2017) e TRENTINI *et al.* (2017). O solvente (etanol, acetato de etila e n-hexano) foi bombeado à vazão volumétrica de 2 mL min⁻¹ e, imediatamente após o sistema atingir a pressão de 100 bar, a válvula de controle de pressão foi aberta para coleta da amostra. O extrato foi recolhido em frasco âmbar durante 20 min de extração total. Os experimentos foram realizados em duplicata e o rendimento dado pela razão entre extrato e massa inicial de madeira (base úmida).

4.4.5 Extrações com solvente assistido por ultrassom

As extrações foram realizadas em um aparato experimental constituído de um ultrassom (Ultronique, QR500), equipado com uma ponteira de titânio de 13 mm de diâmetro, um reator encamisado de vidro com capacidade de 250 mL, conectado a um banho termostático (Quimis, Q214M2) para controle da temperatura de extração. A potência nominal do equipamento é de 500 W, podendo ajustada de 20 a 99 % do total, com frequência fixa de 20 kHz.

Empregou-se um planejamento experimental Box-Behnken com triplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis temperatura, razão volume de solvente/massa de madeira e potência sobre o rendimento das extrações. Os experimentos foram conduzidos em temperaturas de 40, 50 e 60 °C, razão volume/massa de 10, 15 e 20 mL g⁻¹ e amplitude de 30, 60 e 90 % da potência nominal máxima do equipamento, com volume fixo de n-hexano de 100 mL. O solvente foi selecionado a partir dos resultados das extrações Soxhlet e PLE.

Baseado no comportamento cinético realizado na condição referente ao ponto central do planejamento (50 °C, 15 mL g⁻¹ e 60 % de potência), o tempo de 7 minutos foi selecionado para todas as extrações. Após os experimentos, o solvente foi removido do óleo em rotaevaporador e as amostras armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração a aproximadamente 4 °C.

4.5 Caracterização do leite de partículas – extrações supercríticas

4.5.1 Densidade

A densidade do leite completado com a madeira triturada (ρ_{leito}) foi determinada a partir da relação dada pela Equação 4.3:

$$\rho_{leito} = \frac{m_S}{V_{leito}} \quad (4.3)$$

Em que:

m_s : massa de inerte, correspondendo à massa alimentada no extrator descontada a quantidade de óleo extraída (g);

V_{leito} : Volume total do leito (cm³).

4.5.2 Porosidade

A porosidade do leito (ε) foi determinada pela razão entre o volume de espaços vazios e seu volume total, empregando-se a Equação 4.4:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{leito}}{\rho_s} \quad (4.4)$$

Onde:

ρ_{leito} : densidade do leito (g cm⁻³);

ρ_s : densidade da madeira (g cm⁻³), determinada de acordo com seção 4.3.3.

4.6 Modelagem matemática das curvas cinéticas da extração supercrítica

As curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial com CO₂ supercrítico foram representadas pelo modelo matemático de SOVOVÁ (1994), descrito na seção 3.3.2.2.

No modelo de Sovová, o parâmetro r representa a fração de óleo facilmente disponível e depende do processo de preparação da matéria-prima, como moagem e peneiramento. O valor deste parâmetro foi considerado constante para conferir a ele significado físico, visto que o procedimento de pré-tratamento foi o mesmo para todo o material, e independe das condições de

extração. No ajuste deste parâmetro utilizou-se o método “golden search”, com a seguinte função objetivo:

$$F = \sum_{i=1}^{n_exp} \sum_{j=1}^N (m_{oil,i,j}^{Calc} - m_{oil,i,j}^{Exp}) \quad (4.5)$$

Os parâmetros adimensionais Z e W , que estão relacionados aos coeficientes de transferência de massa no filme externo e no sólido, respectivamente, foram determinados com o emprego do método de otimização multivariável Simplex Down-Hill (NELDER & MEAD, 1965) a partir da minimização da função objetivo dada pela Equação 4.6.

$$F = \sum_{j=1}^N (m_{oil,j}^{Calc} - m_{oil,j}^{Exp}) \quad (4.6)$$

Em que: $m_{oil,j}^{Calc}$ é a massa de óleo extraída obtida pelo modelo matemático; $m_{oil,j}^{Exp}$ é a massa de óleo obtida experimentalmente, n_exp é o número experimentos e N o número de pontos da curva cinética experimental.

4.7 Fracionamento do óleo de candeia e isolamento do α -bisabolol

O óleo de candeia, extraído com CO_2 a 70 °C e 240 bar, aproximadamente 2 g, foi submetido à cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh, Macherey-Nagel) e eluída com 100 mL de n-hexano, n-hexano:diclorometano (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), diclorometano, diclorometano:acetato de etila (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), acetato de etila, acetato de etila:etanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e etanol, obtendo-se 216 frações de aproximadamente 12 mL.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada - CCD (Silicagel 60 F254, Meck), empregando como fase móvel a solução n-hexano:éter

etílico (7:3 v/v). Para a revelação, borrifou-se o reativo de vanilina sulfúrica (vanilina 1 %, em etanol, adicionada a solução etanólica de ácido sulfúrico 5 %), seguido de aquecimento das placas a 100 °C até o desenvolvimento da coloração máxima (WAGNER & BLADT, 1996). As frações com similaridade de perfil na CCD foram reunidas em 9 grupos (F1-F9) e a fração F4, de maior pureza, foi submetida à análise de determinação da composição por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-EM.

4.8 Caracterização do óleo

4.8.1 Composição química

As análises para determinação da composição volátil dos óleos extraídos da madeira de candeia com CO₂ supercrítico puro e com a adição de 5 % dos cossolventes etanol e acetato de etila e pelos métodos Soxhlet e PLE com n-hexano, bem como dos óleos obtidos do resíduo industrial, foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) acoplado a espectrômetro de massas (Agilent 5977A Series GC/MDS) e equipado com uma coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent HP-5MS) e as condições utilizadas foram: temperatura inicial de 50 °C, aquecendo até 80 °C à 10 °C min⁻¹, aumentando até 180 °C à 5 °C min⁻¹ e até 250 °C à 15 °C min⁻¹, mantendo por 5 min nesta temperatura. A vazão do gás de arraste hélio foi de 1 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram de 280 e 310 °C, respectivamente, e o volume de injeção da amostra (20 mg mL⁻¹ em diclorometano) foi de 1 µL no modo Split 1:100. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massa com os da livreria NIST - *National Institute of Standards and Technology*.

4.8.2 Concentração de α-bisabolol

A concentração do sesquiterpeno α-bisabolol nas amostras extraídas da madeira de candeia e resíduo industrial foi determinado em cromatógrafo líquido

de alta eficiência LC-20AT com detector UV-vis SPD-20A, ambos da marca Shimadzu, equipado com uma coluna C18 de 4,6 mm x 250 mm x 5 µm. Utilizou-se um *loop* de 20 µL e o vazão de fase móvel (mistura acetonitrila:água:ácido fosfórico 80:19:1) de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático. O comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 200 nm, conforme RIBAS *et al.* (2014).

Para a quantificação foi construída uma curva de calibração com o padrão de (-)-α-bisabolol (Sigma Aldrich) com concentrações de 0,01 a 0,32 mg mL⁻¹ em hexano, que apresentou R²>0,99.

4.8.3 Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). Para a reação utilizou-se, uma alíquota de 0,3 mL da solução etanólica de óleo (1 mg mL⁻¹), 2,5 mL da solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10 % (v/v) e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5 % (m/v). Após agitação, a mistura foi deixada reagir por 2 horas a 50 °C na ausência de luz e, após, sua absorbância foi determinada em 760 nm. A quantificação foi determinada mediante a equação da reta da curva padrão de ácido gálico (10 a 100 µg mL⁻¹), e expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de óleo (mg GAE g⁻¹ de óleo). As amostras avaliadas foram as extraídas da madeira de candeia (lote I) com CO₂ supercrítico puro e com a adição de 5 % dos cossolventes etanol e acetato de etila (lote II) e as obtidas pelos métodos Soxhlet e PLE. As análises foram realizadas em triplicata.

4.8.4 Atividade antioxidante

Assim como na determinação do teor de fenólicos totais, as amostras selecionadas para as análises de atividade antioxidante foram as extraídas da madeira de candeia com CO₂ supercrítico (lote I), com CO₂ supercrítico e adição de 5 % dos cossolventes etanol e acetato de etila (lote II) e as extraídas pelos métodos Soxhlet e PLE com os solventes etanol, acetato de etila e n-hexano.

4.8.4.1 Redução do radical DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com MENSOR *et al.* (2001) e CHOI *et al.* (2002). Os óleos foram avaliados em diferentes concentrações (100-1500 µg mL⁻¹ em etanol). À 2,5 mL de cada amostra foi adicionado 1 mL da solução etanólica de DPPH 0,3 mM e após 30 minutos de reação a absorbância da mistura foi determinada em 517 nm. O α-bisabolol puro foi avaliado até a concentração de 10000 µg mL⁻¹. O controle negativo foi preparado pela mistura de 1 mL da solução DPPH 0,3 mM com 2,5 mL de etanol. Etanol foi utilizado como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade antioxidante foi determinada a partir da Equação 4.7.

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \cdot 100 \quad (4.7)$$

Os valores IC₅₀, concentração do óleo necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %, foram obtidos da regressão linear entre as concentrações utilizadas (abscissa) e a porcentagem da atividade antioxidante (ordenada).

4.8.4.2 FRAP – método de redução do ferro

O ensaio FRAP foi realizado segundo metodologia descrita por BENZIE & STRAIN (1996), com modificações. Uma alíquota de 90 µL da solução etanólica do óleo (1000 µg mL⁻¹) foi misturada com 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M pH 3,6, 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). A mistura foi incubada a 37 °C por 5 min e sua absorbância determinada em 595 nm utilizando como branco o reagente FRAP. O mesmo procedimento foi realizado para o α-bisabolol puro (10000 µg mL⁻¹). Uma curva padrão de sulfato ferroso (100–2000 µM) foi utilizada para determinação da capacidade antioxidante e os resultados expressos em µM Fe²⁺ por g de óleo.

4.8.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras (óleo da extração supercrítica a 70 °C e 240 bar e α -bisabolol, obtido do fracionamento do óleo) foi avaliada frente sete espécies bacterianas, incluindo quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e três Gram-negativas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (ATCC 06539), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 77736), empregando o método de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

As amostras foram diluídas em caldo Mueller Hinton (MH) com 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a concentração final de 10 mg mL⁻¹. Foram transferidos 100 µL de cada amostra para a microplaca contendo 100 µL de caldo MH e, em seguida, realizaram-se diluições seriadas (1:2), de modo a obter concentrações finais de 5000 a 39 µg mL⁻¹. Em cada poço da microplaca foram adicionados aproximadamente 5 x 10⁴ UFC. Utilizou-se DMSO 1 %, em caldo MH, como controle negativo, que não afetou o crescimento bacteriano, e Ampicilina como controle positivo para todas as bactérias testadas.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 18-24 h. Após, adicionaram-se 10 µL de uma solução 5 mg mL⁻¹ de 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto em cada poço da microplaca para verificar o crescimento microbiano. A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração das amostras que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano após o período de incubação.

4.9 Análise estatística

As diferenças significativas entre as médias dos resultados experimentais, $p < 0,05$, de rendimento, concentração de α -bisabolol, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram analisadas pelo teste Tukey, empregando programa computacional Statistica 8.0 (STATSOFT, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, primeiramente é apresentada a caracterização dos lotes I e II de madeira de candeia e do resíduo industrial. Também são apresentados e discutidos os resultados dos efeitos da temperatura e pressão no rendimento das extrações com CO₂ supercrítico, em que foram empregados o lote I de cavacos de candeia e o resíduo industrial. Posteriormente, empregou-se o lote II da madeira de candeia nas extrações com CO₂ supercrítico adicionado dos cossolventes etanol e acetato de etila, bem como nas extrações Soxhlet, com líquidos pressurizados e com solvente assistido por ultrassom, e os resultados obtidos são discutidos. Em seguida, são apresentados os resultados de caracterização dos óleos quanto à composição química, concentração de α -bisabolol e atividade antioxidante. Por fim, os resultados da atividade antibacteriana do óleo de candeia extraído com CO₂ supercrítico e do sesquiterpeno α -bisabolol, obtido do fracionamento do óleo por cromatografia em coluna.

5.1 Caracterização da madeira de candeia

A umidade da matriz vegetal é um dos parâmetros que afetam o rendimento e seletividade na extração supercrítica. Para a maioria das matérias-primas, um alto conteúdo de água é indesejável, pois esta age como uma barreira para a extração. No entanto, em alguns casos, a água expande a estrutura sólida facilitando a transferência de massa. Segundo relatos da literatura (MARTÍNEZ, 2008; IVANOVIC, *et al.*, 2011), a influência da umidade na transferência de massa e solubilidade é insignificante para valores entre 3 e 12 %.

Após secagem e trituração, a madeira de candeia empregada nas extrações apresentou teor de umidade de 5,42 % (lote I) e 4,63 % (lote II), e o resíduo industrial 3,53 %. A densidade real da matéria-prima foi de 1,44 g cm⁻³ e diâmetro médio de partícula (d_p) de $5,2 \times 10^{-4}$ m.

5.2 Extrações do óleo

5.2.1 Extrações com CO₂ supercrítico

Na Tabela 5.1 são apresentadas as condições experimentais de temperatura e pressão empregadas nas extrações do óleo de candeia (lote I) e do resíduo industrial, bem como a densidade do CO₂, a solubilidade (Y_s) do óleo no solvente (determinada pelo coeficiente angular da parte linear da curva de extração – g de óleo por kg de solvente) e o rendimento obtido em cada condição.

Tabela 5.1 - Condições experimentais e rendimentos das extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial empregando CO₂ supercrítico.

Experimento	Material	T (°C)	P (bar)	ρ_F^a (g cm ⁻³)	Y_s^b (g _{óleo} kg _{solvente} ⁻¹)	Rendimento (%)
1	Candeia	40	160	0,796	3,18	1,16
2		40	240	0,873	3,67	1,28
3		70	160	0,549	3,04	1,16
4		70	240	0,725	4,00	1,42
5		55	200	0,755	3,63 ± 0,08	1,27 ± 0,04 ^c
6	Resíduo	40	160	0,796	0,79	0,27
7		40	240	0,873	0,84	0,29
8		70	160	0,549	0,86	0,32
9		70	240	0,725	1,10	0,41
10		55	200	0,755	0,87 ± 0,03	0,33 ± 0,01 ^c

^a Densidade do CO₂ (*National Institute of Standards and Technology* - NIST).

^b Solubilidade do óleo no solvente.

^c Média ± desvio padrão de triplicata.

Nas extrações do óleo da madeira de candeia, o maior rendimento (1,42 %) foi obtido na condição de maior temperatura e pressão do planejamento, 70 °C e 240 bar, respectivamente. O menor rendimento (1,16 %) foi obtido nos experimentos de menor pressão utilizada (experimentos 1 e 3). Comportamento similar também foi observado no trabalho de RIBAS *et al.* (2014), em que o maior rendimento (0,72 %) foi obtido no experimento de maior temperatura e pressão empregado na extração do óleo de candeia com CO₂, 60 °C e 245 bar.

Os valores de solubilidade para as extrações do óleo da candeia apresentados na Tabela 5.1, 3,04 a 4,00 g_{óleo} kg_{solvente}⁻¹, são próximos aos encontrados por SOUZA *et al.* (2008) e RIBAS *et al.* (2014) na extração do óleo de candeia com CO₂ supercrítico. No primeiro trabalho, para as três condições de temperatura e pressão empregadas, a solubilidade variou de 3,33 a 5,00 g_{óleo} kg_{solvente}⁻¹ e o rendimento obtido foi de aproximadamente 1,65 a 2,40 %. No segundo trabalho, a solubilidade foi de 1,70 a 4,40 g_{óleo} kg_{solvente}⁻¹, com rendimentos finais de 0,30 a 0,72 %. Levando-se em consideração a similaridade dos valores de solubilidade entre os trabalhos, a diferença dos rendimentos obtidos deve estar associada às características do lote de candeia empregado na extração.

São vários os fatores que influenciam no rendimento de óleo, tais como, condições de solo e clima, parte utilizada da planta, método de extração, entre outras, e isso pode explicar as variações entre os trabalhos reportados na literatura. MORI *et al.* (2009) verificaram que os rendimentos mais elevados do óleo essencial da candeia são encontrados para árvores mais velhas e localizadas em áreas de menor altitude. SCOLFORO *et al.* (2004) encontraram variações de 0,33 a 1,37 % para a quantidade de óleo essencial extraído de plantas com diâmetro entre 5 a 45 cm pelo método de arraste a vapor. SILVÉRIO *et al.* (2013) obtiveram rendimentos de 0,2, 0,2, 0,3 e 0,4 % na hidrodestilação de flores, folhas frescas, folhas secas e galhos de candeia, respectivamente.

As extrações empregando o resíduo industrial mostraram que este material ainda tem potencial para a recuperação de óleo. O maior rendimento, 0,41 % também foi obtido na condição de maior pressão e temperatura do planejamento. O menor rendimento (0,27 %) foi encontrado para a condição de menor pressão e temperatura, 40 °C e 160 bar.

Utilizou-se o programa computacional Statistica 8.0 (STATSOFT, USA) para a análise estatística dos efeitos, considerando o modelo linear e um intervalo de 95 % de confiança. No Gráfico de Pareto (Figura 5.1) são apresentados os efeitos das variáveis temperatura e pressão sobre o rendimento da extração do óleo da madeira de candeia.

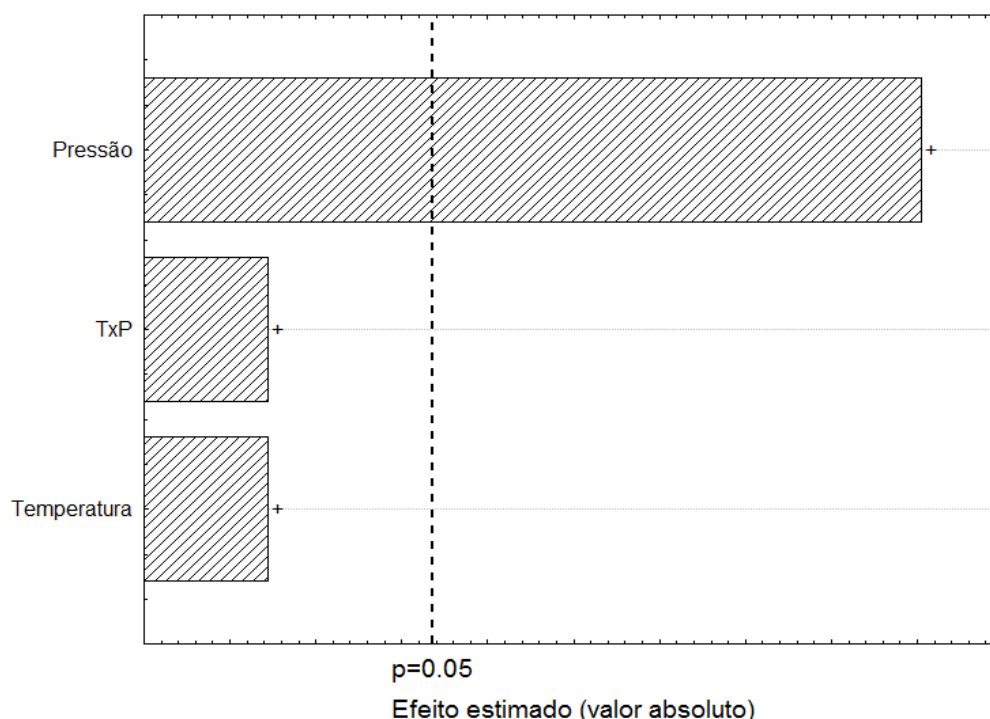


Figura 5.1 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis temperatura e pressão no rendimento da extração do óleo de candeia.

Para as condições utilizadas, a pressão foi a única variável com efeito significativo sobre o rendimento ($p < 0,05$). Os experimentos 1 e 2 à 40 °C e 3 e 4 à 70 °C (Tabela 5.1) sugerem que o aumento da pressão em uma mesma temperatura aumenta o rendimento da extração, o que pode ser explicado pelo aumento da densidade do solvente.

Nos experimentos a 160 bar, o acréscimo de 30 °C na temperatura de extração diminuiu a solubilidade do óleo no solvente de 3,18 para 3,04 g kg⁻¹. Entretanto, nos experimentos realizados a 240 bar o aumento da temperatura, com consequente redução na densidade do CO₂, resultou em um aumento da solubilidade 3,67 para 4,00 g kg⁻¹, e do rendimento de 1,28 para 1,42 %. Assim,

pelos valores da densidade do solvente e o rendimento em cada experimento, pode-se concluir que, para a mais baixa pressão empregada, o efeito da densidade do solvente predomina sobre o rendimento, enquanto à maior pressão, o efeito predominante é o da pressão de vapor do soluto.

