

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

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE UVAIA  
(*Eugenia pyriformis* Cambess.) UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO  
E EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

ELISSANDRO JAIR KLEIN

TOLEDO – PR – BRASIL

Fevereiro de 2016

ELISSANDRO JAIR KLEIN

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE UVAIA  
(*Eugenia pyriformis* Cambess.) UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO E  
EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Palú

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Melissa Gurgel Adeodato Vieira

TOLEDO – PR – BRASIL  
Fevereiro de 2016

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

K64o Klein, Elissandro Jair  
Obtenção de compostos bioativos de folhas de *uvaia* (*Eugenia pyriformis* Cambess.) utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e extração com solvente assistida por ultrassom / Elissandro Jair Klein. -- Toledo, PR : [s. n.], 2016.  
xiii ; 89 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Palú  
Coorientadora: Profa. Dra. Melissa Gurgel Adeodato Vieira  
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

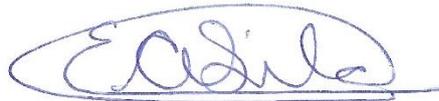
1. Engenharia química - Dissertações 2. *Eugenia pyriformis* Cambess (*Uvaia*) 3. Extração com fluido supercrítico 4. Extração por ultrassom 5. Extratos bioativos 6. Modelagem matemática 7. Plantas - Compostos bioativos I. Silva, Edson Antonio da, orient. II. Palú, Fernando, coorient. III. Vieira, Melissa Gurgel Adeodato, coorient. IV. T

CDD 20. ed. 660.284248

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 dissertação de Mestrado apresentada por Elissandro Jair Klein a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 04 de fevereiro de 2016.

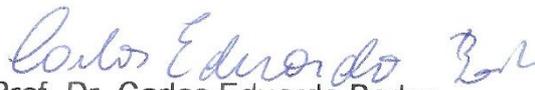
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Edson Antônio da Silva  
Orientador



Prof. Dr. Fernando Palú  
Coorientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba  
Membro



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Meuris Gurgel Carlos da Silva  
Membro

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo...

À minha família, em especial meus pais Vitor e Valesca, pela inspiração, apoio, incentivo e por tudo que me ensinaram. Aos meus irmãos, Marlon e Adriano, e a minha cunhada Dábila pela amizade e apoio, e aos sobrinhos Luis e Bianca pela alegria que proporcionam.

Aos amigos de longa data e aos mais recentes em especial à Bruna Schuh, Kátia Santos, Débora Boico, Patrícia de Souza, Ariádine Redner e Camila Neves, pela paciência e companheirismo.

Ao professor Dr. Edson Antonio da Silva, pela orientação, dedicação e confiança. Aos professores: Dr. Fernando Palú e Dra. Melissa Gurgel Adeodato Viera, pela orientação e apoio.

À CAPES pelo suporte financeiro.

E a todos que não foram citados mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Onde não falta vontade existe sempre um caminho.*

(J. R. R. Tolkien)

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda  
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.*

(Arthur Schopenhauer)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo Geral.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	2
1.2 JUSTIFICATIVA.....	2
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 UVAIA ( <i>EUGENIA PYRIFORMIS</i> CAMBESS.).....	4
2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	5
2.2.1 Extração Supercrítica.....	6
2.2.1.1 Dióxido de carbono supercrítico.....	8
2.2.2 Modelagem matemática do processo de extração supercrítica.....	8
2.2.2.1 Modelo de Naik.....	9
2.2.2.2 Modelo de Barton.....	10
2.2.3 Extração assistida por Ultrassom.....	10
2.3 EXTRATOS VEGETAIS.....	13
2.3.1 Terpenos.....	13
2.3.1.1 $\alpha$ -Amirina e $\beta$ -Amirina.....	14
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 MATERIAIS.....	17
3.2 PROCEDIMENTOS.....	18
3.2.1 Preparo da matriz vegetal para extração.....	18
3.2.2 Determinação da umidade do material vegetal.....	18
3.2.3 Extração com Fluido Supercrítico.....	19
3.2.3.1 Modelagem matemática das cinéticas de extração com fluido supercrítico.....	21
3.2.4 Extração assistida por ultrassom.....	23
3.2.5 Extração convencional por maceração.....	24
3.2.6 Composição química por CG-EM.....	25
3.2.7 Quantificação de $\alpha$ -Amirina e $\beta$ -Amirina por CLAE.....	25
3.2.8 Análises Estatísticas.....	26
3.2.9 Caracterização morfológica por MEV.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	28
4.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO.....	29
4.2.1 Rendimento global de extrato.....	30
4.2.2 Curvas cinéticas.....	34
4.2.3 Modelagem matemática da cinética de extração.....	40
4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	45
4.3.1 Cinética experimental da extração assistida por ultrassom.....	45
4.3.2 Rendimentos das extrações assistidas por ultrassom.....	47
4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DETERMINADA POR CG-EM.....	53
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE A-AMIRINA E B-AMIRINA POR CLAE.....	56

4.5.1	Quantificação de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos no planejamento experimental da extração com fluido supercrítico .....	58
4.5.2	Efeito do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos com fluido supercrítico .....	61
4.5.3	Avaliação da influência do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos por ultrassom.....	62
4.5.4	Avaliação das condições experimentais utilizadas no planejamento experimental da extração assistida por ultrassom.....	66
4.5.5	Avaliação da influência do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos por maceração.....	68
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO MATERIAL VEGETAL....	73
4.7	COMPARAÇÃO DOS MELHORES RESULTADOS OBTIDOS EM CADA MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	78
4.7.1	Comparação das cinéticas de extração .....	79
4.7.2	Comparação dos rendimentos.....	80
4.7.3	Comparação dos resultados dos teores de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos.....	81
5	CONCLUSÃO .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Ramo de uvaieira em frutificação e fruto de uvaia. ....	4
Figura 2.2 - Diagrama de fases ( $P_C$ - Pressão Crítica e $T_C$ – Temperatura Crítica).....	7
Figura 2.3 – Extração por cavitação.....	11
Figura 2.4 - Esquema do sistema de extração por ultrassom de sonda.....	12
Figura 2.5 - Estrutura química de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina. ....	14
Figura 3.1 - Folhas de uvaia após moagem e classificação. ....	18
Figura 3.2 - Esquematização do módulo de EFS. ....	20
Figura 4.1 - Aspecto físico dos extratos de Uvaia obtidos na EFS.....	29
Figura 4.2 – Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS. ....	32
Figura 4.3 – Superfície de resposta para o rendimento da EFS.....	33
Figura 4.4 - Curvas cinéticas das EFS das condições utilizadas no planejamento experimental.....	34
Figura 4.5 - Curva cinética da EFS na condição de 100 bar e 40 °C. ....	35
Figura 4.6 - Curva cinética da EFS na condição de 100 bar e 60 °C. ....	35
Figura 4.7 - Curva cinética da EFS na condição de 200 bar e 40 °C. ....	36
Figura 4.8 - Curva cinética da EFS na condição de 200 bar e 60 °C. ....	36
Figura 4.9 – Curvas cinéticas da triplicata do ponto central (150 bar e 50 °C).....	37
Figura 4.10 - Modificação na aparência do extrato obtido por EFS de acordo com o tempo de extração na condição de 150 bar e 50 °C, (a) 0-60 min, (b) 61-90 min e (c) 91-180 min. ....	37
Figura 4.11 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS com 60 min de extração - ampliação 50 X.....	38
Figura 4.12 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 61 e 90 min de extração - ampliação 50 X.....	39
Figura 4.13 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 91 e 180 min de extração - ampliação 50 X.....	39
Figura 4.14 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 61 e 90 min de extração - ampliação 200 X.....	40
Figura 4.15 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 100 bar e 40 °C.....	42
Figura 4.16 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 100 bar e 60 °C.....	42
Figura 4.17 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 150 bar e 50 °C.....	43
Figura 4.18 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 200 bar e 40 °C.....	43
Figura 4.19 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 200 bar e 60 °C.....	44
Figura 4.20 - Cinética de extração assistida por ultrassom.....	46
Figura 4.21 - Cinética de extração convencional por maceração.....	47
Figura 4.22 – Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU. ....	50
Figura 4.23 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Potência = 50%).	51
Figura 4.24 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Temperatura = 50 °C). ....	52
Figura 4.25 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Razão = 1:15). ...	52