Comportamento similar sobre os efeitos da temperatura e pressão foi reportado por outros autores que empregaram o CO₂ supercrítico, tais como: CONDE *et al.* (2013), na obtenção de compostos fenólicos e lipofílicos da madeira de *Pinus pinaster*, ACOSTA *et al.* (2014), na extração a partir do resíduo de *Meziaurus itauba* e TOMITA *et al.* (2014), que obtiveram óleo do farelo de arroz.

A validade do modelo foi verificada pela análise do teste F, mediante dados da análise de variância. O modelo é validado, ou seja, se ajusta aos dados experimentais, quando $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. O modelo obtido pela regressão linear explicou 93,9 % das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, indicando uma boa concordância. A análise da estatística “F” é apresentada na Tabela 5.2 e o modelo é dado pela Equação 5.1.

Tabela 5.2 - Análise de variância para predição do rendimento da extração do óleo da candeia com CO₂ supercrítico.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado} ^b
Modelo	0,0459	3	0,0153	15,30	8,94
Resíduo	0,0030	3	0,0010		
Total SQ	0,0489	6	0,0081		
R ² = 0,939					

^a Graus de liberdade.

^b F_{tabelado}(6;3;0,05).

$$\text{Rendimento (\%)} = 1,2998 - 0,0093T - 0,0008P + 0,00006TP \quad 5.1$$

Na Figura 5.2 são apresentados os efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento da extração a partir de uma superfície de resposta. Verifica-se que a região com maior rendimento está localizada nos níveis mais altos de temperatura

e pressão, apresentando pouca variação no resultado com o aumento da temperatura para baixas pressões.

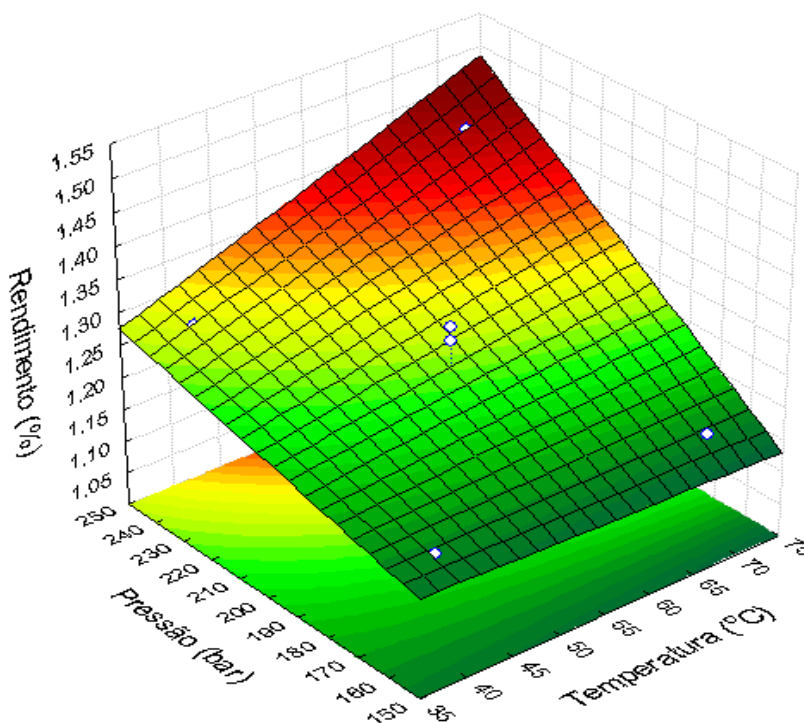


Figura 5.2 - Superfície de resposta para o rendimento da extração do óleo de candeia em função das temperaturas e pressões empregadas.

Para as extrações do óleo do resíduo industrial, ambas as variáveis temperatura e pressão foram significativas (Figura 5.3), aumentando-se o valor dessas variáveis aumenta-se o rendimento da extração. Da mesma forma que nas extrações do óleo de candeia, o efeito da pressão sobre o rendimento também foi verificado nas extrações do resíduo industrial, justificado pelo efeito da densidade do solvente (experimentos 6-7 e 8-9). Da análise do efeito da temperatura (experimentos 6-8 e 7-9), pode-se concluir que o efeito da pressão de vapor do soluto é predominante sobre o rendimento para ambas as pressões empregadas.

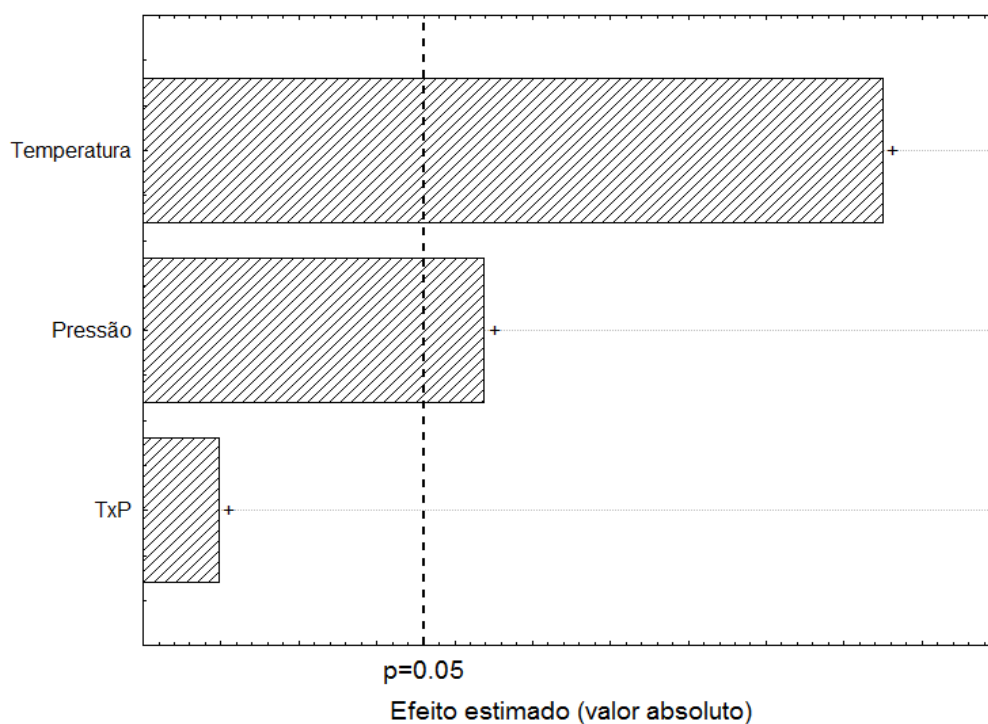


Figura 5.3 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis temperatura e pressão e temperatura no rendimento da extração do óleo do resíduo industrial.

A validade do modelo foi verificada pela análise do teste “F”, mediante dados da análise de variância (Tabela 5.3). O modelo obtido pela regressão linear explicou 97,7 % das variações entre os valores experimentais e os previstos, indicando uma boa concordância. A equação do modelo é descrito pela Equação 5.2.

Tabela 5.3 - Análise de variância para predição do rendimento da extração do óleo do resíduo industrial com CO₂ supercrítico.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado} ^b
Modelo	0,0115	3	0,0038	38,00	8,94
Resíduo	0,0003	3	0,0001		
Total SQ	0,0118	6	0,0020		
R ² = 0,977					

^a Graus de liberdade.

^b F_{tabelado}(6;3;0,05).

$$\text{Rendimento (\%)} = 0,3525 - 0,0030T - 0,0009P + 0,00003TP \quad 5.2$$

A superfície de resposta dos efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento da extração empregando o resíduo industrial é apresentada na Figura 5.4, na qual é possível verificar o efeito positivo das variáveis temperatura e pressão sobre o rendimento da extração.

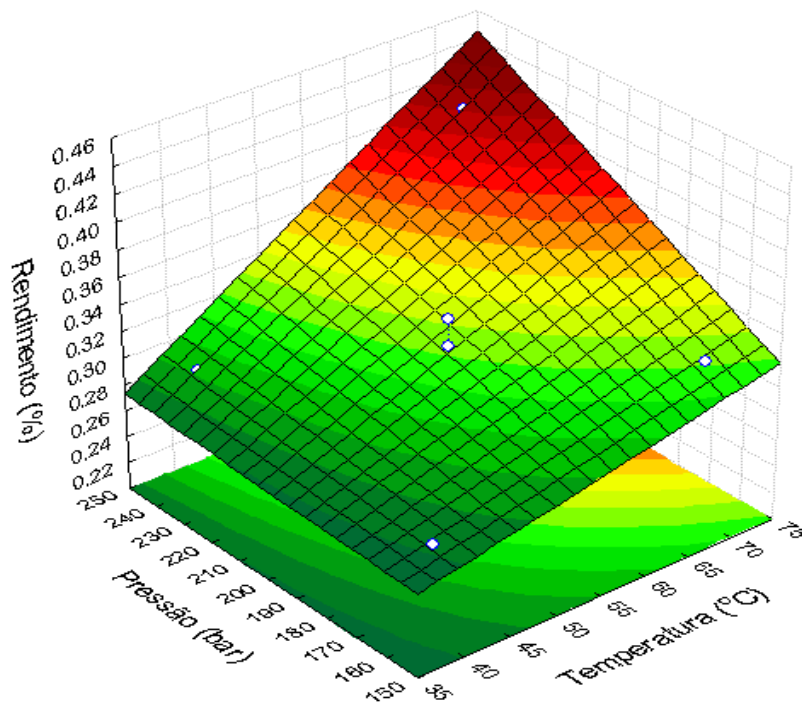


Figura 5.4 - Superfície de resposta para o rendimento da extração do óleo do resíduo industrial em função das temperaturas e pressões empregadas.

Assim como nas extrações do óleo da madeira de candeia, os maiores rendimentos são observados para as condições de maiores temperaturas e pressões. No entanto, para este material, um aumento da pressão a baixas temperaturas tem um efeito pouco significativo no resultado.

5.2.1.1 Curvas cinéticas

As curvas cinéticas da extração supercrítica do óleo da madeira de candeia e resíduo industrial são apresentadas nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente.

Como pode ser verificado, a condição de 70 °C e 240 favoreceu a taxa de extração para os dois materiais.

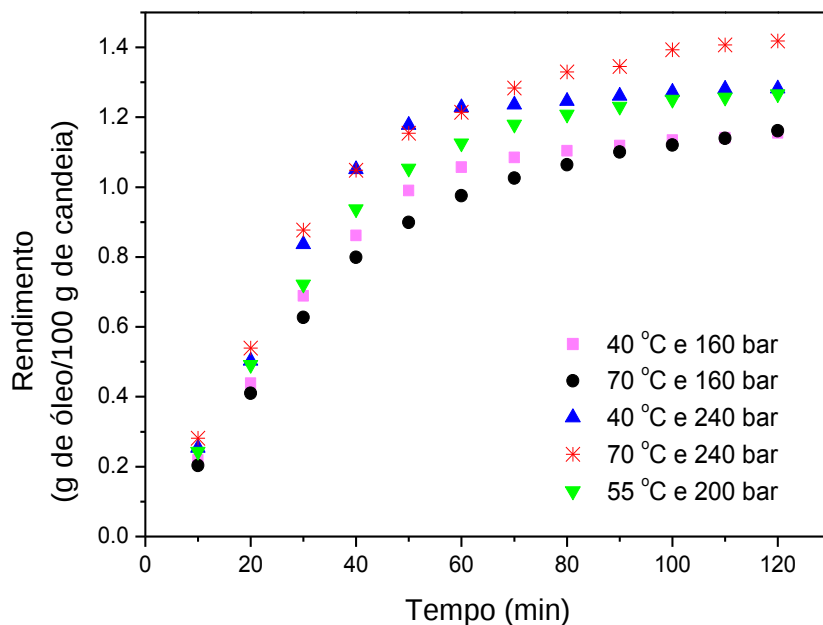


Figura 5.5 – Curvas cinéticas das extrações do óleo da madeira de candeia.

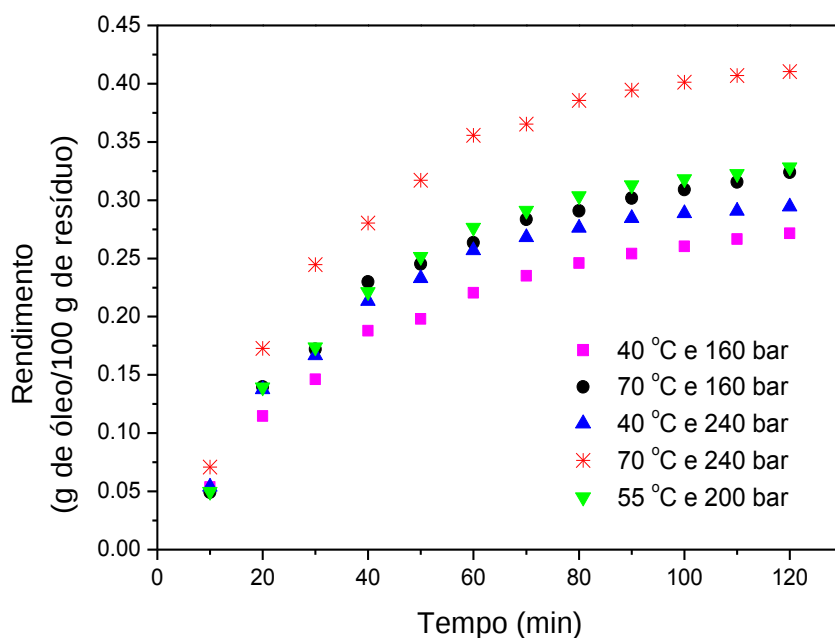


Figura 5.6 - Curvas cinéticas das extrações do óleo do resíduo industrial.

Embora as taxas iniciais de extração do óleo da candeia em ambas as condições de 240 bar sejam muito próximas, verifica-se que o aumento da temperatura, com consequente aumento na volatilidade e difusão do soluto, favoreceu a extração do óleo de difícil acesso, resultando no maior rendimento para a condição de 70 °C e 240 bar.

Para ambos os materiais, as curvas cinéticas apresentaram comportamento típico, com os três períodos da extração, *CER*, *FER* e *DC*, respectivamente. No primeiro período, a taxa de extração é constante devido à presença do óleo na superfície da matéria-prima, ou seja, o soluto é de fácil acesso. No segundo período, há diminuição na taxa de extração devido ao esgotamento do óleo na superfície do sólido e início da extração do óleo contido no interior das células intactas e, por fim, no último período, o solvente extrai somente o óleo contido no interior do sólido e, portanto, a taxa de extração é baixa.

5.2.1.2 Modelagem matemática das cinéticas de extração

O modelo matemático de SOVOVÁ (1994) foi utilizado para representar as curvas cinéticas de extração. Para a madeira de candeia, os parâmetros foram: concentração inicial de óleo de $1,47 \times 10^{-2} \text{ g}_{\text{óleo}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$ (dada pela razão entre a massa de óleo extraída na condição de maior rendimento, 240 bar e 70 °C, e a massa de sólido inerte), densidade do leito de $0,358 \text{ g cm}^{-3}$, porosidade de 0,752 e massa de material inerte de 28,58 g. Os parâmetros das extrações do resíduo industrial foram: concentração inicial de óleo de $4,05 \times 10^{-3} \text{ g}_{\text{óleo}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$, densidade do leito de $0,362 \text{ g cm}^{-3}$, porosidade de 0,750 e massa de material inerte de 28,88 g. Para ambos os materiais a vazão mássica de solvente utilizada foi de $1,96 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$, densidade do sólido de $1,44 \text{ g cm}^{-3}$, densidade do solvente e solubilidade do óleo no CO₂ conforme a Tabela 5.1.

Na Tabela 5.4 são apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Sovová, *Z*, *W* e *r*. O parâmetro *r* representa a fração de óleo de fácil acesso, sendo de 0,29 para a madeira de candeia e 0,60 para o resíduo industrial. Como apresentado na seção 3.3.2.2, os parâmetros *Z* e *W* são diretamente

proporcionais aos coeficientes volumétricos de transferência de massa nas fases fluida e sólida, $k_F a$ e $k_S a$, respectivamente, e o menor valor de W é explicável devido à maior resistência para a difusão do soluto contido nas partículas intactas.

Assim, como já esperado, os valores de $k_F a$ foram elevados quando comparados aos de $k_S a$. Para as extrações com madeira de candeia, $k_F a$ variou de $1,70 \times 10^{-1}$ a $2,71 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ e de $9,95 \times 10^{-2}$ a $4,50 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ para as extrações com o resíduo industrial, enquanto, para o primeiro material $k_S a$ foi de $1,08 \times 10^{-3}$ a $6,81 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e de $1,81 \times 10^{-3}$ a $1,12 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para segundo.

De acordo com uma revisão dos resultados apresentados na literatura (HUANG *et al.*, 2012), os valores do coeficiente de transferência de massa no filme externo são, geralmente, de duas a três ordens de magnitude maiores que os do coeficiente interno, devido ao primeiro coeficiente estar relacionado à extração do óleo liberado na superfície da partícula, ou seja, fração de fácil extração, e o segundo, à difusão do óleo contido no interior do sólido.

Tendo em vista os períodos da extração, t_{CER} se refere ao tempo do esgotamento do óleo de fácil acesso nas partículas localizadas na entrada no leito e início da extração do óleo contido no interior destas partículas e t_{FER} , ao tempo em que se encerra a extração de todo o óleo facilmente disponível no material contido no extrator. Para as extrações empregando a madeira de candeia, t_{FER} variou entre 19,7 e 28,9 min e, para o resíduo industrial, de 45,2 a 61 min. Os maiores valores encontrados para o segundo material pode ser explicado pela maior fração de óleo na superfície das células em relação ao primeiro.

Em geral, verifica-se que, embora a difusividade aumente com a temperatura, o efeito da densidade do solvente parece predominar sobre o coeficiente volumétrico de transferência de massa no filme externo, sendo este aumentado com a pressão. Para a fase sólida, ambas as variáveis afetaram positivamente o coeficiente volumétrico de transferência de massa; o efeito da temperatura atribuído ao aumento da difusividade do óleo contido no interior das células e a possível ruptura das paredes celulares com o uso de altas pressões (ÖZKAL *et al.*, 2005, JIA *et al.*, 2009).

Tabela 5.4 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações do óleo da madeira de candeia e do resíduo industrial com CO₂ supercrítico.

Material	T (°C)	P (bar)	Z	W	r	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	$k_F a$ (min ⁻¹)	$k_S a$ (min ⁻¹)
Candeia	40	160	8,88	0,06	0,29	2,24	24,29	2,68x10 ⁻¹	1,08x10 ⁻³
	40	240	9,79	0,13	0,29	1,57	19,72	2,71x10 ⁻¹	2,23x10 ⁻³
	70	160	3,98	0,08	0,29	5,22	28,91	1,74x10 ⁻¹	1,31x10 ⁻³
	70	240	6,04	0,39	0,29	2,50	26,38	2,09x10 ⁻¹	6,81x10 ⁻³
	55	200	5,21	0,17	0,29	3,26	24,68	1,70x10 ⁻¹	2,80x10 ⁻³
Resíduo industrial	40	160	4,48	0,11	0,60	10,20	60,75	1,36x10 ⁻¹	1,81x10 ⁻³
	40	240	9,73	0,14	0,60	4,05	48,48	2,82x10 ⁻¹	2,50x10 ⁻³
	70	160	2,27	0,19	0,60	13,42	47,60	9,95x10 ⁻²	3,11x10 ⁻³
	70	240	13,06	0,63	0,60	2,42	45,22	4,50x10 ⁻¹	1,12x10 ⁻²
	55	200	7,50	0,22	0,60	5,01	49,23	2,46x10 ⁻¹	3,83x10 ⁻³

Nas Figuras 5.7 e 5.8 são apresentadas as curvas cinéticas de extração do óleo de candeia e do resíduo industrial ajustadas pelo modelo de Sovová.

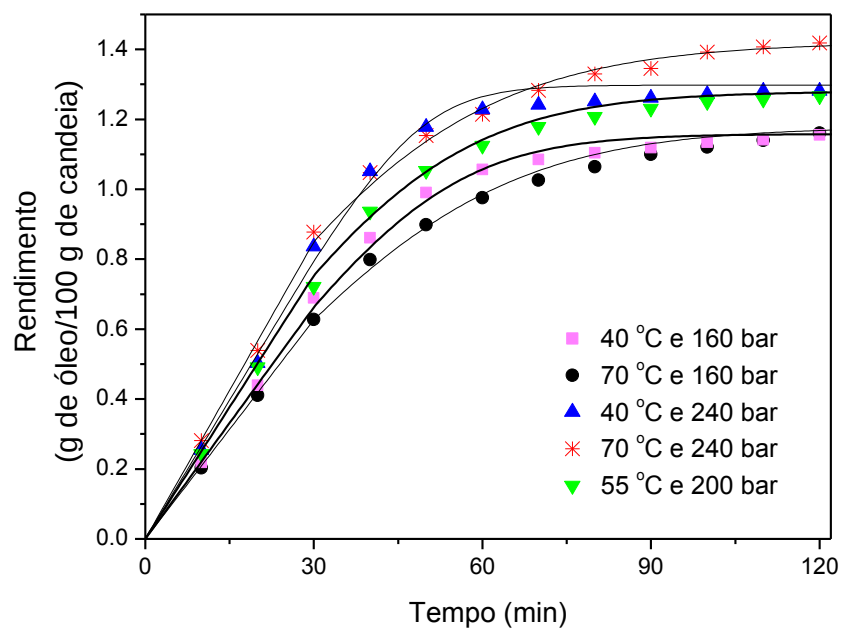


Figura 5.7 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová.

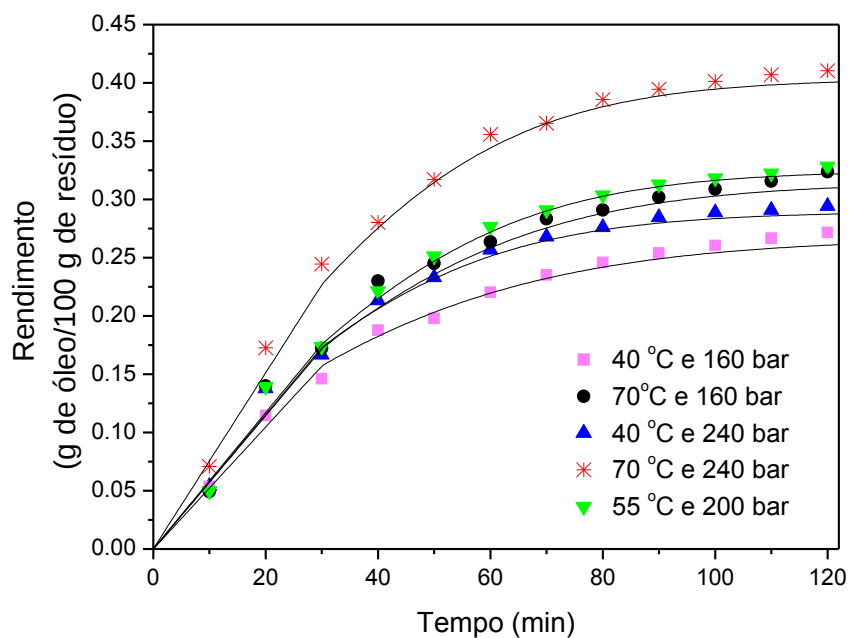


Figura 5.8 – Curvas cinéticas de extração do óleo do resíduo industrial com CO₂ supercrítico ajustadas pelo modelo de Sovová.

Os indicadores estatísticos da modelagem matemática (desvio médio absoluto – DMA e coeficiente de determinação – R^2) são apresentados na Tabela 5.5. O modelo de Sovová apresentou bom ajuste aos dados experimentais, com erro médio absoluto máximo de 4,37 % para as extrações da madeira e 6,11 % para o resíduo industrial.

Tabela 5.5 - Valores dos indicadores estatísticos para a modelagem de Sovová.

Material	T (°C)	P (bar)	DMA (%)	R^2
Candeia	40	160	2,33	0,997
	40	240	4,37	0,991
	70	160	3,19	0,994
	70	240	2,26	0,997
	55	200	4,01	0,998
Resíduo industrial	40	160	2,81	0,993
	40	240	6,11	0,980
	70	160	4,00	0,970
	70	240	3,02	0,994
	55	200	6,08	0,984

5.2.2 Extrações do óleo da madeira de candeia com CO₂+cossolventes

Conforme MAZZUTTI *et al.* (2012), a quantidade de cossolvente na extração supercrítica deve ser mínima a fim de se evitar a necessidade de etapas adicionais para remoção do solvente do extrato, aumentando os custos operacionais. Dentre os tipos de solventes, o etanol é o mais empregado como modificador, pois é inócuo para a saúde humana e para o meio ambiente (MELO *et al.*, 2014). Acetato de etila também é um cossolvente importante, com aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia (FALCO & KIRAN, 2012).

Desta forma, investigou-se o efeito da adição de 1, 3 e 5 % (v/v) dos cossolventes ao CO₂ na extração do óleo da madeira de candeia (lote II). Os experimentos foram realizados em 70 °C e 240 bar, condição na qual foi obtido o maior rendimento das extrações com CO₂ puro (seção 5.2.1). Os rendimentos das extrações, bem como os valores da densidade e solubilidade aparente para cada condição são apresentados na Tabela 5.6. As curvas cinéticas da extração do óleo de candeia são apresentadas nas Figuras 5.9 e 5.10.

Tabela 5.6 - Resultados das extrações do óleo de candeia com CO₂ puro e com adição de 1, 3 e 5 % dos cossolventes etanol (EtOH) e acetato de etila (EtAc), na temperatura de 70 °C e pressão de 240 bar.

Solvente	ρ_F^a (g cm ⁻³)	Y_s^b (g _{óleo} kg _{solvente} ⁻¹)	Rendimento ^c (%)
CO ₂	0,702	3,52	1,55 ± 0,01 ^a
CO ₂ + 1% EtOH	0,709	3,58	1,66 ± 0,01 ^b
CO ₂ + 3% EtOH	0,722	4,01	1,95 ± 0,02 ^d
CO ₂ + 5% EtOH	0,734	4,33	2,35 ± 0,02 ^e
CO ₂ + 1% EtAc	0,709	3,28	1,54 ± 0,01 ^a
CO ₂ + 3% EtAc	0,718	3,45	1,60 ± 0,02 ^{ab}
CO ₂ + 5% EtAc	0,727	3,68	1,86 ± 0,03 ^c

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

^a Densidade da mistura CO₂+cossolvente calculada pela equação de estado de Peng Robinson com regra de mistura quadrática de van der Waals (vdW2).

^b Solubilidade do óleo no solvente.

^c Média ± desvio padrão de duplicata.

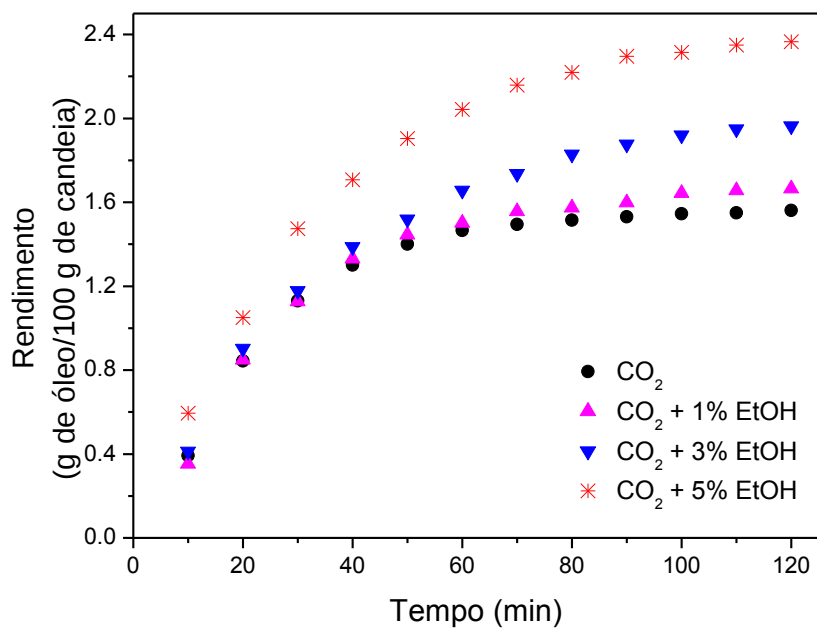


Figura 5.9 - Curvas cinéticas experimentais das extrações do óleo candeia com CO₂ supercrítico e o cossolvente etanol.

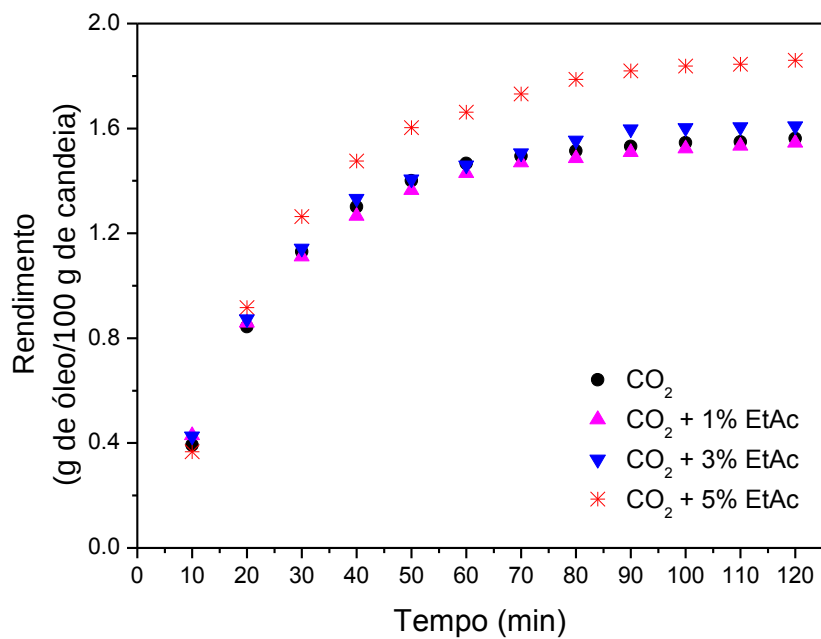


Figura 5.10 - Curvas cinéticas experimentais das extrações do óleo candeia com CO₂ supercrítico e o cossolvente acetato de etila.

Os resultados apresentados na Tabela 5.6 e nas Figuras 5.9 e 5.10 mostram que a adição do etanol ao CO₂ proporcionou maiores rendimentos em comparação ao acetato de etila, com máximo de 2,35 % para o primeiro solvente e 1,86 % para o segundo. A adição do cossolvente etanol nas proporções de 1, 3 e 5 % aumentou a quantidade de óleo extraída em 7, 26 e 52 %, respectivamente, em relação ao rendimento com o CO₂ puro (1,55 %). A adição do acetato de etila somente foi significativa para a proporção de 3 e 5 %, sendo o rendimento elevado de 3 e 20 %, respectivamente.

Embora os valores de densidade do solvente tenham sido influenciados pela presença dos cossolventes, o aumento da solubilidade, mais pronunciada com a adição do etanol, se deve, provavelmente, à capacidade desse solvente em realizar ligação de hidrogênio com o soluto, diferentemente do acetato de etila, que é um solvente aprótico (ASEP *et al.*, 2013; BERMEJO *et al.*, 2016). Este efeito é evidenciado quando se analisa, por exemplo, os resultados obtidos com a adição de 5 % de acetato de etila e 3 % de etanol. Para o primeiro solvente, o rendimento foi de 1,86 %, com densidade de 0,727 g cm⁻³, enquanto, para uma densidade próxima (0,722 g cm⁻³), obtido com o etanol, o rendimento foi de 1,95 %.

A adição de pequenas quantidades do cossolvente etanol e acetato de etila ao CO₂ proporcionou considerável aumento no rendimento, em uma dada condição de pressão e temperatura (3 a 52 %), assim como também verificado por MICHIELIN *et al.* (2009) e MARTINS *et al.* (2016b). No primeiro trabalho, os autores obtiveram um aumento de até 72 % no rendimento das extrações supercríticas a partir de *Cordia verbenacea* empregando 5 % de etanol e acetato de etila como cossolventes ao CO₂. No segundo, o rendimento das extrações supercríticas a partir da biomassa de *Eichhornia crassipes* aumentou em até 65 % com a adição de 5 % do cossolvente etanol.

Para a extração do óleo de candeia com CO₂ puro apresentados na seção 5.2.1, verificou-se que o aumento no rendimento é mais significativo com o aumento na pressão de operação, obtendo-se um aumento máximo de aproximadamente 22 % (1,16 para 1,42 %) para o aumento da pressão extração de 160 para 240 bar, na temperatura de 70 °C. Comportamento similar também foi obtido por RIBAS *et al.* (2014), em que o aumento da pressão de extração do óleo

de candeia de 120 para 245 bar, na temperatura de 60 °C, elevou o rendimento de 0,36 para 0,72 %.

5.2.2.1 Modelagem matemática das cinéticas de extração supercrítica com cossolvente

Os parâmetros utilizados para a modelagem matemática das curvas de extração do óleo de candeia com CO₂ supercrítico e os cossolventes etanol e acetato de etila foram: concentração inicial de óleo de $2,42 \times 10^{-2} \text{ g}_{\text{óleo}} \text{ g}_{\text{sólido}}^{-1}$ (dada pela razão entre a massa de óleo extraída com CO₂ + 5 % de etanol, e a massa de sólido inerte), densidade do leito de $0,312 \text{ g cm}^{-3}$, porosidade do leito de 0,784, massa de sólido inerte de 18,10 g, densidade do sólido de $1,44 \text{ g cm}^{-3}$ e vazão mássica de solvente de $2,05 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$. A densidade e solubilidade do óleo no solvente conforme apresentado na Tabela 5.6.

Na Tabela 5.7 são apresentados os parâmetros ajustados do modelo de Sovová, Z , W e r . Para este lote de madeira de candeia (lote II), a fração de óleo de fácil acesso foi de 0,46. Assim como nas extrações com CO₂ puro, os coeficientes volumétricos de transferência de massa no fluido foram maiores do que os da fase sólida, de $1,55 \times 10^{-1}$ a $3,20 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ para o primeiro e de $9,00 \times 10^{-4}$ a $8,40 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para o segundo.

Devido à sua dificuldade, a extração do óleo contido no interior das células intactas é considerada como limitante do processo, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos nos experimentos com os maiores valores de $k_s a$. A adição dos cossolventes aumentou em até aproximadamente 10 vezes o valor deste coeficiente, devido possivelmente, à ruptura das paredes celulares e/ou inchamento do sólido, melhorando assim a transferência de massa interna durante a extração.

Pelos dados estatísticos, o modelo apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, com coeficiente de determinação $R^2 > 0,98$ e erro médio absoluto máximo de 3,78 %. As curvas cinéticas experimentais ajustadas com o modelo matemático são apresentadas nas Figuras 5.11 e 5.12.

Tabela 5.7 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila.

Solvente	Z	W	r	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	$k_F a$ (min ⁻¹)	$k_S a$ (min ⁻¹)	DMA (%)	R ²
CO ₂	6,08	0,03	0,46	4,38	32,69	3,20x10 ⁻¹	9,00x10 ⁻⁴	2,40	0,990
CO ₂ +1% EtOH	4,54	0,05	0,46	5,88	34,87	2,31x10 ⁻¹	1,20x10 ⁻³	3,25	0,992
CO ₂ +3% EtOH	3,41	0,13	0,46	7,03	36,00	1,60x10 ⁻¹	3,20x10 ⁻³	2,39	0,995
CO ₂ +5% EtOH	5,37	0,32	0,46	3,93	34,60	2,77x10 ⁻¹	8,40x10 ⁻³	2,85	0,995
CO ₂ +1% EtAc	2,89	0,02	0,46	9,51	37,93	1,55x10 ⁻¹	5,00x10 ⁻⁴	2,98	0,986
CO ₂ +3% EtAc	4,30	0,03	0,46	6,13	34,12	2,24x10 ⁻¹	9,00x10 ⁻⁴	2,49	0,992
CO ₂ +5% EtAc	6,10	0,08	0,46	4,07	32,39	3,07x10 ⁻¹	2,00x10 ⁻³	3,78	0,988

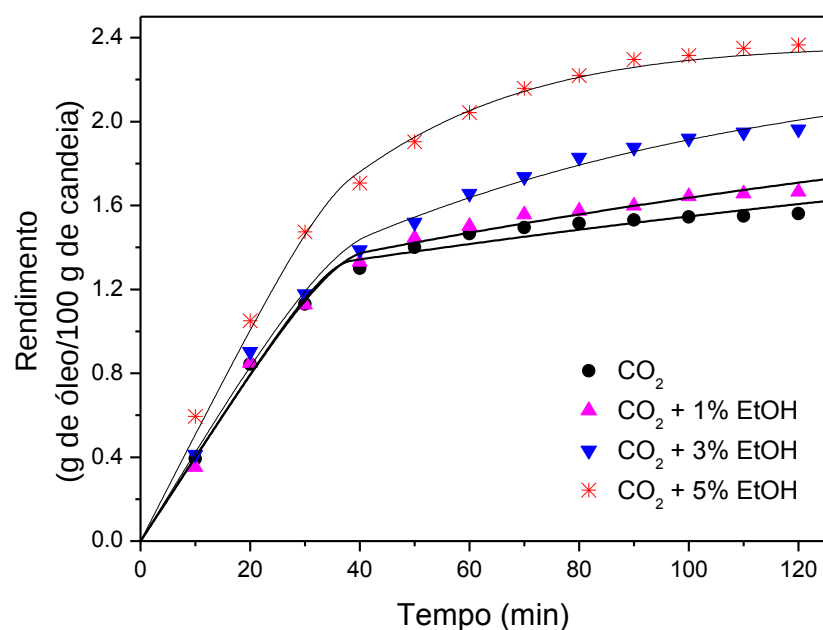


Figura 5.11 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico e o cossolvente etanol ajustadas pelo modelo de Sovová.

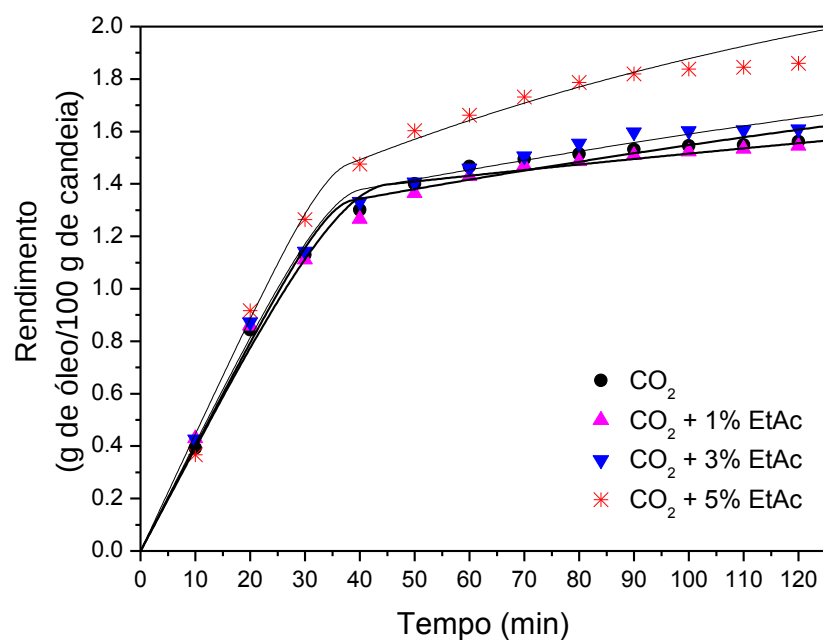


Figura 5.12 - Curvas cinéticas de extração do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico e o cossolvente acetato de etila ajustadas pelo modelo de Sovová.

5.2.3 Extrações com solventes orgânicos – Soxhlet e PLE

A madeira de candeia (lote II) foi submetida à extração com os solventes etanol, acetato de etila e n-hexano pelo método convencional em Soxhlet, nas suas respectivas temperaturas de ebulição, e pressurizados a 100 bar, nas temperaturas de 40, 55 e 70 °C, método PLE. As condições experimentais e os rendimentos obtidos são apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Condições experimentais e rendimentos das extrações Soxhlet e PLE com etanol, acetato de etila e n-hexano.

Método	Solvente	T (°C)	Tempo (min)	Rendimento ^a (%)
PLE	Etanol	40	20	4,14 ± 0,04 ^a
		55		5,03 ± 0,08 ^b
		70		5,56 ± 0,10 ^c
Soxhlet		± 78	360	7,23 ± 0,23
PLE	Acetato de etila	40	20	2,91 ± 0,03 ^a
		55		3,86 ± 0,01 ^b
		70		4,18 ± 0,06 ^c
Soxhlet		± 77	360	5,10 ± 0,40
PLE	n-Hexano	40	20	0,53 ± 0,01 ^a
		55		0,75 ± 0,02 ^b
		70		0,85 ± 0,04 ^b
Soxhlet		± 68	360	1,57 ± 0,07

Letras iguais na mesma coluna, e para o mesmo solvente das extrações PLE, indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

^a Média ± desvio padrão de duplicata.

Os resultados mostram que a polaridade do solvente empregado na extração Soxhlet teve influência sobre o rendimento, sendo que, quanto maior a

polaridade maior a quantidade de extrato obtido, o que se deve à baixa seletividade destes solventes polares. O etanol, solvente mais polar, forneceu o maior rendimento 7,23 %, diferentemente do solvente apolar n-hexano que apresentou o menor rendimento de 1,57 %. Efeito similar foi observado por RIBAS *et al.* (2014) na extração em Soxhlet com a madeira de candeia e os solventes n-hexano e diclorometano, em que foram obtidos rendimentos de 1,18 e 3,60 %, respectivamente, evidenciando a afinidade dos compostos por solventes polares.