Figura 4.26 - Cromatograma do extrato obtido na EFS com 150bar, 50 °C e 180 minutos de extração. ....	53
Figura 4.27 - Cromatograma do extrato obtido por EAU com 50% de potência, 50°C, razão massa solvente 1:15 e 3 minutos de extração. ....	54
Figura 4.28 - Cromatograma do extrato obtido por maceração com 100 RPM de agitação, 50 °C, razão massa/solvente 1:15 e 3 minutos de extração. ....	54
Figura 4.29 - Cromatograma dos padrões $\alpha$ e $\beta$ -amirina.....	57
Figura 4.30 - Curva de calibração de $\alpha$ -amirina. ....	57
Figura 4.31 - Curva de calibração de $\beta$ -amirina. ....	58
Figura 4.32 - Variação do teor $\alpha$ -amirina presente no extrato obtidos por EAU de acordo com o tempo.....	63
Figura 4.33 - Variação do teor de $\beta$ -amirina presente no extrato obtido por EAU de acordo com o tempo.....	63
Figura 4.34 - Alteração da aparência dos extratos obtidos por EAU em função do tempo de extração.....	64
Figura 4.35 - Massa de $\alpha$ -amirina extraídas por EAU em função do tempo.....	65
Figura 4.36 - Massa de $\beta$ -amirina extraídas por EAU em função do tempo.....	65
Figura 4.37 - Variação do teor de $\alpha$ -amirina presente no extrato obtido por maceração de acordo com o tempo. ....	70
Figura 4.38 - Variação do teor de $\beta$ -amirina presente no extrato obtido por maceração de acordo com o tempo. ....	70
Figura 4.39 - Alteração da aparência dos extratos obtidos por maceração em função do tempo de extração.....	71
Figura 4.40 - Massa de $\alpha$ -amirina extraídas por maceração em função do tempo. ..	72
Figura 4.41 - Massa de $\beta$ -amirina extraídas por maceração em função do tempo. ..	72
Figura 4.42 - Imagem obtida por MEV da face adaxial de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 200 X.....	74
Figura 4.43 - Imagem obtida por MEV da face abaxial de partículas de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 200 X.....	74
Figura 4.44 - Imagem obtida por MEV de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X.....	75
Figura 4.45 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 3000 X.....	76
Figura 4.46 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após a extração com CO <sub>2</sub> supercrítico – ampliação 3000 X.....	76
Figura 4.47 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 3 minutos de extração assistida por ultrassom– ampliação 3000 X.....	77
Figura 4.48 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 20 minutos de extração assistida por ultrassom – ampliação 3000 X.....	77
Figura 4.49 - Imagem obtida por MEV do extrato obtido com CO <sub>2</sub> supercrítico – ampliação 3000 X.....	78
Figura 4.50 - Comparação entre as cinéticas de extração dos métodos estudados .	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas .....	6
Tabela 3.1 - Planejamento experimental para EFS.....	19
Tabela 3.2 - Planejamento experimental para as EAU.....	23
Tabela 4.1 - Distribuição Granulométrica das folhas de Uvaia após secagem e moagem .....	28
Tabela 4.2 - Condições do operacionais das EFS e seus respectivos rendimentos .	30
Tabela 4.3 – Tabela de efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS .....	31
Tabela 4.4 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento da EFS .....	33
Tabela 4.5 - Parâmetros ajustáveis obtidos .....	41
Tabela 4.6 - Parâmetros de comparação dos modelos utilizados nas cinéticas de extração .....	44
Tabela 4.7 - Condições do planejamento experimental da EAU e seus respectivos rendimentos.....	48
Tabela 4.8 – Tabela de efeitos para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU .....	49
Tabela 4.9 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento da EAU.....	51
Tabela 4.10 - Composição química dos extratos obtidos nos diferentes métodos de extração .....	55
Tabela 4.11 - Teor de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) presentes no extrato supercrítico de uvaia (%) obtidos por EFS.....	58
Tabela 4.12 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos por EFS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) .....	60
Tabela 4.13 - Resultados de algumas quantificações de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) encontradas na literatura ( $\text{g kg}^{-1}$ ) .....	61
Tabela 4.14 - Teor de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) presentes no extrato supercrítico de uvaia obtido com 150 bar e 50 °C.....	61
Tabela 4.15 - Teor de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) presentes no extrato obtido por EAU .....	62
Tabela 4.16 - Massa de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos extratos obtidos na construção da cinética de EAU .....	66
Tabela 4.17 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) presentes no extrato obtidos com o uso do ultrassom (%) .....	67
Tabela 4.18 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos com o uso de ultrassom ( $\text{g kg}^{-1}$ ).....	68
Tabela 4.19 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) presentes no extrato obtido por maceração (%).....	69
Tabela 4.20 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$ e $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia ( $\text{g kg}^{-1}$ ) no extrato obtido por maceração .....	73
Tabela 4.21 - Comparação dos melhores rendimentos de cada método de extração .....	80
Tabela 4.22 - Comparação dos melhores resultados de pureza de cada método de extração (%).....	81
Tabela 4.23 - Comparação dos melhores resultados de massa de amirinas por massa de folhas para cada método de extração ( $\text{g kg}^{-1}$ ).....	82

## LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

EAU – Extração assistida por ultrassom

EFS – Extração com fluido supercrítico

g – Grama

g kg<sup>-1</sup> – Gramas por quilograma

kg – Quilograma

μL – Microlitro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

UV-VIS – Ultravioleta-visível

α – alfa

β – beta

# **OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FOLHAS DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.) UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO E EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

**AUTOR: ELISSANDRO JAIR KLEIN**

**ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 04 de fevereiro de 2016. 88 p.

## **RESUMO**

*Eugenia pyriformis* Cambess. (Uvaia), típica da Mata Atlântica pertence à família Myrtaceae, mesma família da pitanga, jabuticaba e outras plantas, atualmente estudadas devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e medicinais. O interesse por compostos bioativos obtidos de fontes naturais tem levado ao aumento no número de pesquisas que visam encontrar esses compostos em extratos de plantas. As extrações que utilizam os métodos convencionais geralmente apresentam inconvenientes, e uma alternativa interessante tem sido a utilização de tecnologias não convencionais de extração, como a extração utilizando fluidos supercríticos e a extração assistida por ultrassom. O presente trabalho tem como objetivo estudar métodos não convencionais de obtenção de extratos de uvaia visando obter-se extratos ricos em compostos bioativos. Foram avaliados fatores como influência do tipo de extração (fluido supercrítico e ultrassom) e das condições utilizadas no rendimento e na composição. Os resultados foram comparados com os obtidos utilizando a extração por maceração, um método convencional de extração. Após secagem e moagem das folhas de uvaia, o material vegetal foi submetido à extração com o solvente CO<sub>2</sub> supercrítico sob diferentes condições de temperatura (40, 50 e 60 °C) e de pressão (100, 150 e 200 bar), com vazão fixa de  $2,0 \times 10^{-3}$  kg min<sup>-1</sup>. Na extração assistida por ultrassom, foram avaliados os efeitos da temperatura (40, 50 e 60 °C), da potência (150, 250 e 350 W) e razão entre massa de folhas e volume de solvente (1:10, 1:15 e 1:20). Os extratos obtidos foram caracterizados quimicamente por CG-EM apresentando com principais compostos  $\beta$ -amirina (53,72 % para EFS e 71,25 % para EAU) e  $\alpha$ -amirina (24,63 % para EFS e

22,69 % para EAU). Na extração supercrítica, a pressão e a interação entre pressão e temperatura apresentaram efeitos estatisticamente significativos em relação ao rendimento, sendo que o melhor resultado foi encontrado com 200 bar e 60 °C, obtendo-se 1,69 %. Os dados obtidos na extração com fluido supercrítico foram utilizados para ajustar as curvas de extração simuladas utilizando dois modelos empíricos disponíveis na literatura. Os modelos testados ajustaram-se de forma satisfatória aos dados experimentais e a análise dos parâmetros estimados permitiu definir qual dos modelos melhor se ajustou à cinética de cada condição experimental. Para a extração assistida por ultrassom o melhor resultado de rendimento encontrado na determinação da cinética foi 1,81 % com 40 minutos, porém no planejamento experimental foi utilizado um tempo de extração de 3 minutos pois com esse tempo os extratos apresentavam melhores características, sendo portanto o melhor resultado obtido igual a 1,79 % na condição de 30 % de potência, 60 °C e razão massa/solvente de 1:20. A análise estatística do planejamento experimental da extração assistida por ultrassom indicou efeitos significativos das variáveis temperatura, razão massa/solvente e a interação entre potência e razão massa/solvente. Os melhores resultados de teor de amirina por massa de extrato foi encontrada para a extração supercrítica, com 97,43 %. A extração assistida por ultrassom apresentou a melhor quantidade de amirina por massa de folha, 12,13 g da mistura de isômeros por kg de folha seca.

**Palavras-chave:** Extração; Supercrítico; Ultrassom;  $\alpha$ -amirina;  $\beta$ -amirina.

# **OBTAINMENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.) LEAVES USING SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> AND ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION**

**AUTHOR: ELISSANDRO JAIR KLEIN**

**SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA**

Master Dissertation; Chemical Engineering Master Graduation Program; State University of West Paraná; Faculdade St., 645; z/c: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on February 04<sup>th</sup>, 2016. 88 p.

## **ABSTRACT**

*Eugenia pyriformis* Cambess. (Uvaia), typical of the Atlantic Forest belongs to the Myrtaceae family, the same family of cherry, jabuticaba and other plants, currently studied due to their antioxidant, antimicrobial and medicinal properties. The interest in bioactive compounds obtained from natural sources has led to an increase in researches aiming to find these compounds in plant extracts. The extractions using conventional methods generally have some drawbacks, and an interesting alternative has been the use of non-conventional extraction technologies, such as the supercritical fluid and the ultrasound-assisted extraction. This work aims to study unconventional methods of obtaining uvaia extracts in order to obtain extracts rich in bioactive compounds. Factors such as the influence of type of extraction (supercritical fluid and ultrasound) and the used conditions on the yield and composition were evaluated. The results were compared to those obtained using the extraction by maceration, a conventional extraction method. After drying and milling the uvaia leaves, the plant material was subjected to extraction with the supercritical CO<sub>2</sub> solvent under different conditions of temperature (40, 50 and 60 °C) and pressure (100, 150 and 200 bar), with a fixed flow of 2.0 kg min<sup>-1</sup>. In the ultrasound-assisted extraction, the effects of temperature (40, 50 and 60 °C), power (150, 250 and 350 W) and ratio between the mass of leaves and the volume of solvent (1:10, 1:15 and 1:20) were evaluated. The extracts obtained were chemically characterized by GC-MS giving  $\beta$ -amyrin (53.72 % for SFE and 71.25 % for UAE) and  $\alpha$ -amyrin (24.63 % for SFE and 22.69 % for UAE) as main compounds. In the supercritical extraction, the pressure and the interaction between pressure and temperature showed statistically significant effects on the yield, with the best result being

achieved at 200 bar and 60 °C, reaching 1.69%. The data obtained from the supercritical fluid extraction were used to adjust the extraction curves simulated by using two empirical models available in the literature. The tested models adjusted well to the experimental data and the analysis of the estimated parameters allowed to define which model best describes the kinetics of each experimental condition. For the ultrasound-assisted extraction, the best yield result found in the determination of the kinetics was 1.81% in 40 minutes, although in the experimental design a 3 minute time extraction was used due to the better characteristics showed by the extracts at this time. The best result obtained in experimental design with ultrasound was 1.79% provided 30% power, 60 °C and mas/solvent ratio 1:20. Statistical analysis of the experimental design of the ultrasound-assisted extraction indicated significant effects from the variables temperature, mass/solvent ratio and the interaction between power and mass/solvent ratio. The best results for amyirin content by extract weight was found for supercritical extraction, with 97.43%. The ultrasound-assisted extraction showed the best amyirin amount per mass of leaves, 12.13 g of the mixture of isomers per kg of dry leaf.

**Key words:** Extraction; Supercritical; Ultrasound;  $\alpha$ -amyirin;  $\beta$ -amyirin.

## 1 INTRODUÇÃO

Folhas e sementes de árvores frutíferas têm sido pesquisadas como fontes de alguns compostos bioativos ( CYBORAN *et al.*, 2014; KARABEGOVIĆ *et al.*, 2014; LUZIA; N., 2013; CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2011; SOONG; BARLOW, 2004), entretanto, existem poucos estudos relatando a obtenção de compostos bioativos de folhas e sementes de frutíferas tropicais e subtropicais do Brasil.

Uma dessas frutíferas é a *Eugenia pyriformis* (Uvaia), espécie arbórea subtropical e típica da região sul do Brasil, que pode ser utilizada em programas de reflorestamento e em áreas urbanas e seus frutos, considerados exóticos, possuem sabor adocicado e ácido (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

A uvaia pertence à família Myrtaceae, mesma família da pitanga, jabuticaba, e outras plantas, atualmente estudadas devido às suas propriedades antioxidantes (LUZIA; BERTANHA; JORGE, 2010; PERES *et al.*, 2013). São escassos os relatos encontrados na literatura relacionados à extração de compostos das folhas de uvaia.

As extrações convencionais, que utilizam solventes no ponto de ebulição por longos períodos de tempo (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011), geralmente causam a degradação térmica dos componentes dos extratos, diminuindo sua qualidade e muitas vezes restringindo sua aplicabilidade. Uma alternativa interessante tem sido a utilização de tecnologias não convencionais de extração, como a extração utilizando fluidos supercríticos, pois utiliza solventes em temperatura e pressão acima do ponto crítico, que no caso do CO<sub>2</sub> a temperatura crítica é 31,10 °C, muito menor do que as temperaturas geralmente empregadas em métodos convencionais de extração.

A extração assistida por ultrassom também surge como alternativa aos métodos convencionais de extração pois é considerada eficaz na extração de compostos bioativos e apresenta como vantagens menor consumo de reagentes e tempo de extração. Além disso, o fenômeno de cavitação causado pelo uso do ultrassom acelera a transferência de massa pois causa a desrupção da parede celular que facilita a liberação de compostos extraíveis (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar técnicas não convencionais de obtenção de extratos de folhas de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), sendo elas, extração supercrítica (com CO<sub>2</sub>) e extração assistida por ultrassom, com o intuito de se obter extratos ricos em compostos bioativos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da temperatura e da pressão sobre o rendimento da extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico;
- Avaliar o efeito da temperatura, potência e razão massa/solvente sobre o rendimento da extração assistida por ultrassom;
- Caracterizar quimicamente os extratos obtidos, utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) para determinar os compostos químicos presentes;
- Realizar a quantificação dos principais compostos presentes nos extratos utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE;
- Determinação experimental e modelagem matemática das cinéticas de extração com fluido supercrítico de folhas de Uvaia.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos têm aumentado consideravelmente o estudo e a busca por compostos bioativos em plantas de diversos países. Folhas, flores, frutas e semente de diversas plantas surgem como fontes potenciais desses compostos para diversas aplicações, entre elas, alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Os métodos de extração de compostos naturais de plantas mais utilizados na atualidade, muitas vezes são processos lentos, de alto consumo energético e

que fazem uso de solventes tóxicos e de difícil separação. Outro fator que deve ser observado é que nos processos convencionais, as extrações são realizadas em temperaturas elevadas, o que pode causar degradação de compostos importantes dos extratos.

Sendo assim, torna-se necessário o estudo de métodos não-convencionais para realizar a extração de compostos naturais com potencial utilização nos mais variados ramos industriais. Entre os processos não-convencionais estão a extração utilizando fluido supercrítico, que utiliza geralmente CO<sub>2</sub>, que não é tóxico e após a extração é separado com facilidade do extrato, e a extração assistida por ultrassom, que apesar de utilizar solventes, ocorre em um tempo consideravelmente menor que as extrações convencionais e pode ser realizada em temperaturas amenas, fatos que reduzem a degradação de compostos dos extratos e diminui o tempo de extração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 UVAIA (*Eugenia pyriformis* Cambess.)

A uvaia pertence à família Myrtaceae, que possui cerca de 3.500 espécies em diversos gêneros, distribuídas por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América e Austrália. Possui espécies de árvores cujos frutos são amplamente consumidos, como a jabuticaba (*Plinia cauliflora*), a goiaba (*Psidium guajava*) e a pitanga (*Eugenia uniflora*) (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009).

O nome uvaia tem origem do tupi *iwa 'ya* que significa fruto ácido (RASEIRA *et al.*, 2004), também é popularmente conhecida como uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha e uvalha-do-campo (ARMSTRONG; DO ROCIO DUARTE; MIGUEL, 2012). A planta (cujas sinonímias são *Pseudomyrcianthes pyriformis* (Camb.) Kaus. e *Eugenia uvalha* Camb.), ocorre naturalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estando presente ainda no nordeste argentino e no Paraguai (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

Espécie arbórea, com até 15 metros de altura, casca lisa, cinzento-amarelada e manchada de cor mais clara. Apresenta frutos de 2,0 a 2,4cm de comprimento, vilosos, piriformes, amarelos, suculentos e comestíveis (MATTOS, 1984). Na Figura 2.1, são apresentados um ramo em frutificação e um fruto cortado de forma a exibir suas sementes.