O maior rendimento da extração Soxhlet em relação à PLE, quando utilizado o mesmo solvente, está relacionado à recirculação do solvente na temperatura de ebulição, que aumenta a solubilização dos compostos (MEZZOMO *et al.*, 2010), além da alta temperatura também diminuir a viscosidade e tensão superficial do solvente, facilitando a penetração na matriz sólida e, conseqüentemente, a extração (MARKOM *et al.*, 2007).

Também é verificado um aumento do rendimento com a temperatura empregada na PLE para os três solventes. Um aumento desta variável geralmente melhora a eficiência da extração devido à redução das interações moleculares entre os analitos e a matriz. Também, pela diminuição da viscosidade do solvente, o que melhora sua penetração na amostra e pela redução da tensão superficial solvente/matriz, permitindo que os analitos se dissolvam mais rapidamente no solvente (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005; TURNER & WALDEBÄCK, 2013; AMEER *et al.*, 2017). Além disso, a taxa de difusão é aumentada, resultando em extrações mais rápidas (MUSTAFA & TURNER, 2011).

Na maior temperatura, de 70 °C, foram obtidos os maiores rendimentos da PLE com os solventes etanol, acetato de etila e n-hexano, 5,56, 4,18 e 0,85 %, respectivamente. Esses rendimentos, obtidos com tempo de extração de 20 min, correspondem, respectivamente, a 77, 82 e 54 % do rendimento da extração Soxhlet, com 360 min de extração total. Deve-se ressaltar que a quantidade de solvente empregada no método PLE foi seis vezes menor em relação ao usado no método convencional em Soxhlet, reduzindo assim, o consumo energético na separação deste ao final da extração.

5.2.4 Extração do óleo de candeia com solvente assistido por ultrassom

Para as extrações do óleo da madeira de candeia assistidas por ultrassom, selecionou-se o n-hexano devido à maior pureza em α -bisabolol dos óleos obtidos com este solvente, cujos resultados são apresentados na seção 5.3.2. Na Tabela 5.9 são apresentadas as condições experimentais de temperatura (x_1), razão líquido/sólido (x_2) e potência (x_3), de acordo com o planejamento Box–Behnken 3^3 , e os rendimentos (Y) obtidos ao final de 7 minutos.

O tempo das extrações foi selecionado após a realização de experimentos cinéticos na condição de ponto central do planejamento ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 mL g^{-1} e potência de 60 % da nominal do equipamento). Conforme mostrado na Figura 5.13, após 7 minutos de extração, não houve variação significativa no rendimento.

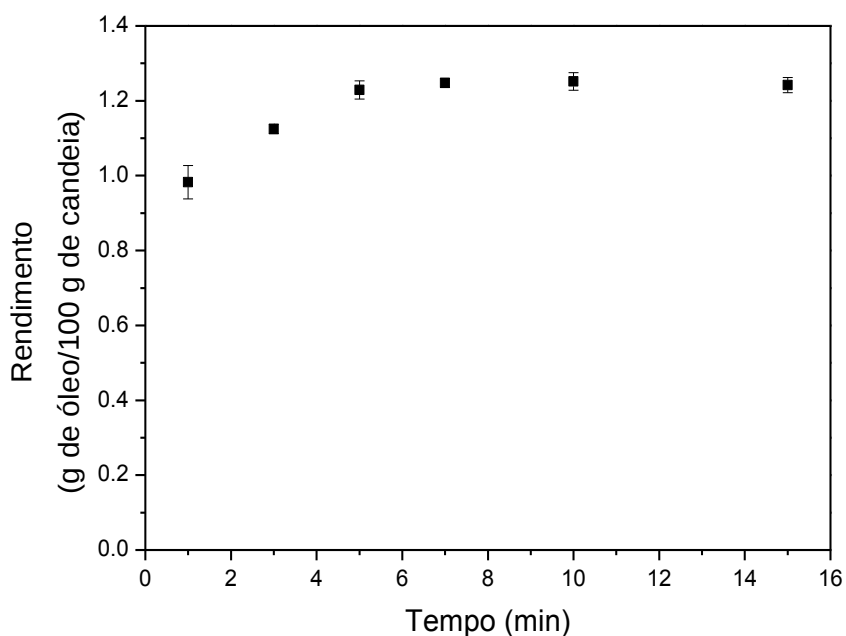


Figura 5.13 - Curva cinética da extração do óleo da madeira de candeia com n-hexano assistida por ultrassom na condição de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 mL g^{-1} e 60 % da potência nominal do equipamento.

Tabela 5.9 - Condições experimentais e rendimentos das extrações do óleo de candeia com n-hexano assistidas por ultrassom.

Experimento	Variáveis			Resposta
	x_1	x_2	x_3	Y
	Temperatura (°C)	Razão líquido/sólido (mL g ⁻¹)	Potência ^a (%)	Rendimento (%)
1	40	10	60	1,05
2	60	10	60	1,17
3	40	20	60	1,22
4	60	20	60	1,28
5	40	15	30	1,16
6	60	15	30	1,16
7	40	15	90	1,12
8	60	15	90	1,31
9	50	10	30	1,15
10	50	20	30	1,28
11	50	10	90	1,16
12	50	20	90	1,31
13	50	15	60	1,25 ± 0,02 ^b

^a Porcentual relativo à potência nominal do equipamento (500 W).

^b Média ± desvio padrão de quadruplicata.

Os rendimentos, para as condições empregadas, variaram de 1,05 a 1,31 %, sendo estes valores correspondentes a 67 e 83 % do rendimento obtido na técnica convencional em Soxhlet, com volume de solvente 2,5 vezes menor e 7 minutos de extração. O maior rendimento foi obtido em ambos os experimentos 8 e 12 (60 °C, 15 mL g⁻¹, 90 % ; 50 °C, 20 mL g⁻¹, 90 %, respectivamente). Em contrapartida, no experimento 1 (40 °C, 10 mL g⁻¹, 60 %) foi verificado o menor

rendimento, 1,05 %. Para avaliar o efeito das variáveis empregadas sobre o rendimento das extrações, empregou-se a análise estatística considerando um intervalo de confiança de 95 %. O modelo polinomial de segunda ordem que prediz o rendimento da extração (Y) em função das variáveis independentes temperatura (x_1), razão líquido/sólido (x_2) e potência (x_3) é dado pela Equação 5.3 e os coeficientes de regressão estimados são apresentados na Tabela 5.10.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad 5.3$$

Tabela 5.10 - Coeficientes de regressão da superfície de resposta para os rendimentos das extrações assistidas por ultrassom.

Coeficiente	Valores preditos
β_0	-0,383750
β_1	0,050875
β_2	0,043500
β_3	-0,006958
β_{11}	-0,000512
β_{22}	-0,000550
β_{33}	-0,000007
β_{12}	-0,000300
β_{13}	0,000158
β_{23}	0,000033

No Gráfico de Pareto (Figura 5.14), verifica-se que, para um nível de confiança de 95 %, os parâmetros lineares da temperatura, razão líquido/sólido e potência (x_1 , x_2 e x_3 , respectivamente), o parâmetro quadrático da temperatura (x_1^2) e a interação entre temperatura e potência ($x_1 x_3$) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e todos com efeito positivo. Os fatores razão líquido/sólido e temperatura foram os que mais contribuíram para a extração do óleo.

O aumento do rendimento para as condições de maiores quantidades de solvente em relação à massa de madeira é consistente com os princípios de transferência de massa, uma vez que o gradiente de concentração é a força motriz para a difusão (ZHANG *et al.*, 2009; SHALMASHI, 2009; SAHIN & SAMLI, 2013).

Como já mencionado na seção 5.2.3, além de maiores temperaturas diminuïrem a viscosidade e tensão superficial, a pressão de vapor do solvente aumenta, o que leva a um aumento no número de bolhas de cavitação (TIAN *et al.*, 2013; TEKIN *et al.*, 2015). Embora a intensidade do colapso das bolhas possa diminuir em altas pressões de vapor, devido à baixa diferença entre a pressão interna e externa (CHEMAT *et al.*, 2017), foi observado um aumento no rendimento com o aumento da temperatura, para as condições empregadas. O efeito positivo do aumento da potência no rendimento pode ser explicado devido aos colapsos mais violentos das bolhas de cavitação, ocasionando maior destruição das paredes celulares da matéria-prima e, facilitando assim, o acesso do solvente aos analitos (DOLATOWSKI *et al.*, 2007; CRAVOTTO *et al.*, 2008).

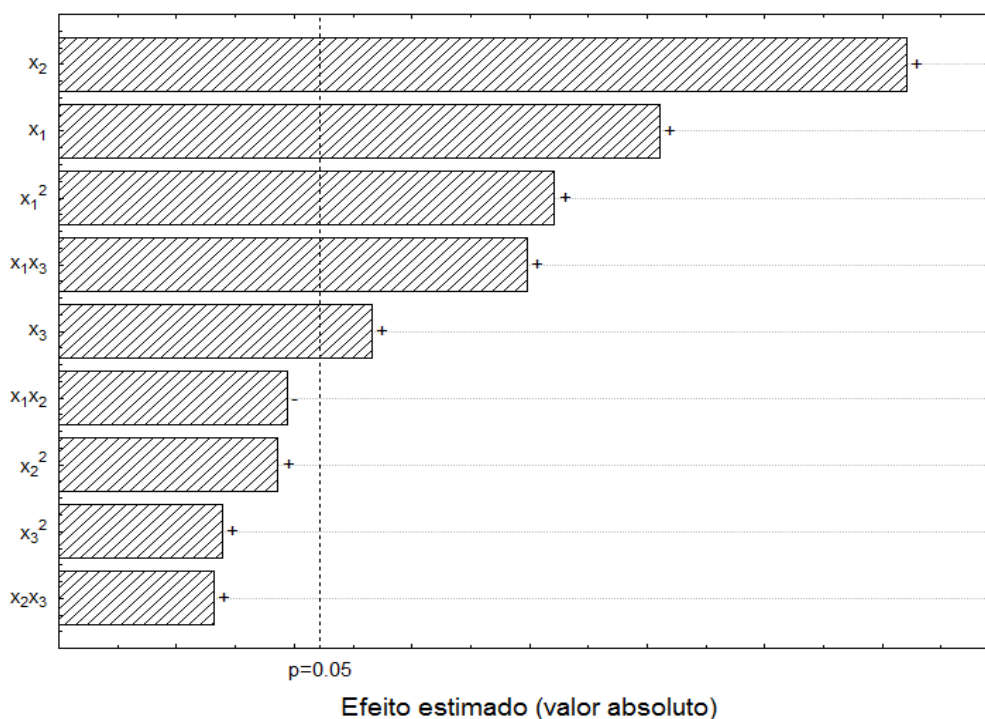


Figura 5.14 – Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis temperatura (x_1), razão líquido/sólido (x_2) e potência do ultrassom (x_3) no rendimento da extração do óleo de candeia.

A análise de variância (ANOVA) para os resultados experimentais do planejamento Box-Behnken é apresentada na Tabela 5.11. O coeficiente de determinação (R^2) para a Equação 5.3 foi de 0,981, indicando que 98,1 % da variação total no rendimento é atribuída às variáveis estudadas. O modelo não apresenta falta de ajuste ao nível de confiança de 95 %, pois o valor de $F_{\text{calculado}}$ (0,67) foi menor que o F_{tabelado} (9,28). Além disso, mostrou-se a validade do modelo pelo teste F da regressão, em que $F_{\text{calculado}}$ (30,00) foi maior o valor de F_{tabelado} ($F_{\text{tabelado}} = 4,10$).

Tabela 5.11 - Análise de variância (ANOVA) para os rendimentos das extrações assistidas por ultrassom.

Causa de variação	Soma quadrática	GL ^a	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	0,0806	9	0,0090	30,00	4,10 ^b
Resíduo	0,0015	6	0,0003		
Falta de ajuste	0,0006	3	0,0002	0,67	9,28 ^c
Erro puro	0,0009	3	0,0003		
Total	0,0821	15			
R^2	0,981		R^2 ajustado	0,954	

^aGraus de liberdade; ^b $F_{\text{tabelado}}(9;6;0,05)$; ^c $F_{\text{tabelado}}(3;3;0,05)$.

Na Figura 5.15 são apresentados os efeitos da temperatura e razão líquido/sólido no rendimento da extração para uma potência fixa de 60 % da nominal. Para uma razão líquido/sólido definida, o aumento da temperatura aumenta a quantidade de óleo extraída (experimentos 1 e 2; 3 e 4). O mesmo comportamento é observado quando a razão é aumentada em uma mesma condição de temperatura (experimentos 1 e 3; 2 e 4).

A interação entre temperatura e potência da extração é apresentada na Figura 5.16, para uma razão líquido/sólido fixa de 15 mL g⁻¹, e mostra que, em baixa potência, o aumento da temperatura não tem efeito significativo para o aumento do rendimento (experimentos 5 e 6), assim como para o aumento da potência em baixa temperatura (experimentos 5 e 7). Maiores rendimentos são verificados para condições com maiores temperaturas e potência ultrassônica.

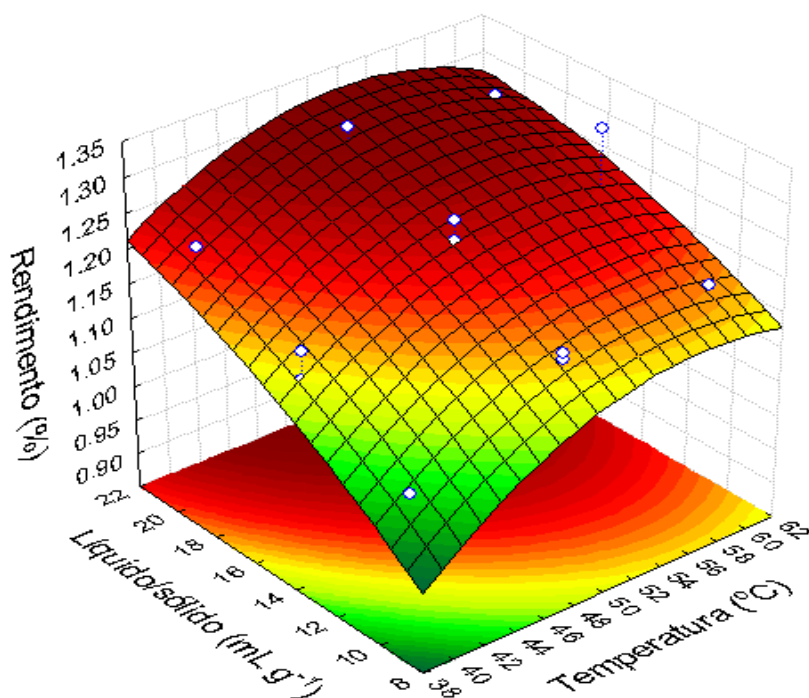


Figura 5.15 – Superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e razão líquido/sólido, com potência do ultrassom de 60 %.

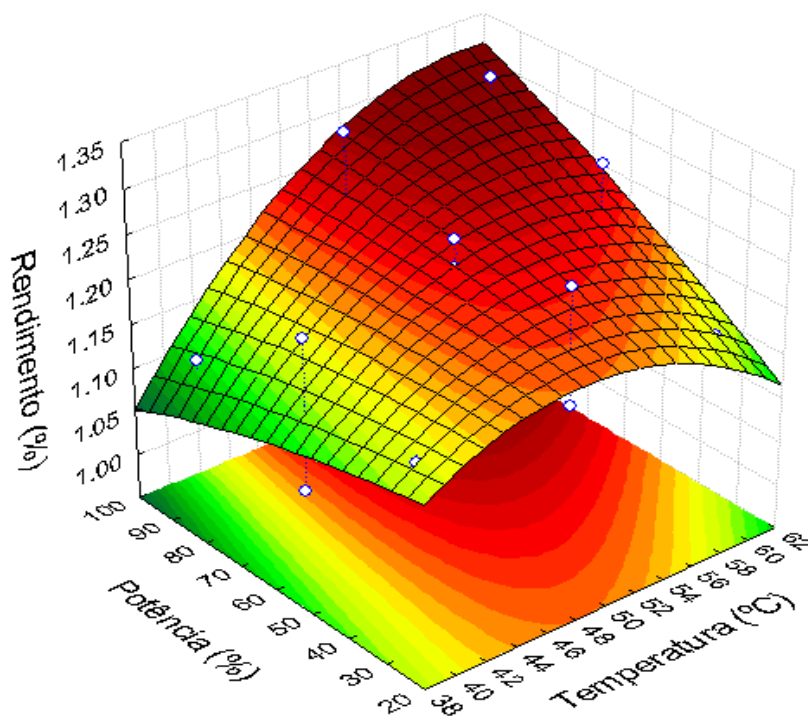


Figura 5.16 – Superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e potência do ultrassom, com razão líquido/sólido de 15 mL g⁻¹.

Na Figura 5.17 são apresentados os efeitos da razão líquido/sólido e potência sobre o rendimento à temperatura de 50 °C. Os resultados indicam que o aumento da potência somente é significativa para altas razões líquido/sólido (experimentos 9 e 11; 10 e 12). Em contrapartida, o aumento da razão aumenta a recuperação do óleo para todos os níveis de potência utilizada (experimentos 9 e 10; 11 e 12).

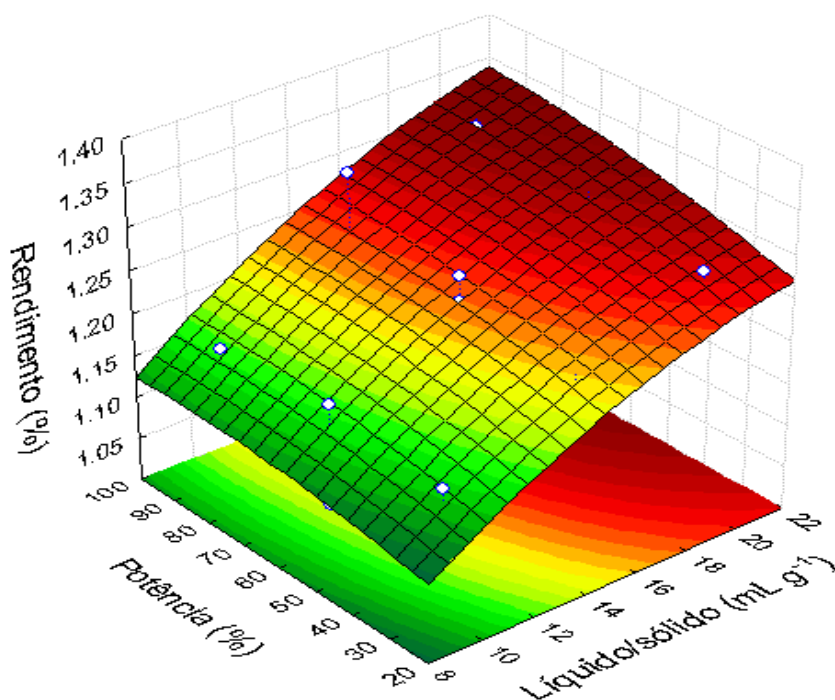


Figura 5.17 – Superfície de resposta do rendimento em função da razão líquido/sólido e potência do ultrassom, com temperatura de 50 °C.

5.3 Caracterização do óleo

5.3.1 Composição química

Os resultados das análises de composição da fração volátil dos óleos extraídos da madeira de candeia (lote I) e do resíduo industrial extraídos com CO₂ supercrítico, bem como as amostras extraídas da madeira de candeia (lote II) com

CO₂ + 5% de etanol/acetato de etila, Soxhlet e PLE com n-hexano, constam na Tabela 5.12. São apresentados os compostos identificados com seus respectivos número de registro CAS e área relativa (%).

As análises mostraram similaridade na composição dos óleos extraídos nas diferentes pressões e temperaturas empregadas. Os sesquiterpenos α -bisabolol (58,95-77,81 %), eremantina (5,41-14,41 %) e costunolida (0,81-2,36%) são os compostos majoritários do óleo extraído da madeira de candeia (amostras 1A-1E e 3A-5A). No óleo extraído do resíduo industrial (amostras 2A-2E), a quantidade destes compostos foram, respectivamente, 52,57-62,25 %, 12,92-15,72 % e 3,52-4,45 %, sendo encontrado também o composto Bis(2-etilhexil) ftalato (8,50-18,10 %), possivelmente de contaminação ambiental (CAO, 2010).

As amostras extraídas com CO₂ puro e com adição de cossolventes apresentaram similaridade qualitativa na composição (amostras 3A, 3B e 3C). A adição dos solventes modificadores elevou a concentração do ácido isovalérico, quando comparado à extração com CO₂ puro (0,76 a 2,26 %). Segundo QUEIROZ & CAJAIBA (2016), a presença deste composto no óleo de candeia é responsável por conferir o odor desagradável ao mesmo e, pelo processo de extração industrial por arraste a vapor, sua concentração é elevada, aproximadamente 8,4 %.

Em relação às técnicas Soxhlet e PLE (amostras 4A e 5A, respectivamente), foram selecionadas para a análise as amostras extraídas da madeira de candeia com o solvente apolar n-hexano, devido à similaridade das características visuais com os óleos obtidos pela extração supercrítica. Pelos resultados, estes óleos também têm como principal constituinte o α -bisabolol (58,95 % para a amostra extraída em Soxhlet e 67,10 % para a amostra da PLE a 70 °C). Assim como o óleo obtido da extração supercrítica, apresentam os compostos bioativos óxidos de α -bisabolol A (4,32 e 3,89 %) e B (0,85 e 0,66 %), costunolida (0,90 e 0,81 %) e eremantina (5,41 e 5,12 %). Além destes, o n-hexano extraiu o glicerídeo monoestearina com uma área reativa de 15,63 % para a amostra do Soxhlet e 12,03 % para a da PLE, explicável pelos glicerídeos serem uns dos principais constituintes dos extrativos lipofílicos de madeiras (GUTIÉRREZ *et al.*, 1999; SUN & TOMKINSON, 2003).

Tabela 5.12 – Composição química da fração volátil do óleo extraído da madeira de candeia e do resíduo industrial.

Composto	CAS ^a	Área relativa (%)									
		Condição de extração									
		1A	1B	1C	1D	1E	2A	2B	2C	2D	2E
Ácido isovalérico	503-74-2	-	0,87	-	0,74	0,82	-	-	-	-	-
Óxido de α -bisabolol B	26184-88-3	1,88	2,07	2,00	1,78	2,17	1,55	1,64	1,82	1,50	1,37
α -bisabolol	515-69-5	74,13	71,78	75,22	72,92	70,14	61,21	58,88	62,25	55,92	52,57
Óxido de α -bisabolol A	22567-36-8	1,11	1,21	1,36	1,41	1,61	1,17	1,26	1,83	1,65	1,44
Costunolida	553-21-9	2,33	2,33	2,36	2,20	2,33	3,55	3,52	4,45	4,00	3,93
Eremantina	37936-58-6	14,36	13,81	13,84	14,41	13,68	12,94	12,92	15,27	15,11	15,72
Bis(2-etilhexil) ftalato	117-81-7	-	-	-	-	-	14,89	15,50	8,50	15,15	18,10
Monoestearina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Outros	-	6,19	7,93	5,22	6,54	9,25	4,69	6,28	5,88	6,67	6,87

(Continuação)

Composto	CAS ^a	Área relativa (%)					
		Condição de extração					
		3A	3B	3C	4A	5A	F4
Ácido isovalérico	503-74-2	0,76	2,06	2,26	1,68	0,70	-
Óxido de α -bisabolol B	26184-88-3	4,58	5,56	5,31	4,32	3,89	-
α -bisabolol	515-69-5	77,81	67,40	73,16	58,95	67,10	98,23
Óxido de α -bisabolol A	22567-36-8	1,20	1,93	1,34	0,85	0,66	
Costunolida	553-21-9	1,22	1,80	1,34	0,90	0,81	1,05
Eremantina	37936-58-6	9,38	12,19	9,27	5,41	5,12	
Bis(2-etilhexil) ftalato	117-81-7	-	-	-	-	-	-
Monoestearina	-	-	-	-	15,63	12,03	-
Outros	-	5,05	9,06	7,32	12,26	9,69	0,72

Candeia lote I: 1A (40 °C; 160 bar); 1B (40 °C; 240 bar); 1C (70 °C; 160 bar); 1D (70 °C; 240 bar); 1E (55 °C; 200 bar); Resíduo industrial: 2A (40 °C; 160 bar); 2B (40 °C; 240 bar); 2C (70 °C; 160 bar); 2D (70 °C; 240 bar); 2E (50 °C; 200 bar).

Candeia lote II: 3A (CO₂ a 70 °C e 240 bar); 3B (CO₂ + 5 % etanol); 3C (CO₂ + 5 % acetato de etila); 4A (Soxhlet com n-hexano); 5A (PLE com n-hexano a 70 °C); F4: fração isolada do óleo de candeia.

^a número de registro CAS, de acordo com ADAMS (2001).

O óleo da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) já é conhecido pela sua composição de α -bisabolol e as altas concentrações reportadas neste estudo estão em concordância com outros trabalhos. Para o processo de extração com CO₂ supercrítico, SOUZA *et al.* (2008) obtiveram o óleo com até 74 % de α -bisabolol. RIBAS *et al.* (2014) empregaram CO₂ supercrítico e propano comprimido na extração do óleo de candeia e o teor de α -bisabolol variou entre 36,19 a 60,91 %. Aplicando a extração convencional por hidrodestilação, MORI *et al.* (2009) extraíram um óleo com 71,6 % de α -bisabolol. Pelo mesmo processo, BRAUN *et al.* (2003), GALDINO *et al.* (2006), NASCIMENTO *et al.* (2007) e LIMA *et al.* (2013), obtiveram óleos com concentrações até 55,9, 72,9, 63,0 e 65,2 %, respectivamente. Em relação às variações encontradas para as concentrações de bisabolol no óleo de candeia, MORI *et al.* (2009) verificaram que o óleo extraído de árvores mais jovens e localizadas em áreas de maiores altitudes apresenta os maiores teores do sesquiterpeno.

Como apresentado, a concentração de α -bisabolol no óleo extraído pela tecnologia supercrítica é similar a do óleo essencial obtido pela hidrodestilação. Os óleos também apresentam similaridade qualitativa em relação aos outros compostos identificados. No óleo essencial extraído por BRAUN *et al.* (2003), os compostos majoritários, além do α -bisabolol, foram: o sesquiterpeno eremantina (4,8 %), óxido de α -bisabolol B (7,5 %), 11 β ,13-dihidroeremantina (2,9 %) e ácido isovalérico (1,1 %). O óleo essencial extraído por LIMA *et al.* (2013) apresentou eremantina (0,41 %), óxidos de α -bisabolol A e B (0,27 e 10,4 %, respectivamente) e β -bisaboleno (2,95 %).

Em relação aos componentes identificados no óleo de candeia deste trabalho, o sesquiterpeno α -bisabolol apresenta atividade anti-inflamatória, desinfetante, antibacteriana, dermatológica, e antiespasmódica (KAMATOU & VILJOEN, 2010), como já comentado anteriormente, e é amplamente empregado em formulações dermatológicas e cosméticas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O α -bisabolol apresenta suscetibilidade à oxidação, e os produtos formados são principalmente os óxidos de α -bisabolol A e B, que também exibem atividade anti-inflamatória (WALECZEK *et al.*, 2003). ELIZA *et al.* (2009) mostraram que o sesquiterpeno eremantina possui atividade hipoglicêmica no tratamento de diabetes. No trabalho de DURAI PANDIYAN *et al.* (2012), verificou-se que os

sesquiterpenos eremantina e costunolida isolados de *Costus speciosus* mostraram uma significativa atividade antifúngica.

Devido à concentração elevada de α -bisabolol no óleo extraído da madeira de candeia, o processo de isolamento do sesquiterpeno por cromatografia em coluna foi eficiente e a fração (F4) mais pura foi obtida com um teor de 98,23 % do sesquiterpeno.

5.3.2 Concentração de α -bisabolol

Na análise de composição química dos óleos foi empregado o método de normalização de área, uma técnica que apresenta alguns inconvenientes, tais como propagação de erros devido à interdependência dos resultados, além de considerar que todos os componentes sejam detectados (VISENTAINER, 2012).

A cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada para a quantificação do α -bisabolol nas amostras de óleo extraídas da madeira de candeia e do resíduo industrial visto que esta técnica pode analisar tanto os compostos voláteis quanto não voláteis (MERFORT, 2002), sendo amplamente utilizada para a análise de sesquiterpenos (PEDRO *et al.*, 2009). Para isso, empregou-se uma curva de calibração com o padrão do composto e os resultados são apresentados na Tabela 5.13.

A maior quantidade de α -bisabolol para as extrações utilizando a madeira de candeia, 74,45 %, foi obtida na condição de maior temperatura e menor pressão do planejamento (70 °C e 160 bar), correspondente à menor densidade do CO₂ (0,549 g cm⁻³). Por outro lado, a amostra que apresentou a menor quantidade de α -bisabolol, 65,31 %, foi obtida na condição de maior densidade do solvente (0,873 g cm⁻³), equivalente a 40 °C e 240 bar. Analisando os resultados, percebe-se que ambas as variáveis temperatura e pressão são significativas no conteúdo de α -bisabolol extraído. A temperatura apresenta um efeito positivo enquanto a pressão, um efeito negativo, visto que menores densidades do solvente são conseguidas em condições de maiores temperaturas e menores pressões.

Tabela 5.13 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote I) e resíduo industrial com CO₂ supercrítico.

Material	T (°C)	P (bar)	α -bisabolol (%)	$g_{\alpha\text{-bisabolol}} \text{ kg}_{\text{madeira}}^{-1}$
Candeia	40	160	70,92	8,47
	40	240	65,31	8,45
	70	160	74,45	8,86
	70	240	69,38	10,00
	55	200	70,33 $\pm$ 0,38	9,13 $\pm$ 0,11
Resíduo	40	160	48,11	1,30
	40	240	45,73	1,33
	70	160	50,62	1,62
	70	240	39,75	1,63
	55	200	45,75 $\pm$ 1,16	1,50 $\pm$ 0,01

Como apresentado na Tabela 5.13, pode-se verificar que, embora o óleo extraído na condição de menor densidade do solvente tenha apresentado o maior teor do α -bisabolol, na condição de 70 °C e 240 bar foi possível obter o maior rendimento α -bisabolol (g do sesquiterpeno para cada quilograma de madeira), 10,00 g kg⁻¹, contra 8,86 g kg⁻¹ para a condição de 70 °C e 160 bar, ou seja, um aumento de 13 %.

Nas extrações do óleo do resíduo industrial, o maior conteúdo de α -bisabolol (50,62 %) também foi obtido na condição de menor densidade do solvente (70 °C e 160 bar) e a menor quantidade deste composto (39,75 %) foi encontrado para a amostra extraída a 70 °C e 240 bar, maior nível do planejamento. Em ambas as condições descritas, o rendimento do sesquiterpeno foi praticamente a mesma, 1,62 g kg⁻¹ para a extração 70 °C e 160 bar e 1,63 g kg⁻¹ a 70 °C e 240 bar, sendo que neste caso a menor pressão de extração pode ser empregada.

Quanto às extrações do óleo da madeira de candeia (lote II) com CO₂ supercrítico e adição dos cossolventes etanol e acetato de etila, as concentrações de α -bisabolol nas amostras foram de 68,88 a 77,97 %, não apresentando diferença significativa entre si pela análise de Tukey a 5 % (Tabela 5.14). Por outro lado, avaliando o rendimento, a adição do cossolvente etanol resultou no aumento da quantidade extraída deste composto em relação à extração com CO₂ puro. Para a adição de 1, 3 e 5 % de etanol, o aumento do rendimento do sesquiterpeno foi de 10, 14 e 41 %, respectivamente, sendo possível obter até 16,53 g α -bisabolol kg_{madeira}⁻¹. Com 5% de acetato de etila o rendimento do composto foi 19 % superior ao obtido com solvente puro, correspondendo a 14,04 g α -bisabolol kg_{madeira}⁻¹.

Tabela 5.14 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) com CO₂ supercrítico e cossolventes.

Extração	α -bisabolol (%)	g α -bisabolol kg _{madeira} ⁻¹
CO ₂	75,78 $\pm$ 2,67 ^a	11,75 $\pm$ 0,41 ^a
CO ₂ + 1% EtOH	77,97 $\pm$ 3,94 ^a	12,91 $\pm$ 0,65 ^{ab}
CO ₂ + 3% EtOH	68,88 $\pm$ 2,14 ^a	13,43 $\pm$ 0,42 ^{ab}
CO ₂ + 5% EtOH	70,33 $\pm$ 2,25 ^a	16,53 $\pm$ 0,53 ^c
CO ₂ + 1% EtAc	77,42 $\pm$ 3,17 ^a	11,89 $\pm$ 0,49 ^{ab}
CO ₂ + 3% EtAc	77,05 $\pm$ 2,99 ^a	12,31 $\pm$ 0,48 ^{ab}
CO ₂ + 5% EtAc	75,45 $\pm$ 3,95 ^a	14,04 $\pm$ 0,73 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

QUEIROZ & CAJAIBA (2016) verificaram que a adição do cossolvente etanol nas extrações com CO₂ supercrítico teve a maior contribuição para o aumento no rendimento da extração do α -bisabolol dentre as variáveis estudadas (quantidade de etanol, pressão, temperatura e tempo de extração), e os valores variaram de 0,6 a 7,4 g α -bisabolol kg_{madeira}⁻¹.

Para as extrações com os solventes etanol, acetato de etila e n-hexano, pelos métodos Soxhlet e PLE, o teste Tukey a 5 % mostrou que não houve diferença significativa na concentração do sesquiterpeno quando se empregou o mesmo solvente em ambas as técnicas de extração, assim como para as diferentes temperaturas na PLE. Os resultados são apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) pelos métodos Soxhlet e PLE.

Método	Solvente	T(°C)	α -bisabolol (%)	$\text{g}_{\alpha\text{-bisabolol}} \text{kg}_{\text{madeira}}^{-1}$
PLE	Etanol	40	$20,21 \pm 0,14^a$	$8,36 \pm 0,06^a$
		55	$20,68 \pm 1,13^a$	$10,40 \pm 0,57^a$
		70	$19,23 \pm 0,16^a$	$10,69 \pm 0,09^a$
Soxhlet		± 78	$19,44 \pm 1,95^a$	$14,06 \pm 1,41^b$
PLE	Acetato de etila	40	$29,23 \pm 0,08^a$	$8,51 \pm 0,02^a$
		55	$32,98 \pm 0,17^a$	$12,73 \pm 0,07^b$
		70	$32,53 \pm 0,06^a$	$13,59 \pm 0,84^b$
Soxhlet		± 77	$30,15 \pm 2,47^a$	$15,37 \pm 1,26^b$
PLE	n-Hexano	40	$63,39 \pm 1,49^a$	$3,33 \pm 0,08^a$
		55	$64,23 \pm 1,89^a$	$4,79 \pm 0,14^b$
		70	$63,40 \pm 1,29^a$	$5,36 \pm 0,11^b$
Soxhlet		± 68	$59,89 \pm 2,75^a$	$9,41 \pm 0,43^c$

Letras iguais na mesma coluna, e para o mesmo solvente, indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

As maiores quantidades de α -bisabolol para as extrações com etanol, acetato de etila e n-hexano, foram de 20,68, 32,98 e 64,23 %, respectivamente. Embora as extrações com etanol e acetato de etila (PLE e Soxhlet) tenham apresentado elevado rendimento do sesquiterpeno α -bisabolol (8,36 a $15,37 \text{ g}_{\alpha\text{-bisabolol}} \text{kg}_{\text{madeira}}^{-1}$), é importante considerar que isto se deve à elevada

quantidade de extrato obtida com estes solventes, pois a pureza dos mesmos foi baixa (19,23 a 32,98 %).

Tabela 5.16 - Concentração de α -bisabolol nos óleos extraídos da madeira de candeia (lote II) com n-hexano assistido por ultrassom.

Experimento	Variáveis			Resposta	
	x_1	x_2	x_3	Y_2	
	Temperatura (°C)	Razão (mL g ⁻¹)	Amplitude ^a (%)	α -bisabolol (%)	$g_{\alpha\text{-bisabolol}}$ kg _{madeira} ⁻¹
1	40	10	60	69,14 ± 2,50 ^a	7,26 ± 0,26 ^a
2	60	10	60	63,52 ± 1,17 ^a	7,43 ± 0,14 ^{ab}
3	40	20	60	63,78 ± 1,15 ^a	7,78 ± 0,14 ^{abc}
4	60	20	60	67,17 ± 1,31 ^a	8,60 ± 0,17 ^{cd}
5	40	15	30	64,05 ± 2,37 ^a	7,43 ± 0,29 ^{ab}
6	60	15	30	64,38 ± 1,58 ^a	7,47 ± 0,18 ^{ab}
7	40	15	90	70,31 ± 3,07 ^a	7,87 ± 0,34 ^{abc}
8	60	15	90	63,35 ± 1,69 ^a	8,30 ± 0,22 ^{bcd}
9	50	10	30	66,82 ± 2,93 ^a	7,68 ± 0,34 ^{abc}
10	50	20	30	65,88 ± 2,56 ^a	8,43 ± 0,33 ^{cd}
11	50	10	90	69,98 ± 2,67 ^a	8,12 ± 0,31 ^{abcd}
12	50	20	90	67,90 ± 1,55 ^a	8,90 ± 0,20 ^d
13	50	15	60	65,90 ± 0,78 ^a	8,20 ± 0,10 ^{bcd}

^a Porcentual relativo à potência nominal do equipamento (500 W).

Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

Assim como na técnica Soxhlet, amostras com altas concentrações de α -bisabolol foram obtidas com o solvente n-hexano pelas extrações assistidas por ultrassom. Embora os valores apresentados na Tabela 5.16 tenham variado entre 63,35 e 70,31 %, o teste Tukey a 5 % mostrou que não houve diferença significativa no conteúdo do sesquiterpeno para as condições empregadas. No

entanto, pelo mesmo teste de comparação de médias, quando se avalia o rendimento de α -bisabolol, dado pelo rendimento de óleo e a concentração do sesquiterpeno, verifica-se influência das variáveis estudadas, temperatura, razão líquido/sólido e amplitude da potência. A diferença entre o maior e menor rendimento foi de aproximadamente 23 %, sendo o máximo de 8,90 g $_{\alpha\text{-bisabolol}}$ kg $_{\text{madeira}}^{-1}$ obtido no experimento 12 (50 °C; 20 mL g $^{-1}$; 90 %).

Avaliando as quatro técnicas empregadas para a obtenção do óleo de candeia (CO₂ supercrítico, Soxhlet, PLE e ultrassom), a extração supercrítica com adição de 5 % do cossolvente etanol, a 70 °C e 240 bar, foi a que proporcionou o maior rendimento do sesquiterpeno de interesse (16,53 g $_{\alpha\text{-bisabolol}}$ kg $_{\text{madeira}}^{-1}$), seguida da extração Soxhlet com acetato de etila (15,37 g $_{\alpha\text{-bisabolol}}$ kg $_{\text{madeira}}^{-1}$). Embora sejam quantidades próximas, deve-se ressaltar a baixa pureza do extrato obtido da segunda técnica em termos de α -bisabolol, bem como os inconvenientes do método, tais como elevado tempo de extração e quantidade requerida de solvente, bem como, a necessidade de separação do solvente do óleo ao final do processo (WANG & WELLER, 2006).

5.3.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante

Os óleos extraídos da madeira de candeia com CO₂ puro e com adição de 5 % e dos cossolventes etanol e acetato de etila, bem como os obtidos pelos métodos Soxhlet e PLE, foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos (TPC) e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP; o primeiro mede a capacidade de eliminação de radicais livres (MIGUEL, 2010) e o segundo mede a capacidade da amostra em reduzir o complexo Fe³⁺-TPTZ em Fe²⁺-TPTZ. Os resultados para as extrações supercríticas são apresentados na Tabela 5.17.

Os óleos da madeira de candeia (lote I) tiveram os melhores resultados na extração conduzida na maior temperatura e pressão do planejamento, 70 °C e 240 bar. Segundo CZAİKOSKI *et al.* (2015), óleos essenciais e extratos vegetais são considerados ter atividade antioxidante quando seu IC₅₀, concentração necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH, for menor que 250 µg mL⁻¹. Assim, o método DPPH revelou baixa atividade

antioxidante para os óleos extraídos (1122 a 604 $\mu\text{g mL}^{-1}$), explicável pelas suas altas concentrações de α -bisabolol, que não exibiu atividade antioxidante ($\text{IC}_{50} > 10000 \mu\text{g mL}^{-1}$). VAN ZYL *et al.* (2006) reportaram um $\text{IC}_{50} > 450 \mu\text{g mL}^{-1}$ para este sesquiterpeno puro.

Tabela 5.17 – Fenólicos totais e atividade antioxidante dos óleos da madeira de candeia extraídos com CO_2 supercrítico puro e com a adição de cossolventes.