Figura 2.1 - Ramo de uvaieira em frutificação e fruto de uvaia.

O fruto apresenta potencial de uso econômico por ser suculento, levemente ácido, muito aromático, podendo ser utilizado na fabricação de sucos, sorvetes, doces e geleias (LISBÔA *et al.*, 2011). A uvaieira é uma planta de fácil cultivo, e com grande potencial econômico de exploração, por apresentar alta produtividade com baixo custo de implantação e manutenção (PEREIRA *et al.*, 2012).

Até o momento, poucos estudos foram realizados em relação à uvaia. O óleo essencial dos frutos de uvaia foi avaliado em relação à atividade antioxidante e microbiana, sendo que o fruto não demonstrou-se uma fonte apreciável de antioxidantes, mas teve atividade bacteriostática frente à diversas bactérias (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). Para as folhas, a caracterização química do óleo essencial obtido por hidrodestilação, os principais compostos relatados foram  $\alpha$ -cadinol (14,0%),  $\delta$ -cadinene (12,4 %), T-cadinol (11,9%), bicyclogermacrene (10,2 %) e  $\beta$ -caryophyllene (7,2 %) (APEL *et al.*, 2004).

Portanto, a uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) apresenta-se como promissora base de estudos em busca de novas fontes de compostos bioativos, por se tratar de uma planta nativa, amplamente distribuída geograficamente na região sul e de fácil cultivo, com escassos estudos sobre seu potencial como fonte de compostos bioativos.

## 2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração representa uma importante etapa na obtenção de compostos bioativos, sendo que a escolha do método de extração é muito importante para obter-se alto rendimento e pureza dos compostos de interesse (DANLAMI *et al.*, 2014).

Técnicas convencionais de extração como soxhlet, extração sólido-líquido e extração líquido-líquido utilizam grandes volumes de solventes e necessitam de grandes tempos de extração, além disso, muitas vezes apresentam baixo

rendimento de compostos bioativos e baixa seletividade (IBAÑEZ *et al.*, 2012; ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011 DAWIDOWICZ *et al.*, 2008;).

Sendo assim, nos últimos anos, surgiram novos métodos de extração que tentam contornar as desvantagens apresentadas pelos métodos convencionais e buscam encontrar melhores resultados. Alguns exemplos de novos métodos são: extração assistida por micro-ondas, extração com fluido pressurizado, extração com fluido supercrítico e extração assistida por ultrassom.

### 2.2.1 Extração Supercrítica

A extração supercrítica baseia-se no poder de solvatação de fluidos no estado supercrítico, ou seja, quando a pressão e a temperatura estão acima de seu ponto crítico (SHARIF *et al.*, 2014). Na Tabela 2.1 são apresentadas as condições do ponto crítico de alguns solventes, sendo possível observar que o CO<sub>2</sub> apresenta uma temperatura crítica baixa, o que o torna interessante para extrações com risco menor de degradação térmica.

Tabela 2.1 - Pontos críticos de solventes utilizados em extrações supercríticas

Solvente	Temperatura Crítica - T <sub>c</sub> (°C)	Pressão Crítica - P <sub>c</sub> (bar)
Etano	32,3	48,7
Água	374,3	221,2
Etileno	9,4	50,4
Propileno	91,9	46,0
Propano	96,8	42,5
CO <sub>2</sub>	31,1	73,8

Fonte: Adaptado de CAVALCANTI; MEIRELES, 2012

Acima do ponto crítico não é possível distinguir as fases líquida e gasosa. Nessas condições, o fluido não pode ser liquefeito aumentando a pressão isotermicamente ou diminuindo a temperatura isobáricamente (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001). Na Figura 2.2 é possível visualizar o ponto crítico de um fluido em seu diagrama de fases.

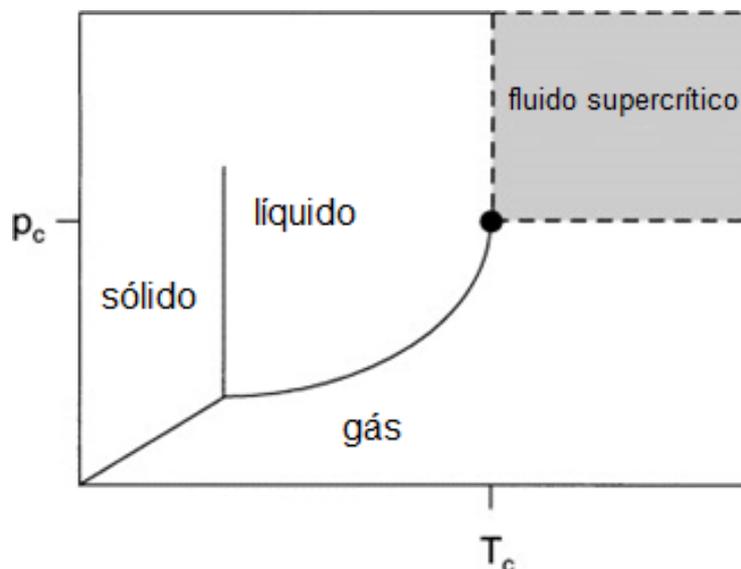


Figura 2.2 - Diagrama de fases ( $P_c$  - Pressão Crítica e  $T_c$  – Temperatura Crítica)  
 Fonte: Adaptado de KNEZ *et al.*, 2013.

Fluidos supercríticos possuem propriedades de gás como difusão e viscosidade, além de densidade e poder de solvatação semelhante ao de líquidos. Estas propriedades o tornam adequado para a extração de compostos em um curto período de tempo com maiores rendimentos (SIHVONEN *et al.*, 1999). No estado supercrítico, os solventes podem penetrar em materiais sólidos porosos e são constantemente forçados a passar pela amostra, possibilitando uma significativa, ou até mesmo completa extração (LANG; WAI, 2001).

Técnica de extração amplamente estudada para a obtenção de compostos bioativos a partir de ervas e outras plantas, por ser eficiente para materiais sólidos e apresentar responsabilidade ambiental (LANG; WAI, 2001). Dessa forma, a extração com fluido supercrítico representa uma área promissora, considerando-se o interesse em substituir os processos convencionais de extração com solvente ou por hidrodestilação (REVERCHON, 1997).

No estado supercrítico, o poder de solvatação dos fluidos pode ser manipulado por mudanças na pressão e/ou temperatura do processo, possibilitando uma alta seletividade dos compostos a serem extraídos (PYO; KIM, 2014; VIGANÓ *et al.*, 2016).

### 2.2.1.1 Dióxido de carbono supercrítico

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é amplamente utilizado como na extração com fluido supercrítico por apresentar baixas pressão e temperatura críticas, pela facilidade de remoção de solvente residual (pela redução de pressão) e pelo fato de não apresentar toxicidade e não ser inflamável (KO; WENG; CHIOU, 2002). Em relação à polaridade dos compostos extraídos, o CO<sub>2</sub> é eficiente na extração de compostos apolares, sendo que para extrair compostos polares, torna-se necessário a adição de solventes modificadores, como etanol por exemplo (SIHVONEN *et al.*, 1999).

Outra vantagem da extração utilizando o CO<sub>2</sub> supercrítico, é que o gás carbônico pode ser reciclado ou reutilizado, reduzindo os custos e diminuindo a geração de resíduos, sendo muito interessante para diversas aplicações industriais (KNEZ *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Modelagem matemática do processo de extração supercrítica

A modelagem matemática dos processos de extração com fluido supercrítico é muito importante pois envolve a análise das curvas de extração, sendo que a cinética e aspectos termodinâmicos estão relacionados com estudos de otimização, viabilidade econômica e aumento de escala (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014).

Os modelos matemáticos utilizados para descrever processos de extração podem ser classificados em empíricos, baseados em analogia entre transferência de calor e massa, e aqueles por balanço de massa diferencial (REVERCHON; MARCO, 2006).

Os modelos fenomenológicos para extração supercrítica de materiais vegetais descrevem matematicamente a cinética de extração a partir de equações que definem a concentração de soluto no extrator em função do tempo e de coordenadas espaciais. Esses modelos geralmente não são preditivos e alguns

parâmetros podem ser estimados a partir de correlações encontradas na literatura, mas ao menos um parâmetro precisa ser ajustado por dados experimentais (SOVOVÀ; STATEVA, 2011).

Nos modelos empíricos os resultados são descritos por expressões matemáticas simples, fornecendo soluções fáceis e rápidas. Diversos modelos empíricos podem ser encontrados na literatura, sendo que estes geralmente são construídos em função da concentração inicial de soluto na matriz e envolvem um parâmetro ajustável, não permitindo interpretação física do processo, entretanto fornecem ajustes confiáveis (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). As aproximações empíricas podem ser usadas quando faltam informações relacionadas ao mecanismo que rege o fenômeno de transferência de massa e de equilíbrio.

#### 2.2.2.1 Modelo de Naik

A equação do modelo empírico proposto por NAIK; LENTZ; MAHESHWARI (1989), é usada para descrever dados experimentais de cinéticas de extração supercrítica sem levar em conta a interação entre o soluto e a matriz sólida e representa o rendimento em função do tempo de extração nos termos de uma isoterma de adsorção de Langmuir.

$$y = \frac{y_0 t}{b+t} \quad (2.1)$$

Em que:

$y$  é a massa de soluto extraída (g extrato/g matriz vegetal) no tempo  $t$ ;

$y_0$  é a concentração inicial de soluto na matriz sólida (g extrato)

Os parâmetros ajustáveis do modelo são  $y_0$  (g extrato) e  $b$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

### 2.2.2.2 Modelo de Barton

O modelo desenvolvido por BARTON; HUGHES; HUSSEIN (1992), assume que a extração com fluido supercrítico de óleo resinas de baunilha segue um modelo de reação química de primeira ordem. Esse modelo utiliza uma constante cinética em vez de parâmetros de equilíbrio ou de transferência de massa (CHÁFER; BERNA, 2014). Nesse modelo, a taxa de extração é proporcional à concentração de extrato restante na partícula vegetal ( $c_s$ ), onde  $b$  é a taxa constante.

$$c_s = c_{s0}e^{-bt} \quad (2.2)$$

Baseado na condição inicial  $t = 0$ ,  $c_s = c_{s0}$ , a expressão a seguir (denominada como modelo de Barton) pode ser obtida por integração. Assim, o rendimento global da extração pode ser expresso como:

$$y = y_0(1 - e^{-bt}) \quad (2.3)$$

Em que:

$y$  é a massa de soluto extraída (g extrato/g matriz vegetal) no tempo  $t$ ;

$y_0$  é a concentração inicial de soluto na matriz sólida (g extrato)

Os parâmetros ajustáveis do modelo são  $y_0$  (g extrato) e  $b$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

### 2.2.3 Extração assistida por Ultrassom

Ultrassom é um tipo de onda sonora, inaudível pelo sistema auditivo humano, geralmente com frequências entre 20 kHz e 10 MHz. Essas ondas passam através do meio, criando compressão e expansão, gerando um processo

conhecido como cavitação, no qual bolhas são produzidas, crescem e sofrem colapso (AZMIR *et al.*, 2013).

Os mecanismos da extração assistida por ultrassom, são atribuídos aos efeitos térmicos, mecânicos e de cavitação, que resultam na ruptura das paredes celulares e redução do tamanho das partículas da matriz vegetal, facilitando a transferência de massa (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

No momento do colapso das bolhas, estima-se que a temperatura ultrapasse 4700 °C e a pressão ultrapasse 2000 bar, com o equipamento à temperatura ambiente. Quando essas bolhas colapsam próximo a superfície do sólido, a alta pressão e temperatura produzidas, geram microjatos direcionados para a superfície do sólido, possibilitando a extração dos compostos vegetais (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

A Figura 2.3 exemplifica as etapas do processo de extração por cavitação, sendo eles: geração de bolha próximo à superfície do sólido (a), ciclo de compressão e colapso (b), projeção do microjato em direção à superfície (b e c) e a destruição da parede celular da matriz vegetal, liberando o conteúdo (d).

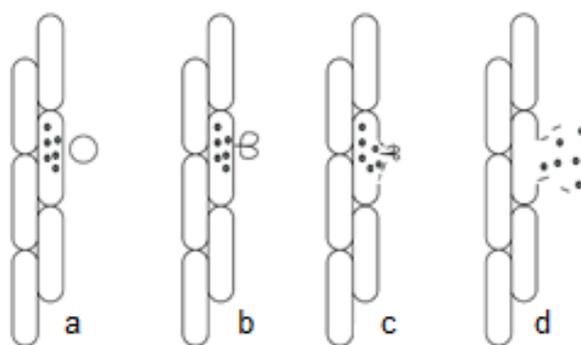


Figura 2.3 – Extração por cavitação  
Fonte: CHEMAT *et al.*, 2011.

Ultrassom é uma técnica com reconhecido potencial de aplicação industrial, principalmente para compostos bioativos (polifenóis, antocianinas, compostos aromáticos, polissacarídeos e compostos funcionais) de plantas (VILKHU *et al.*, 2008).

Dois tipos de equipamentos, que podem ser utilizados na extração por ultrassom, estão disponíveis comercialmente. Um deles, se trata de um banho

ultrassônico, que geralmente utiliza água como meio de propagação das ondas. O outro equipamento é constituído por um gerador de ultrassom, um transdutor e uma sonda de titânio, que fica imersa parcialmente no meio de extração (DANLAMI *et al.*, 2014). O equipamento que utiliza sonda, é esquematizado na Figura 2.4.

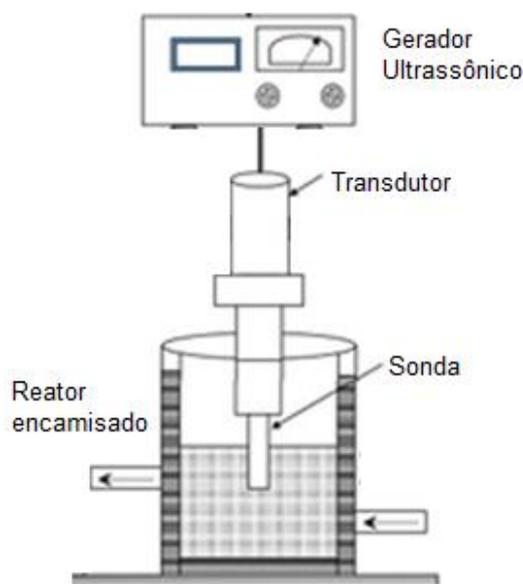


Figura 2.4 - Esquema do sistema de extração por ultrassom de sonda  
Fonte: Adaptado de DANLAMI *et al.*, 2014.

Estudos avaliam alguns fatores envolvidos na extração que podem ser responsáveis pelo aumento no rendimento de extrato, entre eles, solvente utilizado, tempo de extração e potência (DANLAMI *et al.*, 2014). Outros fatores também estão envolvidos na eficiência da extração, como tamanho de partícula da matriz vegetal, umidade da amostra e temperatura (AZMIR *et al.*, 2013). Shirsath *et al.* (2012) citam ainda que a razão entre massa de amostra e volume de solvente, além da polaridade do solvente influenciam na extração.

Normalmente as extrações são realizadas utilizando equipamentos com frequências próximas a 20 kHz, potências entre 100 e 800 Watts, tempo de extração entre 120 segundos e 1 hora, faixas de temperatura que variam entre 20 e 80 °C, sendo mais comum entre 30 e 40 °C. Os solventes podem ser escolhidos de acordo com o tipo de composto que pretende-se extrair, água extrai compostos

polares como carboidratos e aminoácidos e solventes apolares extraem compostos aromáticos por exemplo (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

## 2.3 EXTRATOS VEGETAIS

Nos últimos anos, surgiram diversos estudos voltados para o uso de produtos naturais nas mais diversas áreas, como medicina, pesticidas naturais, aditivos alimentares, fármacos, entre outros (LANG; WAI, 2001).

### 2.3.1 Terpenos

Terpenos são um dos grupos de compostos mais importantes do reino vegetal, pois formam um grande conjunto de metabólitos vegetais, responsáveis direta ou indiretamente, por diversos processos de interação entre plantas e o meio ambiente (PADOVAN *et al.*, 2013).

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono que possuem. Podem ser hemiterpenos (5 carbonos), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), triterpenos (30 C) e tetraterpenos (40 C), que são gerados a partir de diversas formas nas plantas, utilizando diferentes substratos e enzimas para sua biossíntese (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008).

Das classes citadas acima, pode-se destacar os triterpenos, por ser um dos maiores e mais diversificados grupos de produtos naturais de origem vegetal. Além disso, possuem uma ampla variedade de aplicações em diversos setores da indústria, como alimentícia, biotecnológica e de medicamentos (THIMMAPPA *et al.*, 2014). Nesta classe, além de diversos outros compostos, encontram-se os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. As amirinas, são geralmente encontradas em plantas medicinais e óleo-resinas de cascas de algumas espécies de árvores. Sendo que são estudadas *in vivo* e *in vitro*, devidos às suas propriedades químicas e farmacológicas (HERNANDEZ; PALAZON; NAVARRO-OCA, 2012).