Material	T ($^{\circ}\text{C}$)	P (bar)	TPC ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$)
Candeia Lote I	40	160	$34,5 \pm 0,6^b$	900 ± 15^b	425 ± 3^c
	70	160	$29,2 \pm 0,6^a$	1122 ± 15^c	317 ± 2^a
	40	240	$36,8 \pm 0,7^{bc}$	646 ± 13^a	584 ± 3^d
	70	240	$40,6 \pm 0,8^d$	604 ± 14^a	601 ± 6^d
	55	200	38 ± 1^{cd}	635 ± 37^a	532 ± 7^b
Candeia Lote II	70	240	31 ± 2^a	716 ± 35^b	529 ± 1^a
	$\text{CO}_2 + 5\% \text{ EtOH}$		33 ± 1^{ab}	605 ± 39^{ab}	565 ± 9^b
	$\text{CO}_2 + 5\% \text{ EtAc}$		$36,2 \pm 0,7^b$	489 ± 15^a	598 ± 13^b
α - bisabolol	-	-	-	>10000	$61,13 \pm 3,07$

Letras iguais na mesma coluna, e para o mesmo lote de candeia, indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

IC_{50} : concentração do óleo necessária para reduzir a concentração inicial da solução de DPPH em 50 %; FRAP: Capacidade do antioxidante em reduzir os íons férricos (Fe^{3+}).

Em geral, extratos obtidos de extração supercrítica com CO_2 apresentam baixa atividade antioxidante devido ao caráter apolar deste solvente, que não favorece a extração dos compostos fenólicos (29 a $41 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$), substâncias de caráter geralmente polar, responsáveis pela capacidade antioxidante (DIAS *et al.*, 2017). Nos estudos de extração com CO_2 supercrítico, MICHIELIN *et al.* (2009), encontraram IC_{50} de 228 a $1052 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos de *Cordia verbenacea* DC. ANDRADE *et al.* (2012), reportaram valores IC_{50} de 1706 a 2129

$\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos de casca de café e de 478 a 2369 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos de borra de café. Para os extratos de flores de *Eupatorium intermedium*, CZAİKOSKI *et al.* (2015), encontraram IC_{50} de 5231 a 6720 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nos testes pelo método FRAP, a maior atividade para os óleos foi equivalente a 601 μM de Fe^{2+} por g de óleo da madeira de candeia e o sesquiterpeno α -bisabolol apresentou capacidade redutora de 61,13 $\mu\text{M Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$. LADO *et al.* (2004) analisaram a capacidade redutora do α -bisabolol puro pelo método FRAP e o valor encontrado foi de 2,68 $\mu\text{M Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$. Neste mesmo trabalho, os autores encontraram a capacidade redutora de 145 $\mu\text{M g}^{-1}$ para o óleo essencial de *Chamomillae anthodium*, sendo este constituído de 45 % de α -bisabolol. Desta forma, pode-se concluir que a capacidade antioxidante observada está relacionada aos outros compostos presentes no óleo.

Embora o α -bisabolol não tenha apresentado capacidade antioxidante nos testes *in vitro* (Tabela 5.17), estudos mostram que este sesquiterpeno apresenta atividade antioxidante em testes biológicos. ROCHA *et al.* (2010) mostrou que o α -bisabolol apresenta efeito de proteção nas lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Os resultados encontrados por BRAGA *et al.* (2009) mostram que o α -bisabolol é um potencial agente antioxidante capaz de diminuir o estresse oxidativo causado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e, consequentemente diminui as reações inflamatórias.

Para as extrações com a madeira do lote II, verifica-se que a adição do cossolvente acetato de etila elevou, mais significativamente, a quantidade de fenólicos totais no óleo extraído e a capacidade antioxidante dos mesmos. Para a extração com CO_2 puro, os fenólicos totais foram de 31 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{óleo}}^{-1}$, enquanto, para a adição de 5 % de etanol e acetato de etila, os valores foram de 33 e 36 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{óleo}}^{-1}$, respectivamente. A análise estatística, teste Tukey 5 %, mostrou que, somente o óleo extraído com CO_2 + 5% de acetato de etila apresentou TPC significativamente maior que a amostra extraída sem cossolvente.

Embora os valores de IC_{50} tenham reduzido com a adição dos cossolventes, as amostras ainda apresentaram baixa inibição. A adição de 5 % de acetato de etila reduziu o IC_{50} de 716 para 489 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparado a amostra extraída com CO_2 puro. Similarmente, pelo método FRAP, a adição dos

cossolventes elevaram a capacidade antioxidante dos óleos extraídos, de $529 \mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$ (extração com CO_2) para 565 e $598 \mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$, com a adição de etanol e acetato de etila, respectivamente.

Na Tabela 5.18 são apresentados os resultados para as amostras extraídas com os solventes orgânicos, métodos Soxhlet e PLE. Assim como verificado nas extrações supercríticas com CO_2 , os solventes polares etanol e acetato de etila favorecem a recuperação de compostos fenólicos (flavonoides, taninos, fenóis simples e ácidos fenólicos). As maiores concentrações de fenólicos foram verificadas para as extrações com etanol, seguido do acetato de etila e do n-hexano (35 a $131 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$). A atividade antioxidante também foi maior de acordo com a polaridade do solvente, explicado pela maior quantidade de compostos fenólicos nestas amostras.

Tabela 5.18 – Fenólicos totais (TPC) e atividade antioxidante dos óleos da madeira de candeia extraídos pelos métodos Soxhlet e PLE.

Método	Solvente	T(°C)	TPC ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{g}_{\text{óleo}}^{-1}$)
PLE	Etanol	40	$126 \pm 2,92^{\text{ab}}$	$59,3 \pm 0,4^{\text{d}}$	$1949 \pm 123^{\text{a}}$
		55	$131 \pm 2,45^{\text{b}}$	$50,4 \pm 0,9^{\text{c}}$	$2003 \pm 110^{\text{a}}$
		70	$131 \pm 1,98^{\text{b}}$	$36,7 \pm 0,5^{\text{a}}$	$1986 \pm 115^{\text{a}}$
Soxhlet		± 78	$120 \pm 4,11^{\text{a}}$	$45,6 \pm 0,7^{\text{b}}$	$1848 \pm 89^{\text{a}}$
PLE	Acetato de etila	40	$110 \pm 2,28^{\text{c}}$	$71 \pm 2^{\text{b}}$	$1582 \pm 59^{\text{b}}$
		55	$102 \pm 0,84^{\text{b}}$	$78 \pm 2^{\text{c}}$	$1538 \pm 45^{\text{ab}}$
		70	$114 \pm 1,49^{\text{c}}$	$55 \pm 2^{\text{a}}$	$1619 \pm 25^{\text{b}}$
Soxhlet		± 77	$91 \pm 3,95^{\text{a}}$	$71 \pm 1^{\text{b}}$	$1405 \pm 47^{\text{a}}$
PLE	n- Hexano	40	$35,0 \pm 0,6^{\text{a}}$	$911 \pm 30^{\text{b}}$	$438 \pm 18^{\text{a}}$
		55	$37 \pm 1^{\text{ab}}$	$879 \pm 30^{\text{b}}$	$419 \pm 19^{\text{a}}$
		70	$40 \pm 2^{\text{b}}$	$616 \pm 17^{\text{a}}$	$443 \pm 17^{\text{a}}$
Soxhlet		± 68	$35 \pm 3^{\text{a}}$	$1036 \pm 39^{\text{c}}$	$433 \pm 19^{\text{a}}$

Letras iguais na mesma coluna, e para o mesmo solvente, indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5 %.

Avaliando as extrações com o mesmo solvente, os extratos obtidos em Soxhlet apresentaram os menores valores de TPC e atividade antioxidante em relação à extração PLE, indicando que a segunda técnica é capaz de recuperar os compostos fenólicos em menor tempo e com menor uso de solvente. Outra observação é o efeito positivo da temperatura na PLE, obtendo-se as maiores concentrações de fenólicos, e consequentemente, atividades antioxidantes na temperatura de 70 °C. Comportamento similar foi obtido por VIGANÓ *et al.* (2016) para os extratos da casca de maracujá obtidos com etanol a 30, 45 e 60 °C e pressão de 100 bar. No trabalho de GARCIA-MENDOZA *et al.* (2017), o efeito positivo do aumento da temperatura (40, 60 e 80 °C) na extração dos compostos fenólicos do resíduo industrial de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) foi atribuído, possivelmente, ao aumento da solubilidade destes compostos no solvente, devido às menores interações soluto-matriz com a temperatura e menor viscosidade e tensão superficial do solvente que facilita sua penetração na matriz sólida.

A relação entre os resultados dos métodos DPPH e FRAP com os valores de TPC obtidos neste trabalho sugerem que os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante dos óleos analisados, como também observado em trabalhos anteriores (TABART *et al.*, 2009; SIM *et al.*, 2010; KEDARE & SINGH, 2011; GUINDANI *et al.*, 2016). Os elevados coeficientes da correlação linear de Pearson (Tabela 5.19) para os resultados das análises apresentados Tabelas 5.17 e 5.18 evidenciam a afirmação anterior.

Tabela 5.19 – Coeficiente de correlação linear de Pearson (*r*) entre resultados dos ensaios de atividade antioxidante obtidos para o óleo de candeia.

Correlação	<i>r</i>
Fenólicos totais e DPPH	-0,91
Fenólicos totais e FRAP	0,99
DPPH e FRAP	-0,93

De acordo com os resultados, o aumento da concentração de compostos fenólicos nas amostras teve uma alta influência na capacidade antioxidante das mesmas. A correlação negativa entre TPC e DPPH de ($r=-0,91$) indica que quanto

maior o teor de compostos fenólicos, menor a concentração necessária da amostra para reduzir os radicais DPPH. A correlação entre TPC e FRAP foi de $r=0,99$ e entre os métodos DPPH e FRAP a correlação foi alta, com $r=-0,93$, sendo o coeficiente negativo explicado pelos valores de IC_{50} do primeiro método, ou seja, quanto menor o IC_{50} requerido maior a atividade antioxidante da amostra.

A alta correlação encontrada pode ser explicada devido aos métodos TPC, com emprego do reagente de Folin-Ciocalteu, DPPH e FRAP se basearem no mesmo mecanismo de reação, por transferência de elétrons do antioxidante para reduzir um oxidante (HUANG *et al.*, 2005; BOEING *et al.*, 2014; BALLUS *et al.*, 2015).

5.3.4 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* do óleo de candeia, extraído com CO_2 puro a 70 °C e 240 bar, e do α -bisabolol, obtido do fracionamento do óleo, foi avaliada contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas empregando o método de microdiluição. Dentre as sete espécies bacterianas testadas, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. Typhi*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, somente as duas últimas apresentaram inibição para as concentrações utilizadas ($\leq 5000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) para estas duas espécies são apresentadas na Tabela 5.20.

Tabela 5.20 – Concentração inibitória mínima (MIC) do óleo de candeia extraído com CO_2 , 70 °C e 240 bar, e do α -bisabolol para a inibição de *S. aureus* e *S. aureus* MRSA.

Espécie bacteriana	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Controle Positivo
	Óleo	α -bisabolol	Ampicilina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>S. aureus</i>	325	2500	4
<i>S. aureus</i> MRSA	2500	5000	62

Conforme relatado em outros trabalhos (MICHIELLIN *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013, GUINDANI *et al.*, 2016), extratos naturais são classificados quanto à sua atividade antibacteriana pelo valor de MIC: forte inibidor para MIC até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; inibidor moderado para MIC entre 600 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e fraco para MIC acima de 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo de candeia extraído com CO_2 supercrítico apresentou forte inibição de *S. aureus*, apresentando MIC de 325 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e fraca atividade contra a espécie *S. aureus* MRSA, MIC de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O principal composto do óleo de candeia, o sesquiterpeno α -bisabolol, apresentou baixa inibição das espécies *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, com MICs de 2500 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, levando-se à conclusão de que a elevada atividade do óleo extraído com CO_2 supercrítico contra *S. aureus* está relacionada aos outros constituintes da amostra ou sinergismo entre eles.

NASCIMENTO *et al.* (2007) também verificaram que a inibição de *S. aureus* não estava relacionada à presença majoritária do α -bisabolol no óleo essencial de *E. erythropappus*. No trabalho de KAZEMI (2014) a inibição de *S. aureus* foi testada para o α -bisabolol e óxido de bisabolol e a maior atividade foi obtida para o segundo constituinte. Dois outros sesquiterpenos, também presentes no óleo de candeia, o eremantina e costunolida, foram avaliados contra *S. aureus*, não sendo obtida inibição da espécie (DURAIPANDIYAN *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a afirmação, já dada em trabalhos anteriores, de que a tecnologia supercrítica empregando dióxido de carbono é vantajosa para a obtenção do óleo da madeira de candeia (*Eremanthus Erythropappus*), com elevada concentração do sesquiterpeno α -bisabolol.

O maior rendimento das extrações com CO₂ foi obtido na condição mais elevada do planejamento experimental (70 °C e 240 bar), correspondendo a 1,42 % para a madeira de candeia e 0,41 % para o resíduo industrial. Este último resultado demonstra o material ainda tem potencial para a recuperação de óleo. Um aumento significativo de até 52 % no rendimento do óleo da candeia foi obtido com a adição do cossolvente etanol ao CO₂ supercrítico.

Pelas técnicas Soxhlet e PLE, embora os solventes polares etanol e acetato de etila tenham proporcionado os maiores rendimentos, somente os óleos obtidos com n-hexano apresentaram alta pureza no composto de interesse, α -bisabolol. Com este solvente apolar, nas extrações assistidas por ultrassom foi possível obter até 83 % do rendimento obtido na técnica convencional em Soxhlet, com volume de solvente 2,5 vezes menor e 7 minutos de extração.

Em relação às técnicas empregadas, deve-se ressaltar a importância de se obter um produto com elevada pureza no composto de interesse aliado a um alto rendimento. Assim, pelos resultados obtidos, a extração supercrítica com adição de 5 % de etanol foi a mais favorável para a extração do óleo da madeira de candeia, com a vantagem de não necessitar de uma etapa adicional para a separação do solvente do óleo ao final do processo. Além disso, deve-se ressaltar a inocuidade biológica do solvente etanol em comparação ao n-hexano e acetato de etila.

Visto que o α -bisabolol não apresentou atividade antioxidante, os óleos da madeira de candeia constituídos majoritariamente por este sesquiterpeno, tais como os das extrações supercrítica e os extraídos com n-hexano, também apresentaram baixa atividade pelos métodos DPPH e FRAP. Diferentemente deste sesquiterpeno, o óleo extraído da madeira de candeia apresenta alta inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar condições de pressões maiores de 240 bar na extração do óleo da madeira de candeia com CO₂ supercrítico, visto o efeito positivo desta variável no rendimento;
- Investigar o efeito da vazão mássica de solvente e tamanho de partícula no rendimento;
- Empregar o cossolvente etanol em concentrações maiores do que as utilizadas neste estudo, para avaliação do efeito no rendimento e teor de α -bisabolol;
- Investigar a composição química dos extratos obtidos com os solventes polares na extração Soxhlet e PLE;
- Determinar os compostos fenólicos nos extratos obtidos com os solventes polares na extração Soxhlet e PLE por cromatografia líquida;
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo de candeia e do α -bisabolol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E.D., BOLZAN, A., LIVIA, M.A. **Supercritical extraction of residues *Mezilaurus itauba* and application of mathematical models.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 95, p. 92-99, 2014.
- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2001. 459p
- ADEODATO, S.; FRANÇA, M.S.J.; COELHO, A.M.; BRANCO, P.D. **Do Brasil para o mundo: inovação e sustentabilidade nas cadeias globais de valor.** Pigma, São Paulo, 2015, 55 p.
- AINSWORTH, E., GILLESPIE, K. M. **Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent.** *Nature Protocols*, v. 2, p. 875-877, 2007.
- AKAY, S., ALPAK, I., YESIL-CELIKTAS, O. **Effects of process parameters on supercritical CO₂ extraction of total phenols from strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: An optimization study.** *Journal of Separation Science*, v. 34, p., 1925-1931, 2011.
- AMEER, K., SHAHBAZ, H.M., KWON, J. **Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, p. 295-315, 2017.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- ANDENBERG, A.A., BALDWIN, B.G., BAYER, R.G., BREITWIESER, J., JEFFREY, C., DILLON, M.O., ELDEÑAS, P., FUNK, V., GARCIA-JACAS, N., HIND, D.J.N., KARIS, P.O., LACK, H.W., NESON, G., NORDENSTAM, B., OBERPRIELER, CH., PANERO, J.L., PUTTOCK, C., ROBINSON, H., STUESSY, T.F., SUSANNA, A., URTUBEY, E., VOGT, R., WARD, J. & WATSON, L.E. **Compositae.** In: KADEREIT, J. W.; JEFFREY, C (Eds.). **Flowering Plants Eudicots Asterales.** Vol. 8, Springer – Verlag, 2007. 588 p.
- ANDERSEN, F.L. **Final Report on the Safety Assessment of Bisabolol.** *International Journal of Toxicology*, v. 18, p. 33-40, 1999.
- ANDRADE, K.S., GONÇALVES, R.T., MARASCHIN, M., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M., MARTÍNEZ, J., FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of**

operational variables on extract composition. *Talanta*, v. 88, p. 544–552, 2012.

AOAC-Association of Official Analytical Chemist. **Official Methods of Analysis**, 19th ed. AOAC, Gaithersburg, 2012. 3000p.

ASEP, E.K., JINAP, S., JAHURUL, M.H.A., ZAIDUL, I.S.M., SINGH, H. **Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 20, p. 152–160, 2013.

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

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M.M. **Biological effects of essential oils- a review.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chemistry*, v. 99, p. 191–203, 2006.

BALLUS, C.A., MEINHART, A.D., CAMPOS, F.A.S., GODOY, H.T. **Total phenolics of virgin olive oils highly correlate with the hydrogen atom transfer mechanism of antioxidant capacity.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 92, p. 843–851, 2015.

BARTON, P., HUGHES, R.E., HUSSEIN, M.M. **Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 5, p. 157–162, 1992.

BATHIA, S.P., MCGINTY, D., LETIZIA, C.S., API, A.M. **Fragrance material review on α -bisabolol.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 72–76, 2008.

BENELLI, P., RIEHL, C.A.S., SMÂNIA JR., A., SMÂNIA, E.F.A., FERREIRA, S.R.S. **Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, p. 132–141, 2010.

BENZIE, I.F., STRAIN, J.J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70–76, 1996.

BERMEJO, D.V., IBÁÑEZ, E., REGLERO, G., FORNARI, T. **Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO₂ extraction of caffeine from green tea.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 507–512, 2016.

BERMEJO, V.D., ANGELOV, I., VICENTE, G., STATEVA, R.P., GARCIA-RISCO, R.M., REGLERO, G., IBAÑEZ, E., FORNARI, T. **Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, p. 2901-2907, 2015.

BISCAIA, D., FERREIRA, S.R.S. **Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 51 17–23, 2009.

BOEING, J.S., BARIZÃO, E.O., SILVA, E.B.C., MONTANHER, P.F., ALMEIDA, V.C., VISENTAINER, J.V. **Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis.** *Chemistry Central Journal*, v. 22, p. 1-9, 2014.

BORGES, G.R., JUNGES, A., FRANCESCHI, E., CORAZZA, F.C., CORAZZA, M.L., OLIVEIRA, J.V., DARIVA, C. **High-pressure vapor-liquid equilibrium data for system involving carbon dioxide + organic solvent + β -carotene.** *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 52, p. 1437-1441, 2007.

BORGES, W.M.S., ARANTES, A.C.C., BIANCHI, M.L., RESENDE, E.C., GUERREIRO, M.C., PERÍGOLO, D.M., BOARI, P.V. **Carvão Ativado de Resíduo de Madeira de Candeia: Produção, Caracterização e Avaliação do Potencial Adsorptivo.** *Revista Virtual de Química*, v. 7, p. 1952-1967, 2015.

BOUSBIA, N., VIAN, M., FERHAT, M., MEKLATI, B., CHEMAT, F. **A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: microwave hydrodiffusion and gravity.** *Journal of Food Engineering*, v. 90, p.409–413, 2009.

BOŽOVIĆ, M., NAVARRA, A., GARZOLI, S., PEPI, F., RAGNO, R. **Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology.** *Natural Product Research*, v. 31, p. 2387-2396, 2017.

BRAGA, M.E.M., SANTOS, R.M.S., SEABRA, I.J., FACANALI, R., MARQUES, M.O.M., SOUSA, H.C. **Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 37–48, 2008.

BRAGA, P.C., DAL SASSO, M., FONTI, E., CULICI, M. **Antioxidant Activity of Bisabolol: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Cell-Free Systems.** *Pharmacology*, v. 83, p. 110–115, 2009.

BRAUN, N.A., MEIER, M., KOHLENBERG, B., HAMMAERSCHMIDT, F.J. **Two new bisabolene diols from the stem wood essential oil of *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip. (Asteraceae).** *Journal of Essential Oil Research*, v. 15, p. 139–142, 2003.

BRUNKE, E.J., HAMMERSCHMIDT, F.J. **Constituents of the essential oil of *Salvia stenophylla* – first identification of the (+)- α -bisabolol in nature.** In: **Essential oils and Aromatic Plants.** *Essential Oils and Aromatic Plants*, p 145-150, 1985.

BRUNNER, G. **Gás Extraction. An Introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes.** 1. ed. Darstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. 387p.

BRUNNER, G. **Supercritical fluids: technology and application of food processing.** *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.