### 2.3.1.1 $\alpha$ -Amirina e $\beta$ -Amirina

A  $\alpha$ -amirina (Urs-12-en-3 $\beta$ -ol) e a  $\beta$ -amirina (Olean-12-en-3 $\beta$ -ol) são compostas por 30 carbonos, tendo como fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ , apresentando ponto de fusão entre 184 e 186 °C para  $\alpha$ -amirina e entre 189 e 191 °C para a  $\beta$ -amirina (HERNNDEZ; PALAZON; NAVARRO-OCA, 2012).  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina são isômeros estruturais, tendo como esqueleto base diferentes subgrupos de triterpenóides pentacíclicos, sendo ursano a alfa e oleano a beta. A diferença na estrutura está na posição do grupo metil ou no C-19 ( $\alpha$ -amirina) ou C-20 ( $\beta$ -amirina) (HALDAR *et al.*, 2014). As estruturas químicas da  $\alpha$ -amirina e da  $\beta$ -amirina são apresentadas na Figura 2.5.

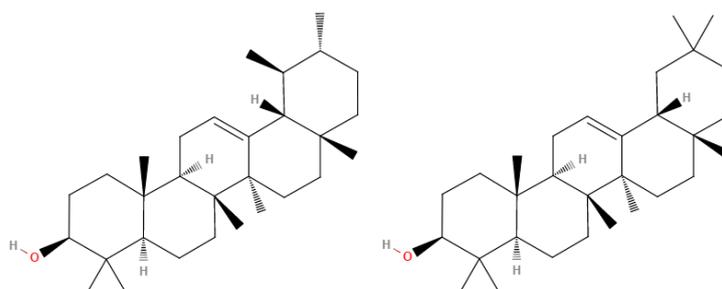


Figura 2.5 - Estrutura química de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.

Amirinas são encontradas em algumas plantas como *Hylocereus polyrhizus* (LUO *et al.*, 2014) *Moldenhawera nutans*, *Calotropis gigantea* (WAGH; GUJAR; GAIKAR, 2012), *Ouratea castaneifolia* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2009), *Sideriti candicans Ait* (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2004) e *Protium hepthaphyllum* (VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005). Podendo ser obtidas a partir de diversas partes das plantas, como cascas, folhas, madeira e resinas. Sendo necessário um pré-tratamento para isolar esses compostos, entre outros processos, pode-se destacar a secagem, extração com solventes variados (hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol), derivatização e separação por métodos cromatográficos (HERNNDEZ; PALAZON; NAVARRO-OCA, 2012).

Os triterpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina e seus derivados, estão sendo amplamente estudados nos últimos anos, com potencial para as mais variadas aplicações biológicas e farmacológicas, como:

- Citotóxica: derivados de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais humanas de leucemia promielocítica, sendo que esses compostos induziram morte dessa linhagem celular por apoptose (BARROS *et al.*, 2011).

- Gastroprotetiva:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina isoladas da resina de *Protium heptaphyllum* demonstraram potencial gastroprotetivo em ratos, ao reduzir os danos causados por etanol na mucosa estomacal (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

- Antidepressiva: A mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina isoladas a partir de resina de *Protium heptaphyllum*, apresenta efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos em ratos (ARAGÃO *et al.*, 2006).

- Inseticida:  $\beta$ -amirina isolada de extratos metanólicos de *Sarcostemma acidum* demonstrou atividade de regulação de crescimento e antialimentar de contra a lagarta do tabaco (*Spodoptera litura*), atuando no aumento da duração dos períodos larval e pupal, ocasionando a mortalidade (KANNAN *et al.*, 2013).

- Antinociceptiva:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina isoladas da resina de *Protium heptaphyllum* mostraram-se promissoras em atenuar a dor orofacial induzida em ratos Wistar, demonstrando potencial terapêutico para dores faciais e distúrbios dentários (HOLANDA PINTO *et al.*, 2008). Alguns derivados sintéticos de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina também demonstraram uma atividade antinociceptiva muito boa no modelo de dor induzida por ácido acético em camundongos, sendo que as doses necessárias para reduzir a dor não causaram alterações comportamentais nas cobaias (SOLDI *et al.*, 2008).

- Antihiperlipicêmico: derivados sintéticos de  $\alpha$ -amirina demonstraram capacidade de reduzir os níveis de glicose no sangue de ratos diabéticos (NARENDER *et al.*, 2009).

- Hipocolesterolêmico:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina reduziram os níveis de colesterol VLDL e LDL e elevaram os de HDL em ratos alimentados com um alto teor de gordura, possibilitando que a mistura seja estudada para o desenvolvimento de medicamentos para aterosclerose (SANTOS *et al.*, 2012).

- Antiprurigenoso:  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina reduziram significativamente a coceira induzida em ratos, demonstrando a possível utilização desses compostos no tratamento de prurido (coceira) associadas à dermatite atópica e dermatite de contato (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

- Antimicrobiana: derivados de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina mostraram significativa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, podendo possivelmente ser utilizados no desenvolvimento de tratamentos tópicos de candidíase oral (JOHANN *et al.*, 2007). Amirinas e alguns de seus derivados mostraram-se capazes de inibir o crescimento bacteriano cariogênico, sendo promissores na prevenção de cáries (DÍAZ-RUIZ *et al.*, 2012).

- Antiagregante plaquetário:  $\beta$ -amirina isolada a partir de extratos de *Ardisia elliptica*, foi seis vezes mais potente que o ácido acetilsalicílico na inibição da agregação plaquetária em sangue de coelhos (CHING *et al.*, 2010).

- Anti-inflamatória: a mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina apresenta potencial de interesse terapêutico para o tratamento de doença inflamatória intestinal, por ter apresentado resultados satisfatórios em testes de colite induzida em ratos (MATOS *et al.*, 2013).

## 2.4 Considerações sobre a revisão

A revisão da literatura apresenta a uvaia como uma espécie frutífera bastante comum na região sul do Brasil, mas pouco estudada em relação à composição e possíveis usos dos extratos obtidos de suas folhas, sendo que não foram encontrados estudos de extrações não convencionais (extração com fluido supercrítico e extração assistida por ultrassom).

A extração com fluido supercrítico é considerada uma tecnologia limpa por não utilizar solventes orgânicos, sendo que o fluido utilizado como solvente é separado somente pela despressurização do sistema e o gás pode ser reutilizado.

Dessa forma, o presente trabalho visa estudar os processos não convencionais de extração e caracterizar quimicamente os extratos obtidos, avaliando os efeitos das condições experimentais sobre o rendimento e composição química.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, as folhas de uvaia foram utilizadas para obtenção de extratos por métodos não convencionais, sendo eles, extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e extração assistida por ultrassom, sendo nesse caso utilizado hexano como solvente. Esses extratos foram caracterizados quimicamente, e os compostos majoritários  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina foram quantificados em todos os extratos. As metodologias utilizadas são descritas a seguir.

#### 3.1 MATERIAIS

As folhas de uvaia foram coletadas em uma propriedade particular, no município de Marechal Cândido Rondon - PR, identificadas pelo herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – HERBÁRIO UNOP, sob o número de registro UNOP 2614.

Os reagentes utilizados foram: Álcool etílico 99,5% (Anidrol), Alcool Isopropílico (BIOTEC); Hexano (NEON).

Na análise de Cromatografia Gasosa (CG) foram utilizados: Diclorometano (J. T. Baker) e Gás Hélio 99,9999% (White Martins).

Na análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -Amirina, foram utilizados os padrões analíticos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -Amirina (Sigma Aldrich) e os solventes Metanol (J.T.Baker) e Álcool Isopropílico (J.T.Baker), reagentes grau HPLC.

Utilizou-se dióxido de carbono de alta pureza >99,9% (Linde Gás) nas extrações supercríticas.

## 3.2 PROCEDIMENTOS

### 3.2.1 Preparo da matriz vegetal para extração

Para as extrações foram utilizadas folhas coletadas em pontos aleatórios das plantas. As folhas foram secas à sombra e temperatura ambiente ( $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por 7 dias. Após secas, as folhas foram moídas em liquidificador doméstico e as partículas resultantes classificadas por peneiramento, sendo utilizadas as peneiras 9, 14, 20, 28, 35 e 48 mesh. Cada classe granulométrica foi separada e as amostras armazenadas sob refrigeração a  $-15^\circ\text{C}$ . Para ilustrar, são mostradas imagens das matrizes na Figura 3.1.

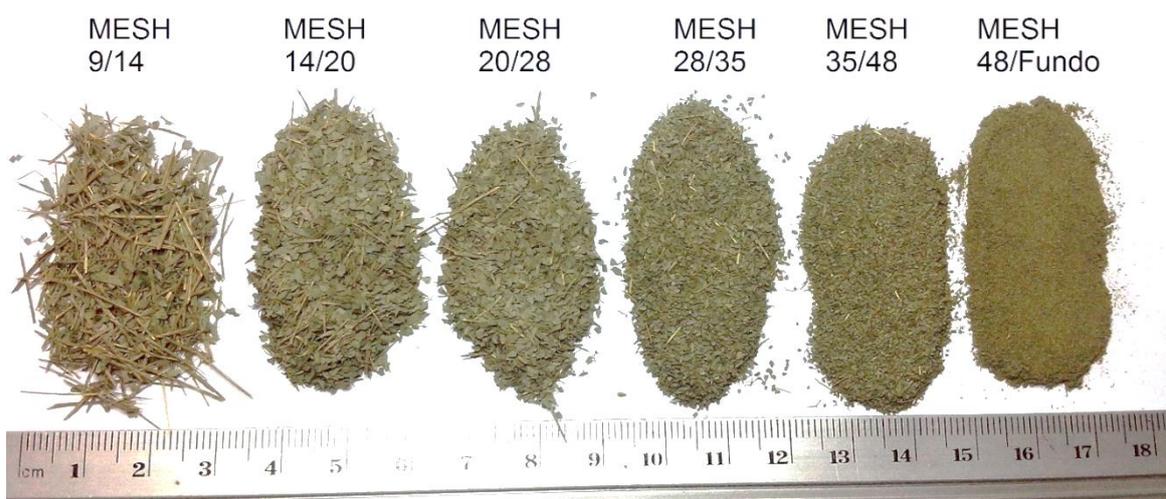


Figura 3.1 - Folhas de uvaia após moagem e classificação.

### 3.2.2 Determinação da umidade do material vegetal

Após secagem e moagem, a umidade foi determinada pelo método gravimétrico, sendo que aproximadamente 2 gramas de folhas de uvaia, pesadas em balança analítica (AUX220 – Shimadzu), foram acondicionadas em placa de petri devidamente tarada e levadas a estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  até massa constante. Após isso, foram retiradas da estufa e transferidas para dessecador contendo sílica gel para resfriamento até temperatura ambiente, sendo pesadas novamente. O

percentual de umidade foi obtido pela diferença entre a massa antes e após o procedimento. A análise foi realizada em triplicata.

### 3.2.3 Extração com Fluido Supercrítico

Os experimentos para obtenção dos extratos das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) utilizando dióxido de carbono supercrítico foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus Toledo*.

A fim de avaliar a influência das condições experimentais pressão e temperatura, foi realizado um planejamento experimental completo 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central, sendo as condições apresentadas na Tabela 3.1. As condições experimentais foram definidas a partir de limitações operacionais, mas de forma a garantir ampla variação entre os pontos.

Nesses experimentos utilizou-se amostras com partículas de 20/28 mesh pois se trata de um tamanho de partícula intermediário aos obtidos após moagem e apresentou maior proporção mássica em relação às demais frações, como pode ser observado na Seção 4.1.

Tabela 3.1 - Planejamento experimental para EFS

Pressão (bar)	Temperatura (°C)
100 (-1)	40 (-1)
150 (0)	50 (0)
200 (+1)	60 (+1)

Na condição referente ao ponto central do planejamento (150 bar e 50 °C), foram separadas frações de extratos no tempos de 0 - 60 minutos, 61 - 90 minutos e de 91 - 180 minutos, a fim de avaliar o efeito do tempo de extração sobre o rendimento e a quantidade de Amirinas.

Foi utilizado um módulo de extração supercrítica apresentado na Figura 3.2, composto por: (a) Cilindro de armazenamento de CO<sub>2</sub>, (b) Bomba Seringa modelo 500D (TELEDYNE ISCO); (c) banho termostático modelo FP-50 (Julabo), responsável pelo resfriamento do CO<sub>2</sub> bomba seringa; (d) banho termostático (MARCONI), responsável por aquecer o leito de extração; (e) termorregulador modelo MSC-04E (THOLZ), utilizado para manter a válvula micrométrica de expansão aquecida a 60 °C, evitando assim o congelamento; e (f) leito cilíndrico encamisado de aço inox.

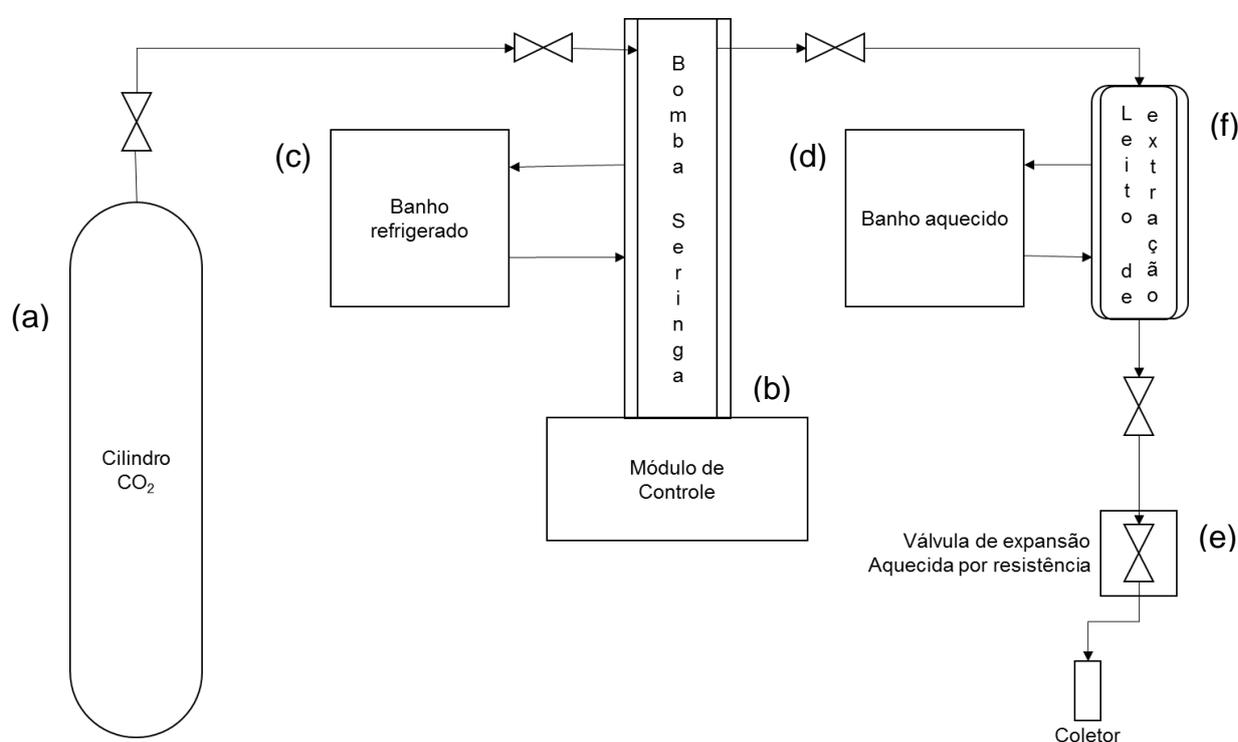


Figura 3.2 - Esquematização do módulo de EFS.

As dimensões da célula de extração, onde o leito empacotado é formado, são 1,91 cm de diâmetro interno e 16,8 cm de altura. A célula foi abastecida completamente com as amostras em todos os experimentos (aproximadamente 10 gramas).

Após o resfriamento do CO<sub>2</sub> na bomba seringa, o mesmo foi pressurizado até a condição escolhida para cada experimento, sendo em seguida bombeado para o leito de extração que já havia estabilizado na temperatura desejada.

Após a pressurização do leito com o CO<sub>2</sub>, aguardou-se 30 minutos para estabilização do sistema, para enfim iniciar-se a extração com a abertura da válvula de expansão. A vazão do fluido foi controlada a partir da válvula micrométrica (expansão), verificando-se os valores informados no visor do controlador da bomba seringa. Em todos os experimentos utilizou-se uma vazão mássica igual a  $2,0 \times 10^{-3} \text{ kg min}^{-1}$ .

Como na saída do extrator o CO<sub>2</sub> é submetido à pressão e temperatura ambiente, difunde-se para a atmosfera, separando-se do extrato que foi coletado em um recipiente de vidro âmbar, previamente pesado em balança analítica modelo AUX220 (Shimadzu). O frasco com o extrato foi pesado em balança analítica a cada 10 minutos, até 180 minutos. Com os valores medidos da massa de extrato acumulada no recipiente foram geradas as curvas da cinética de extração.