ÇAM, M., HIŞİL, Y. **Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels.** *Food Chemistry*, v. 123, p. 878-885, 2010.

CAMOLESI, J.F.; SCOLFORO, J.R.S.; OLIVEIRA, A.D.; ACERBI JR, F.W., RUFINI, A. L., MELLO, J.M. **Ajuste, seleção e teste de identidade de modelo para volume e número de moirões da candeia (*Eremanthus erythropappus*).** *Cerne*, v. 16, p. 431-441, 2010

CAO, X.L. **Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods.** *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, v, 9, p. 21-43, 2010.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., REVILLA-RUIZ, P., HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. **Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples.** *Journal of Chromatography A*, v. 1089, p. 1-17, 2005.

CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. F. R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15-25, 2013.

CAROCHO, M., MORALES, P., FERREIRA, I.C.F.R. **Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 71, 107-120, 2018.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira.** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.

CASTELO-BRANCO, V.N., TORRES, A.G. **Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos.** *Revista de Nutrição*, v. 24, p. 173-187, 2011.

CASTRO, M.D.L., VALCÁRCEL, M., TENA, M.T. **Analytical Supercritical Fluid Extraction**, Springer-Verlag, New York, 1994, 323p.

CERPA, M. G., MATO, R. B., COCERO, M. J., CERIANI, R., MEIRELLES, A. J. A., PRADO, J. M., LEAL, P. F., TAKEUCHI, T. M., MEIRELES, M. A. A. **Steam Distillation Applied to the Food Industry**. In: MEIRELES, M.A.A., COCERO, M.J., PRADO, J.M., CERPA, M.G., MEIRELLES, A.J.A., CERIANI, R., LEAL, P.F., MATO, R.B., TAKEUCHI, T.M. **Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications**. CRC Press, 2008. p. 11-73.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A., ABERT-VIAN, M. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHEMAT, F., ZILL-E-HUMA; KHAN, M.K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.18, p. 813–835, 2011.

CHOI, C. W., KIM, S. C., HWANG, S. S., CHOI, B. K., AHN, H. J., LEE, M. Y., PARK, S. H., KIM, S. K. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison**. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLARK, A., KHWEISS, N., SALAZAR, L., VERDADERO, L. **Promoting sustainability in the value chain of natural bisabolol, a Brazilian rainforest product**. School of International and Public Affairs, SIPA at Columbia University, 2011. 120 p.

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, sixth ed., CLSI document M07-A9, 2012.

CONDE, E., HEMMING, J., SMEDS, A., REINOSO, B.D., MOURE, A., WILLFOR, S., DOMINGUEZ, H., PARAJO, J.C. **Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 81, p.193-199, 2013.

CONG-CONG, X, BING, W., YI-QUIONG, P., JIAN-SHENG, T., TONG, Z. **Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials**. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 15, p. 721-731, 2017

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, England, 1975. 414p.

CRAVOTTO, G., BOFFA, L., MANTEGNA, S., PEREGO, P, AVOGADRO, M., CONTAS, P. **Improved extraction of vegetable oils under high-intensity**

ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 898–902, 2008.

CRUZ, P.N., PEREIRA, T.C.S., GUINDANI, C., OLIVEIRA, D.A., ROSSI, M.J., FERREIRA, S.R.S. **Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 229-237, 2017.

CZAIKOSKI, K., MESOMO, M.C., KRÜGER, R.L., QUEIROGA, C.L., CORAZZA, M. L. **Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 98, p. 79-85, 2015.

DAI, J., ORSAT, V., RAGHAVAN, G.S., YAYLAYAN, V. **Investigation of various factors for the extraction of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves.** *Journal of Food Engineering*, v. 96, p. 540–543, 2010.

DANH, L.T., MAMMUCARI, R., TRUONG, P., FOSTER, N. **Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil.** *Chemical Engineering Journal*, v. 155, p. 617-626, 2009.

DAWIDOWICZ, A.L., RADO, E., WIANOWSKA, D., MARDAROWICZ, M., GAWDZIK, J. **Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L.** *Talanta*, v. 76, p. 878-884, 2008.

DETONI, C.B., CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M., HOHLEMWEGER, S.V.A., SAMPAIO, C., BARROS, T.F., VELOZO, E.S. **Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents.** *Journal of Microencapsulation*, v. 26, p. 684-691, 2009.

DIAS, A. L. B., SERGIO, C. S. A., SANTOS, P., BARBERO, G. F., REZENDE, C. A., MARTÍNEZ, J. **Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling.** *Journal of Food Engineering*, v. 198, p. 26-44, 2017.

DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. **Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DIMA, C., DIMA, S. **Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity.** *Current Opinion in Food Science*, v. 5, p. 29-35, 2015.

DOLATOWSKI, Z., STADNIK, J., STASIAK, D. **Application of ultrasound in food technology.** *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 6, p. 89–99, 2007.

- DONADELLI, F.M.M. **Motivações e resultados da certificação florestal: um estudo de caso cadeia de valor da candeia.** *Ambiente & Sociedade*, v. 15, p. 97-121, 2012.
- DURAIPANDIYAN, V., AL-HARBI, N.A., IGNACIMUTHU, S., MUTHUKUMAR, C. **Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolated from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen ex.Retz.) Sm, BMC.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, p. 2-6, 2012.
- DUTRA, F.C., FERRAZ, S.O., PIMENTA, D.S., SOUZA, O.V. **Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeisch, Asteraceae.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 818-824, 2010.
- EDRIS, A.E. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review.** *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 308-323, 2007.
- EL ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., AÏT ADDI, E.H., CASABIANCA, H., EL MOUSADIK, A., HARTMANN, D., JILALE, A., RENAUD, F.N.R., ELAISSARI, A. **Essential oils: From extraction to encapsulation.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, p. 220-243, 2015.
- ELIZA, J., DAISY, P., IGNACIMUTHU, S., DURAIPANDIYAN, V. **Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.)Sm., in STZ-induced diabetic rats.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 182, p. 67–72, 2009.
- ESPINOSA-PARDO, F.A., NAKAJIMA, V.M., MACEDO, G.M., MACEDO, J.A., MARTÍNEZ, J. **Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents,** *Food and Bioprocess Technology*, v. 101, 1–10, 2017.
- ESQUÍVEL, M.M., BERNARDO-GIL, M.G., KING, M.B. **Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 16, p. 43–58, 1999.
- FALCO, N., KIRAN, E. **Volumetric properties of ethyl acetate + carbon dioxide binary fluid mixtures at high pressures.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 61, p. 9-24, 2012.
- FARIDI, P., GHASEMI, Y., GHOLAMI, A., MEHREGAN, I., MOHAGHEGHZADEH, A. **Antimicrobial essential oil from *Smyrniopsis aucheri*.** *Chemistry of Natural Compounds*, v. 44, p. 116-118, 2008.
- FEUEREISEN, M.M., BARRAZA, M.G., ZIMMERMANN, B.F., SCHIEBER, A., SCHULZE-KAYSERS, N. **Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization.** *Food Chemistry*, v. 214, p. 564-557, 2017.

FLAMINI, G., TEBANO, M., CIONI, P., CECCARINI, L., RICCI, A., LONGO, I. **Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven.** *Journal of Chromatography A*, v. 1143, p. 36–40, 2007.

FLASKAMP, E., NONNENMACHER, G., ISAAC, O. **Zur Diastereoisomerie natürlicher und synthetischer α -Bisabolole/On the Diastereoisomerism of Natural and Synthetic α -Bisabolols.** *Zeitschrift für Naturforschung B*, v. 36, p. 114-118, 1981.

FORNARI, T., VICENTE, G., VÁZQUEZ, E., GARCÍA-RISCO, M.R., REGLERO, G. **Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.** *Journal of Chromatography A*, v. p. 1250, 34-48, 2012.

FORZZA, R.C., LEITMAN, P.M., COSTA, A.F., CARVALHO JR., A.A.; PEIXOTO, A.L., WALTER, B.M.T., BICUDO, C., ZAPPI, D., COSTA, D.P., LLERAS, E., MARTINELLI, G., LIMA, H.C., PRADO, J., STEHMANN, J.R., BAUMGRATZ, J.F.A., PIRANI, J.R., SYLVESTRE, L., MAIA, L.C., LOHMANN, L.G., QUEIROZ, L.P., SILVEIRA, M., COELHO, M.N., MAMEDE, M.C., BASTOS, M.N.C., MORIM, M.P., BARBOSA, M.R., MENEZES, M., HOPKINS, M., SECCO, R., CAVALCANTI, T.B., SOUZA, V.C. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil.** V. 1, Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2010. 875 p.

GALDINO, A.P.P., BRITO, J.O., GARCIA, R.F., SCOLFORO, J.R. **Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus ssp*) e a influência das diferentes origens comerciais da sua madeira.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, p. 44-46, 2006.

GARCIA-MENDOZA, M.P., ESPINOSA-PARDO, F.A., BASEGGIO, A.M., BARBERO, G.F., MARTÍNEZ, J. **Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 9-16, 2017.

GOMIDE, R. **Operações com sistemas sólidos granulares.** v. 1, São Paulo. Catalogação na Publicação Câmara Brasileira do Livro, 1983. 293p.

GUINDANI, C., PODESTÁ, R., BLOCK, J.M., ROSSI, M.J., MEZZOMO, N., FERREIRA, S. R. S. **Valorization of chia (*Salvia hispanica*) seed cake by means of supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 112, p. 67-75, 2016.

GUTIÉRREZ, A., DEL RÍO, J.C., GONZÁLEZ-VILA, F.J., MARTÍN, F. **Chemical Composition of Lipophilic Extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. Wood.** *Holzforschung*, v. 53, p. 481–486, 1999.

HALLIWELL, B. **How to characterize a biological antioxidant.** *Free Radical Research Communications*, v. 9, p. 1-32., 1990.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. **The definition and measurement of antioxidants in biological systems.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 18, p. 125-126, 1995.

HAMBURGER, M., BAUMANN, D., ADLER, S. **Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants: effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances.** *Phytochemical Analysis*, v. 15, p. 46-54, 2004.

HEMWIMOL, S., PAVASANT, P., SHOTIPRUK, A. **Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 13, p. 543–548, 2006.

HERRERO, M., CASTRO-PUYAN, M., MENDIOLA, J.A., IBAÑEZ, E. **Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 67-83, 2013.

HERRERO, M., CIFUENTES, A., IBAÑEZ, E. **Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae.** *Food chemistry*, v. 98, p. 136-148, 2006.

HOLLENDER, J., SHNEINE, J., DOTT, W., HEINZEL, M., HAGEMANN, H. W., GOTZ, G. K. E. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases.** *Journal of Chromatography*, v. 776, p.233-243, 1997.

HPLC Column Protection Guide Version 0610. <http://phx.phenomenex.com/lib/gu54810610.pdf>, 2010 (Acessado em 10 de outubro de 2016).

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

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

IBÁÑEZ, E., MENDIOLA, J. A., CASTRO-PUYANA, M. **Supercritical Fluid Extraction.** *Encyclopedia of Food and Health*, p. 227-233, 2016.

ISAAC, O. **Pharmacological investigations with compounds of *Chamomile* i. on the pharmacology of alpha-bisabolol and bisabolol oxides.** *Planta Medica*, v. 35, p. 118-124, 1979.

IVANOVIC, J., RISTIC, M., SKALA, D. **Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 57, p. 129–136, 2011.

JADHAV, D., REKHA, B.N., GOGATE, P.R., RATHOD, V.K. **Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction.** *Journal of Food Engineering*, v. 93, p. 421–426, 2009.

JIA, D., LI, S., XIAO, L. **Supercritical CO₂ extraction of *Plumula nelumbinis* oil: Experiments and modeling.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 50, p. 229–234, 2009.

KAGLIWAL, L.D., POL, A.S., PATIL, S.C., SINGHAL, R.S., PATRAVALE, V.B. **Antioxidant-Rich Extract from Dehydrated Seabuckthorn Berries by Supercritical Carbon Dioxide Extraction.** *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, p. 2768–2776, 2012.

KAMATOU, G.P.P., MAKUNGA, N.P., RAMOGOLA, W.P.N., VILJOEN, A.M.A. **South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p. 664–672, 2008.

KAMATOU, G.P.P., VILJOEN, A.M., **A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, p. 1–7, 2010.

KAZEMI, M. **Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria chamomilla*.** *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, v. 3, p. 148–153, 2014

KEDARE, S.B., SINGH, R.P. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 412–422, 2011.

KHODDAMI, M., WILKES, T.R. *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Molecules*, v. 18, p. 2328–2375, 2013.

KRAUJALIS, P., VENSUTONIS, P.R. **Supercritical carbon dioxide extraction of squalene and tocopherols from amaranth and assessment of extracts antioxidant activity.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 80, p. 78–85, 2013.

LADO, C., THN, M., VARGA, I., SZOKE, E., SZENTMIHÁLYI, K. **Antioxidant Property of Volatile Oils Determined by the Ferric Reducing Ability.** *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 59, p. 354–358, 2004.

LAGOS, J.B., VARGAS, F.C., OLIVEIRA, T.G., MAKISHI, G.L.A., SOBRAL, P.J.A. **Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review.** *Current Opinion in Food Science*, v. 5, p. 1–7, 2015.

LEE, Y. N., CHEN, C.R., YANG, H.L., LIN, C.C., CHANG, M.J. **Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions.** *Separation and Purification Technology*, v. 54, p. 130-138, 2007.

LIAZID, A., BARBERO, G.F., AZAROUAL, L., PALMA, M., BARROSO, C.G. **Stability of anthocyanins from red grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction conditions.** *Molecules*, v. 19, p. 21034-21043, 2014.

LIMA, F.J.W., DANTAS-BARROS, A., SOARES, B.M., SANTOS, D.A., RESENDE, M.A., CARVALHO, M.A.R., SIQUEIRA, E.P., NELSON, D. L. **The composition and anti-microbial activity of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* (DC) Macleish (Candeia).** *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, v. 3, p. 1-10, 2013.

LOBO, V., PHATAK, A., CHANDRA, N. **Free radicals and functional foods: impact on human health.** *Pharmacognosy Reviews*, v. 4, p. 118–126, 2010.

LONGHI, P.R., SOUZA, A.J.D., GARCIA, R.F., PIOVEZAN, V.R. **Estudo de caso do processo de extração do óleo essencial da madeira de candeia no sul de Minas Gerais.** *Floresta*, v. 39, p. 55-570, 2009.

LÓPEZ-ALARCÓN, C., DENICOLA, A. **Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays.** *Analytica Chimica Acta*, v. 6, p. 1-10, 2013.

MA, Y., YE, X., HAO, Y., XU, G., XU, G., LIU, D. **Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 227–232, 2008.

MACHADO, A.P.F., PEREIRA, A.L., BARBERO, F.F., MARTÍNEZ, F. **Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination.** *Food Chemistry*, v. 231, p. 1-10, 2017.

MADHAVAN, B.N. **Final report on the safety assessment of bisabolol.** *International Journal of Toxicology*, v 18, p.:33–40, 1999.

MARKOM, M., HASAN, M., DAUD, W.R.W., SINGH, H., JAHIM, J.M. **Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods.** *Separation and Purification Technology*, v. 52, p. 487–496, 2007

MARTÍNEZ, J. **Estudo de modelos de transferência de massa na interface sólido-fluido durante processos de extração supercrítica.** Universidade Estadual de Campinas, 140 p., 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos).

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**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 172 p., 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos).

MARTÍNEZ, J. L. **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL 2008. 486p.

MARTÍNEZ, J., MARTÍNEZ, J.M. **Fitting the Sovová's supercritical fluid extraction model by means of global optimization tool**. *Computers and Chemical Engineering*, v. 32, p. 1735-1745, 2008.

MARTINEZ, J., MONTEIRO, A., ROSA, P., MARQUES, M., MEIRELES, M. **Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide**. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MARTINS, N., BARROS, L., FERREIRA, I.C.F.R. **In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps**. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 1-12, 2016.

MARTINS, P.F., MELO, M.M.R., SARMENTO, P., SILVA, C.M. **Supercritical fluid extraction of sterols from *Eichhornia crassipes* biomass using pure and modified carbon dioxide. Enhancement of stigmasterol yield and extract concentration**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, 441-449, 2016.

MASON, J., PANIWYNYK, L., LORIMER, P. **The use of ultrasound in food technology**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 3, p. 253-260, 1996.

MASOUDI, S., RUSTAIYAN, A., MOHEBAT, R., MOSSLEMIN, M.H. **Composition of the essential oils and antibacterial activities of *Hymenocrater yazdianus*, *Stachys obtusicrena* and *Nepeta asterotricha*, three Labiatae herbs growing wild in Iran**. *Natural product communications*, v. 7, p. 117-120, 2012.

MAZZUTTI, S., FERREIRA, S.R.S., RIEHL, C.A.S., SMANIA JR, A., SMANIA, F.A., MARTÍNEZ, J. **Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: antioxidant and antimicrobial activities**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 70, p. 48-56, 2012.

MEDINA, I. **Determination of diffusion coefficients for supercritical fluids**. *Journal of Chromatography A*, v. 1250, p. 124-140, 2012.

MELO, M.M.R., SILVESTRE, A.J.D., SILVA, C.M. **Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a**

convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 115–176, 2014.

MENDIOLA, J.A., HERRERO, M., CIFUENTES, A., IBAÑEZ, E. **Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications.** *Journal of Chromatography A*, v. 1152, p. 234–246, 2007.

MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., 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.

MERFORT, I. **Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones.** *Journal of Chromatography A*, v. 967, p. 115–130, 2002.

MEZZOMO, N., MILEO, B.R., FRIEDRICH, M.T., MARTÍNEZ, J., FERREIRA, S.R.S. **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5622-5632, 2010.

MICHIELIN, E.M.Z., SALVADOR, A.A., RIEHL, C.A.S., SMÂNIA JR, A., SMÂNIA, E.F.A., FERREIRA, S.R.S. **Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6615–6623, 2009.

MIGUEL, M.G. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review.** *Molecules*, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MORI, C.L.S.O. **Análise das características da madeira e do óleo essencial de candeia *Eremanthus erythropappus*.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2008, 104 p. Tese (Doutorado).

MORI, C.L.S.O., BRITO, J.O., SCOLFORO, J.R.S., VIDAL, E.J., MENDES, L.M. **Influence of altitude, age and diameter on yield and alpha-bisabolol content of candeia trees (*Eremanthus erythropappus*).** *Cerne*, v. 15, p. 339-345, 2009.

MORI, C.L.S.O., MORI, F.A., MENDES, L.M. **Caracterização anatômica, química e física da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish).** *Cerne*, v. 16, p. 451-456, 2010.

MUSTAFA, A., TURNER, C. **Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 703, p. 8–18, 2011.

NAIK, S.N., LENTZ, H., MAHESHWARI, R.C. **Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 49, p. 115-126, 1989.

NASCIMENTO, A.M., BRANDÃO, G.B., OLIVEIRA, G.B., FORTES, I.C., CHARTONE-SOUZA, E. **Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus***. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 92, p. 95–100, 2007.

NELDER, J.A., MEAD, R. **A simplex method for function minimization**. *The Computer Journal*, v. 7, p. 308-313, 1965.

OLIVEIRA, A.D., ANDRADE, I.S., SCOLFORO, J.R., MELLO, J.M., ACERBI JR, F.W., CAMOLESI, J.F. **Market Chain Analysis of Candeia Timber (*Eremanthus erythropappus*)**. *Cerne*, v. 15, 257-264, 2009.

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

PALMA, M., PIÑEIRO, Z., BARROSO, C.G. **Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents**. *Journal of Chromatography A*, v. 921, p. 169-174, 2001.

PEDRO, A.S., DETONI, C., FERREIRA, D., CABRAL-ALBUQUERQUE, E., SARMENTO, B. **Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of (-)- α -bisabolol from particulate systems**. *Biomedical Chromatography*, v. 23, p. 966-972, 2009.

PENG, D., ROBINSON, D.B. **A new two-constant equation of state**. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 15, 59–64, 1976.

PERBELLINI, L., GOTTARDO, R., CAPRINI, A., BORTOLOTTI, F., MARIOTTO, S., TAGLIARO, F. **Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods**. *Journal of Chromatography B*, v. 812, p. 373–377, 2004.

PEREIRA, C.G., MEIRELES, M.A.A. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives**. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 340–372, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ-RUBIO, M.E., SERRANO, J., GOÑI, I., SAURA-CALIXTO, F. **Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results**. *Food Research International*, v. 41, p. 274-285, 2008.

PICÓ, Y. **Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 43, p. 84-99, 2013.

PINGRET, D., FABIANO-TIXIER, A. S., CHEMAT, F. **Ultrasound-assisted extraction**, in: ROSTAGNO, M.A., PRADO, J.M. (EDS.), **Natural Product**

Extraction: Principles and Applications, The Royal Society of Chemistry, UK, 2013, pp. 89– 112.

PIOCHON, M., LEGAULT, J., GAUTHIER, C., PICHETTE, A. **Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural α -bisabolol, β -D-fucopyranoside and analogues**. *Phytochemistry*, v, 70, p. 228–236, 2009.

PIOCHON-GAUTHIER, M., LEGAULT, J., SYLVESTRE, M., PICHETTE, A. **The essential oil of *Populus balsamifera* buds: its chemical composition and cytotoxic activity**. *Natural product communications*, v. 9, p. 257-260, 2014.

POURMORTAZAVI, S.M., HAJIMIRSADEGHI, S.S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis**. *Journal of Chromatography A*, v. 1163, p. 2–24, 2007.

PRIOR, R.L., WU, X., SHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PRONYK, C., MAZZA, G. **Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts**. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 215-226, 2009.

QUEIROZ, A., CAJAIBA, J. **A sustainable process for (-)- α -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 110, 39–46, 2016.

RAHMAN, K. **Studies on free radicals, antioxidants and co-factors**. *Clinical Interventions in Aging*, v. 2, p. 219-236, 2007.

RANJITHA, J., VIJYALAKSHMI, S. **Facile methods for the extraction of essential oil from the plant species - A review**. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 5, p. 1107-1115, 2014.

RAUT, J.S., KARUPPAYIL, S.M. **A status review on the medicinal properties of essential oils**. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250-264, 2014.

REÁTEGUI, J.L.P., MACHADO, A.P.F., BARBERO, G.F., REZENDE, C.A., MARTÍNEZ, J. **Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 94, p. 223-233, 2014.

REID, R. C., PRAUSNITZ, J. M., POLING, B. E. **The Properties of Gases & Liquids**. 5th ed., McGraw-Hill Professional, New York, 2001. 768p..

RESENDE, E.C., RAMOS, P.H., GUERREIRO, M.C., SAPAG, K. **Produção e caracterização de carvões ativados a partir de resíduos de candeia (*Eremanthus erythropappus*) e testes de adsorção de compostos orgânicos**. *Revista Colombiana de Química*, v. 39, p. 111-120, 2010.

- REVERCHON, E. **Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 10, p. 1-37, 1997.
- REVERCHON, E., DONSI, G., OSSEO, L.S. **Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 32, p. 2721–2726, 1993.
- REVERCHON, E., MARCO, I. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** *The Journal of Supercritical Fluids* v, 38, p. 146–166, 2006.
- REYES-JURADO, F., FRANCO-VEIGA, A., CORONA, N.R., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. **Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and their Modeling.** *Food Engineering Reviews*, v. 7, p. 275-297, 2014.
- RIBAS, M.C., MANTOVANI, D., AWADALLAK, J.A., CANEVESI, R.L., TAZINAFO, N.M., CARDOZO-FILHO, L., PALÚ, F., SILVA, E.A. **Study of candeia oil extraction using pressurized fluids and purification by adsorption process.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 177-182, 2014.
- RIBEIRO, A.O., SILVA, A. F., CASTRO, A.H.F. **Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.12, p.456-465, 2010.
- ROCHA, N.F.M., VENÂNCIO, E.T., MOURA, B.A., SILVA, M.I.G., NETO, M.R.A., RIOS, E.R.V., SOUZA, D.P., VASCONCELOS, S.M.M., FONTELES, M.M.F., SOUZA, F.C.F. **Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, p. 63-71, 2010.
- RODRIGUES, P.C.S., VEIGA, J.P.C., MALAVAZI, A.P. **Sustentabilidade em cadeias Produtivas: o caso da candeia.** VII congresso nacional de excelência em gestão, p. 1-17, 2011.
- RODRIGUES, V.H., MELO, M.M.R., PORTUGAL, I., SILVA, C.M. **Supercritical fluid extraction of *Eucalyptus globulus* leaves. Experimental and modelling studies of the influence of operating conditions and biomass pretreatment upon yields and kinetics.** *Separation and Purification Technology*, v. 191, p. 173–181, 2018.
- ROSA, P.T.V., MEIRELES, M.A.A. **Fundamentals of supercritical extraction from solid matrices.** In: Meireles, M.A.A. (ed) **Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Application.** CRC Press –Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2009, pp 272-288.
- ROSTAGNO, M.A., PRADO, J.M. **Natural product extraction: principles and applications.** Londres: Royal Society of Chemistry, 2013. 500p

RUCKENSTEIN, E., SHULGIN. I. **Entrainer effect in supercritical mixtures.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 180, p. 345–359, 2001.

SAHIN, S., SAMLI, R. **Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology.** *Ultrasonic Sonochemistry*, v.20, p. 595–602, 2013.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A.P., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A., HERRERO, M. **Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction.** *Comprehensive Analytical Chemistry*, v. 76, p. 27-51, 2017.

SANCHEZ-RANGEL, J.C., BENAVIDES, J., HEREDIA, J.B., CISNEROS-ZEVALLOS, L., JACOBO-VELAZQUEZ, D.A. **The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination.** *Analytical Methods*, v. 5, p. 5990–5999, 2013.

SANTOS, K.A., FROHLICH, P.C., HOSCHEID, J., TIUMAN, T.S., GONÇALVES, J.E., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, E.A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 323–330, 2017.

SANTOS, K.A., KLEIN, E.J., GAZIM, Z.C, GONÇALVES, J.E., CARDOZO-FILHO, L., CORAZZA, M.L., SILVA, E.A. **Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 114, p. 1–8, 2016.

SANTOS, R.C., MENDES, L.M., MORI, F.A., MENDES, R.F. **Aproveitamento de resíduos da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) para produção de painéis cimento-madeira.** *CERNE*, v.14, p.241-250, 2008.

SANTOS, R.C., MENDES, L.M., MENDES, R.F., MENDES, R.F. **Chapas de partículas aglomeradas produzidas a partir de resíduos gerados após a extração do óleo da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*).** *Scientia Forestalis*, v. 37, p. 437-446, 2009.

SANTOS, T.G., REBELO, R.A., DAMARCO, E.M., GUEDES, A., GASPER, A.L., CRUZ, A.B., SCHMIT, A.P., CRUZ, R.C.B., STEINDEL, M., NUNES, R.K. **Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC.** *Química Nova*, v. 35, p. 477–481, 2012.

SARAVANA, P.S., GETACHEW, A.T., AHMED, R., CHO, Y., LEE, Y., CHUN, B. **Optimization of phytochemicals production from the ginseng by-products using pressurized hot water: Experimental and dynamic modeling.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 113, p. 141-151, 2016.

SCHLESIER, K., HARWAT, M., BÖHM, V., BITSCH, R. **Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods.** *Free Radical Research*, v. 36, p. 177-187, 2002.

SCOLFORO, J.R.S., OLIVEIRA, A., DAVIDE, A.C. **O Manejo Sustentável da Candeia.** 1 Ed., Lavras. UFLA, 2012, 331 p.

SCOLFORO, J.R.S., PÉREZ, J.F.M., MELLO, J.M., OLIVEIRA, A.D., CAMOLESI, J.F., BORGES, L.F.R., ACERBI JÚNIOR, F.W. **Estimativas de volume, peso seco, peso de óleo e quantidade de moirões para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MachLeish).** *Cerne*, v. 10, p. 87-102, 2004.

SCOLFORO, J.R., CAMOLESI, J.F., OLIVEIRA, A.D., MELLO, J.M., ACERBI JR, F.W., SILVA, C.P.C., ANDRADE, I.S., MELLO, V.M., ABREU, E.C.R. **Volume, peso de matéria seca e produção de óleo para candeia (*Eremanthus erythropappus*) em Minas Gerais**, in: SCOLFORO, J.R., OLIVEIRA, A.D., ACERBI JR, F.W. **Inventário Florestal de Minas Gerais - Equações de Volume, Peso de Matéria Seca e Carbono para Diferentes Fisnomias da Flora Nativa.** Lavras, UFLA, Lavras, 2008, 216 p.

SERRA, A.T., SEABRA, I.J., BRAGA, M.E.M., BRONZE, M.R., SOUSA, H.C., DUARTE, C.M.M. **Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 55, p. 184-191, 2010.

SHALMASHI, A. **Ultrasound-assisted extraction of oil from tea seeds.** *Journal of Food Lipids*, v. 16, p. 465–474, 2009.

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. **Measurement of antioxidant activity.** *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 757–781, 2015.

SILLANPÄÄ, M., PHAM, T., SHRESTHA, R.A. **Ultrasound Technology in Green Chemistry**, Springer, 2011.

SILVA, A.C.O., SANTANA, E.F., SARAIVA, A.M., COUTINHO, F.N., CASTRO, R.H.A., PISCIOTTANO, M.N.C., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P. **Which approach is more effective in the selection of plants with antimicrobial activity?** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1–9, 2013.

SILVA, L.P., MARTÍNEZ, J. **Mathematical modeling of mass transfer in supercritical fluid extraction of oleoresin from red pepper.** *Journal of Food Engineering*, v. 133, p. 30–39, 2014.

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

SILVÉRIO, M.S., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., PINTO, M.A.O., ALVES, M.S., SOUZA, O.V. **Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae).** *Molecules*, v. 18, p. 9785-9796, 2013.

SIM, K.S., NURESTRI, A.M.S., NORHANOM, A.W. **Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts.** *Pharmacognosy Magazine*, v. 6, p. 248-254, 2010.

SINGH, P.P., CHANDRA, A., MAHDI, F., RAY, A., SHARMA, P. **Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease.** *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 25, p. 225–243, 2010

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** *American Journal Enology and Viticulture*, v 20, p. 144-158, 1965.

SMITH, J.M., VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica para Engenharia Química.** 7 ed. São Paulo: McGRAWHILL, 2007. 626p.

SØLTOFT, M., CHRISTENSEN, J.H., NIELSEN, J., KNUTHSEN, P. **Pressurized liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation.** *Talanta*, v. 80, p. 269-278, 2009.

SON, Y.J., KWON, M., RO, D.K. , KIM, S.U. **Enantioselective microbial synthesis of the indigenous natural product (-)- α -bisabolol by a sesquiterpene synthase from chamomile (*Matricaria recutita*).** *Biochemical Journal*, v. 463, p. 238-248, 2014.

SORIA, A.C., VILLAMIEL, M. **Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p.323-331, 2010.

ŠORM, F., ZAORAL, M., HEROUT, V. **On the composition of the oil of *Matricaria chamomilla* L. Collect.** *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 16, p. 626-638, 1951.

SOUZA, O.V., SILVÉRIO, M.S., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., MATHEUS, F.C., YAMAMOTO, C.H., ALVES, M.S. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, p. 771–777, 2008.

SOUZA, A.T., BENAZZI, T.L., GRINGS, M.B., CABRAL, V., SILVA, E.A., CARDOZO-FILHO, L., ANTUNES, O.A.C. **Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide.** *The Journal of Supercritical fluids*, v. 47, p. 182-187, 2008.

SOVOVÁ, H. **Broken-and-intact cell model for supercritical fluid extraction: Its origin and limits.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 129, p. 3-8, 2012.

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

SOVOVÁ, H. **Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—I. Modeling of extraction curves,** *Chemical Engineering Science*, v. 49, p. 409–414, 1994.

SPARKS, D., HERNANDEZ, R., ZAPPI, M., BLACKWELL, D., FLEMING, T. **Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 83, p. 885-891, 2006.

SPIEGEL, M. **Alpha-Bisabolol–Naturalness vs. Sustainability?.** *Soft Journal*, v. 138, p. 2-9, 2012.

SUN, R.C., TOMKINSON, J. **Comparative study of organic solvent and water-soluble lipophilic extractives from wheat straw I: yield and chemical composition.** *Journal of Wood Science*, v. 49, p. 47-52, 2003.

SVOBODA, K.P., GREENAWAY, R.I. **Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties.** *The International Journal of Aromatherapy*, v. 13, p. 196- 202, 2003.

ÖZKAL, S.G., YENER, M.E., BAYINDIRLI, L. **Mass transfer modeling of apricot kernel oil extraction with supercritical carbon dioxide.** *The Journal of Supercritical fluids*, v. 35, p. 119- 127, 2005.

TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O., DOMMES, J. **Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests.** *Food Chemistry*, v. 113, p. 1226-1233, 2009.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAN, C.S., LIOU, D.S. **Modeling of Desorption at Supercritical Conditions.** *American Institute of Chemical Engineering Journal*, v. 35, n. 6, p.1029, 1989.

TEIXEIRA, B., MARQUES, A., RAMOS, C., NENG, N.R., NOGUEIRA, J.M., SARAIVA, J.A., NUNES, M.L. **Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils.** *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 587-595, 2013.

TEKIN, K., AKALIN, M.K., ŞEKER, M.G. **Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design.** *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 954-960, 2015.

TENORIO, A.I.S., VARGAS, D., ESPINOSA, A., DIAZ, A., GUPTA, M.P. **Chemical composition of leaf essential oils of *Calypttranthes microphylla* B. Holts & ML, *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Krug & Urb from Panama.** *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, p. 29-33, 2011.

THAPPA, R., AGRAWAL, S.G. ***Cymbopogon flexuosus* oil a rich source of bisabolol.** *Journal of Essential Oil Research*, v. 1, p. 107-110, 1989.

TIAN, Y., XU, Z., ZHENG, B., MARTIN LO, Y. **Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 20, p. 202-208, 2013.

TIWARI, B.K. **Ultrasound: A clean, green extraction technology.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p.100–109, 2015.

TOMITA, K., MACHMUDAH, S., WAHYUDIONO, FUKUZATO, R., KANDA, H., QUITAIN, A.T., SASAKI, M., GOTO, M. **Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration.** *Separation and Purification Technology*, v. 125, p. 319–325, 2014.

TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S. **Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation.** *Journal of Food Science*, v. 79, p. 1231-1249, 2014.

TRENTINI, C.P., SILVA, S.B., RODRIGUES, G.M., GARCIA, V.A.S., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, C. **Pressurized Liquid Extraction of Macauba Pulp Oil.** *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 9999, p. 1-6, 2017.

TURNER, C., WALDEBÄCK, M. **Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries**, chapter 2, Elsevier, 2013, pp. 39–70.

VAN ZYL, R.L., SEATLHOL, S.T., VAN VUUREN, S.F., VILJOEN, A.M. **The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents.** *The Journal of essential oil research*, v. 18, p. 129-133, 2006.

VEIGA, J.P.C. **Sustainability or Greenwashing? Big demand for natural cosmetics and low enforcement threaten Brazil's candeia tree.** Yale Center for the Study of Globalization, 2013. Disponível em: <<http://yaleglobal.yale.edu/content/sustainability-or-greenwashing>> Acesso em: 19 de dezembro de 2015.

VELIČKOVIĆ, D.T., NIKOLOVA, M.T., IVANCHEVA, S.V., STOJANOVIĆ, J.B., VELJKOVIĆ, V.B. **Ultrasonic extraction of waste solid residues from *Salvia* sp. Essential oil hydrodistillation.** *Central European Journal of Chemistry*, v.8,p. 87-95, 2010.

- VIEIRA, F.A., FAJARDO, C.G., CARVALHO, D. **Floral biology of candeia (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae).** *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 32, p. 477-481, 2012.
- VIGANÓ, J., BRUMER, I.Z., BRAGA, P.A.C., SILVA, J.K., MARÓSTICA JÚNIOR, M.R., REYES, F.G.R., MARTÍNEZ, J. **Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 100, 382-390, 2016.
- VILA, R., SANTANA, A. I., PEREZ-ROSES, R., VALDERRAMA, A., CASTELLI, M. V., MENDONCA, S., ZACCHINO, S., GUPTA, M.P., CANIGUERAL, S. **Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of alpha-bisabolol.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2510-2514, 2010.
- VINATORU, M. **An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 303–313, 2001.
- VINATORU, M., MASON, T.J., CALINESCU, I. **Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 97, p. 159-178, 2017.
- VISENTAINER, J.V. **Aspectos Analíticos Da Resposta Do Detector De Ionização Em Chama Para Ésteres De Ácidos Graxos Em Biodiesel E Alimentos.** *Química Nova*, v. 35, p. 274-279, 2012.
- WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, second ed., Springer-Verlag, New York, 1996. 384 p.
- WALECZEK, K.J., CABRAL MARQUES, H.M., HEMPEL, B., SCHMIDT, P.C. **Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 55, p. 247–251, 2003.
- WANG, L. **Energy efficiency and management in food processing facilities.** New York, CRC Press, 2008, 443 p.
- WANG, L., WELLER, C. **Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 300–312, 2006.
- WIANOWSKA, D., DAWIDOWICZ, A.L. **Effect of Water Content in Extraction Mixture on the Pressurized Liquid Extraction Efficiency—Stability of Quercetin 4'-Glucoside During Extraction from Onions.** *Journal of AOAC International*, v. 99, p. 744-749, 2016.
- YANG, C.C., LEE, M.R., HSU, S.L., CHANG, C.M.J. **Supercritical fluids extraction of capillarisin from *Artemisia capillaris* and its inhibition of in vitro**

growth of hepatoma cells. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 42, p. 96-103, 2007.

YANG, L., CAO, Y.L., JIANG, J.G., LIN, Q.S., CHEN, J., ZHU, L. **Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. amara Engl.** *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 1349-1355, 2010.

ZAIBUNNISA, A.H., NORASHIKIN, S., MAMOT, S., OSMAN, H. **An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE).** *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 233-238, 2009.

ZHANG, Q.A., ZHANG, Z.Q., YUE, X.F., FAN, X.H., LI, T., CHEN, S.F. **Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder.** *Food Chemistry*, v. 116, p. 513–518, 2009.

ZHANG, Y., LI, S., WU, X. **Pressurized liquid extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata* Thunb.** *Separation and Purification Technology*, v. 58, p.305-310, 2008.

ZULKAFI, D., WANG, H., MIYASHITA, F., UTSUMI, N., TAMURA, K. **Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*) Zed.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 94, p. 123-129, 2014.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I - Determinação da densidade da mistura CO₂+cossolventes

A densidade do solvente nas extrações supercríticas CO₂ e adição dos cossolventes foi calculada pela equação de estado de Peng Robinson com regra de mistura quadrática de van der Waals (vdW2) (PENG & ROBINSON, 1976). A Equação é representada por:

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{a}{v(v + b) + b(v - b)} \quad 10.1$$

Em que P é a pressão absoluta do sistema; T é a temperatura absoluta; R é a constante universal dos gases e v é o volume molar. Os parâmetros a e b são obtidos da regra de mistura dada pelas Equações 10.2 e 10.3.

$$a = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j \sqrt{a_i a_j} (1 - k_{ij}) \quad 10.2$$

$$b = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_i x_j \left(\frac{b_i + b_j}{2} \right) (1 - l_{ij}) \quad 10.3$$

Onde: x_i é a fração molar das espécies i ; n é o número das diferentes espécies na mistura; k_{ij} and l_{ij} são os parâmetros de interação binária entre os componentes na mistura, $k_{ij} = k_{ji}$ and $l_{ij} = l_{ji}$; $k_{ii} = l_{ii} = 0$. Para o sistema CO₂+cossolvente, os parâmetros de interação binária são $k_{12}=0.0703$ e $l_{12}= -0.0262$, para o CO₂+etanol, e $k_{12}=-0.0373$ e $l_{12}= -0.0639$ para CO₂+acetato de etila (BORGES *et al.*, 2007). Os parâmetros dos components puros a_i and b_i são dados pelas Equações 10.4 e 10.5:

$$a_i = \frac{0.45724R^2T_{c_i}^2}{P_{c_i}} \left[1 + \left(0.37464 + 1.54226\omega_i - 0.26992\omega_i^2 \right) \left(1 - \sqrt{\frac{T}{T_{c_i}}} \right)^2 \right] \quad 10.4$$

$$b_i = 0.07779R \frac{T_{c_i}}{P_{c_i}} \quad 10.5$$

Em que: T_{c_i} , P_{c_i} and ω_i são, respectivamente, temperatura e pressão e fator acêntrico dos componentes da mistura. Estes dados para os componentes puros, CO₂, etanol e acetato de etila, são apresentados na Tabela 9.1.

Tabela 9.1 – Propriedades dos componentes puros

Componente	T_c (K)	P_c (bar)	ω	MW (g mol ⁻¹)
CO ₂	304,10	73,80	0,2390	44,010
Etanol	516,20	63,00	0,6350	46,069
Acetato de etila	523,20	38,30	0,3620	88,107

A partir do volume molar v e massa molar da mistura (MW_{mix}), calculou-se a densidade da mistura (ρ_{mix}), dada pela Equação 10.6:

$$\rho_{mix} = \frac{MW_{mix}}{v} \quad 10.6$$

9.2 ANEXO II - Artigos Publicados em Periódicos

Os artigos publicados que reportam o conteúdo desta tese foram:

SANTOS, K. A., KLEIN, E. J., GAZIM, Z. C, GONÇALVES, J. E., CARDOZO-FILHO, L., CORAZZA, M. L., SILVA, E. A. **Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 114, p. 1–8, 2016.

SANTOS, K. A., FROHLICH, P. C., HOSCHEID, J., TIUMAN, T. S., GONÇALVES, J. E., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, E. A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 323–330, 2017.