O rendimento da extração foi calculado utilizando-se da equação 3.1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que  $m_{\text{extrato}}$  representa a massa total de extrato obtida ao final da extração e  $m_{\text{amostra}}$  representa a massa de folhas utilizada na extração desconsiderando-se a umidade, a fim de obter uma relação entre a massa de extrato e a massa de folhas secas.

### 3.2.3.1 Modelagem matemática das cinéticas de extração com fluido supercrítico

Foram utilizados dois modelos matemáticos empíricos: Naik e Barton, apresentados na Seção 2.2.2 para descrever o fenômeno de extração com fluido supercrítico de folhas de Uvaia.

Os modelos foram adaptados para prever a existência de três estágios que ocorrem em série, isto é, a extração do segundo estágio começa somente quando

for esgotado a massa de extrato do primeiro estágio, de forma equivalente o terceiro estágio inicia somente após esgotar o extrato do segundo estágio.

Os parâmetros estimados de cada modelo são:  $y_0$  que refere-se à quantidade de extrato disponível em cada estágio, utilizado nos dois modelos. O outro parâmetro (b) refere-se à velocidade de extração, quanto maior o valor desse parâmetro, maior será a taxa de extração.

Os parâmetros foram ajustados com a seguinte função objetivo:

$$F = \sum_{j=1}^N (m_{ext_j}^{Calc} - m_{ext_j}^{Exp})^2 + F \quad (3.2)$$

Em que:

$m_{ext_j}^{Calc}$  é a massa de extrato obtida pelo modelo;

$m_{ext_j}^{Exp}$  é a massa de extrato obtida experimentalmente;

N o número de pontos da curva de cinética experimental.

Para que o modelo pudesse prever as três etapas de extração, as equações foram modificadas, sendo incluídas funções degraus (3.3) e (3.4),  $u_1$  e  $u_2$  são adimensionais.

$$u_1(t - t_1) = \begin{cases} 0, & t < t_1 \\ 1, & t \geq t_1 \end{cases} \quad (3.3)$$

$$u_2(t - t_2) = \begin{cases} 0, & t < t_1 \\ 1, & t \geq t_1 \end{cases} \quad (3.4)$$

Sendo assim, as equações modificadas para prever as três etapas assumem as seguintes formas:

Naik: 
$$y = \frac{y_1 \cdot b_1 \cdot t}{1 + b_1 \cdot t} + u_1(t - t_1) \cdot \frac{y_2 \cdot b_2 \cdot t}{1 + b_2 \cdot t} + u_2(t - t_2) \cdot \frac{y_3 \cdot b_3 \cdot t}{1 + b_3 \cdot t} \quad (3.5)$$

Barton: 
$$= y_1(1 - e^{-b_1 t}) + u_1(t - t_1) \cdot y_2(1 - e^{-b_2 t}) + u_2(t - t_2) \cdot y_3(1 - e^{-b_3 t}) \quad (3.6)$$

### 3.2.4 Extração assistida por ultrassom

Os experimentos para obtenção dos extratos das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) utilizando extração assistida por ultrassom foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus* Toledo.

Primeiramente foram realizadas extrações com diferentes tempos de duração a fim de se construir uma cinética de extração com base no rendimento, determinar o tempo no qual o processo entra em equilíbrio e avaliar o efeito do tempo de extração na composição dos extratos. Com base nessas informações foi possível indicar o tempo ideal para a realização das etapas seguintes.

Após a determinação desse tempo, foi realizado um planejamento experimental 2<sup>3</sup> com triplicata no ponto central, a fim de avaliar o efeito dos fatores sobre o rendimento de extrato e sobre a quantidade e pureza dos compostos de interesse. Os fatores avaliados no planejamento, bem como seus níveis e codificações, são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Planejamento experimental para as EAU

Potência (%)	Razão Massa/Solvente (g mL <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)
30 (-1)	1:10 (-1)	40 (-1)
50 (0)	1:15 (0)	50 (0)
70 (+1)	1:20 (+1)	60 (+1)

O equipamento utilizado foi um sonicador ultrassônico Eco-sonics (Ultroniq), com frequência de 20kHz, potência ultrassônica máxima de 500 Watts e micropona de titânio com 4 mm de diâmetro. As extrações foram realizadas em reator encamisado de 100 mL, utilizando-se 50 mL de solvente, sendo que as amostras foram colocadas em contato com o solvente e imediatamente foi iniciada a extração.

A temperatura durante o processo de extração foi controlada a partir da circulação de água, aquecida e bombeada por um banho termostático modelo MA-184 (MARCONI) no reator encamisado.

Após a extração, os extratos foram filtrados em papel filtro utilizando vácuo, concentrados em evaporador rotativo a 50 °C sob pressão reduzida e levados à estufa (50 °C) em frascos de vidro âmbar de 10 mL, para completa evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente, foi verificada a massa de extrato seco obtido para realizar o cálculo de rendimento.

### 3.2.5 Extração convencional por maceração

As extrações convencionais por maceração foram realizadas utilizando hexano como solvente, sendo que o material vegetal foi colocado em contato com o solvente (50 mL) em frascos fechados numa incubadora com agitação orbital e controle de temperatura (TECHNAL TE-421), mantidos sob agitação constante. Após a extração foi realizada filtração a vácuo e em seguida os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a 50 °C sob pressão reduzida e transferidos para estufa (50 °C) para evaporação. A evaporação transcorreu até massa residual constante, a qual foi utilizada para determinar o rendimento.

As extrações foram realizadas com razão massa de folha / volume de solvente de 1:15, temperatura de 50 °C, agitação de 100 RPM e com diferentes tempos de duração a fim de se construir uma cinética de extração com base no rendimento, determinar o tempo no qual o processo entra em equilíbrio e avaliar o efeito do tempo de extração na composição dos extratos.

### 3.2.6 Composição química por CG-EM

As análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu GC17A) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GSMS QP5050A). Usou-se coluna capilar DB-5MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) com dimensões (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel utilizada foi o gás hélio com 99,9999% de pureza, com vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . A amostra foi diluída em diclorometano.

O volume injetado foi de 2 $\mu\text{L}$ . A injeção foi realizada em modo Split 1:5, sendo a temperatura do injetor e do detector 280°C. A temperatura inicial do forno foi 40°C, mantendo durante 2 minutos, aqueceu-se até 70 °C com 3 °C  $\text{min}^{-1}$ , até 150 °C com 5 °C  $\text{min}^{-1}$  e por fim até 280 °C com 20 °C  $\text{min}^{-1}$ , mantendo-se nessa temperatura por 34 minutos, totalizando 60 minutos de análise.

Para a identificação de cada composto detectado, utilizou-se o banco de dados de espectros de massas NIST.

### 3.2.7 Quantificação de $\alpha$ -Amirina e $\beta$ -Amirina por CLAE

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram realizadas na Central Analítica do programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *Campus Toledo*.

Os extratos foram solubilizados e diluídos em Álcool Isopropílico a fim de se obter uma solução com 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Utilizou-se um cromatógrafo LC-20AT, acoplado ao detector SPD-20A UV-VIS, Shimadzu), equipado com uma coluna Phenomenex Kinetex C18 (4,6 mm x 250 mm) com partículas de 5  $\mu\text{m}$ . A análise foi realizada de acordo com HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ *et al.* (2010): bombeamento

isocrático, tendo como fase móvel o Metanol, com fluxo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>. O forno foi configurado para 25 °C e cada corrida cromatográfica durou 15 minutos.

As informações obtidas por CLAE possibilitam apresentar os resultados na forma de teor dos compostos presentes nos extratos e também relacionar a massa dos compostos obtido em função da massa de folhas utilizada na extração.

O teor de α-amirina e de β-amirina foi calculado utilizando-se da equação 3.2.

$$\text{Teor do composto (\%)} = \frac{m_{\text{composto}}}{m_{\text{extrato}}} \times 100 \quad (3.2)$$

Em que  $m_{\text{composto}}$  representa a massa de composto presente na solução analisada calculada pela curva padrão e  $m_{\text{extrato}}$  representa a massa de extrato utilizada no preparo da solução analisada. Com isso é possível estabelecer a proporção de cada composto quantificado.

### 3.2.8 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises de variâncias (ANOVA), para verificar quais fatores influenciam significativamente no rendimento das extrações. Foram realizadas também, análises de superfície de resposta, e determinação do modelo estatístico para a faixa utilizada das variáveis independentes. Utilizou-se o *software* Statistica<sup>®</sup> versão 7.0 (StatSoft, EUA).

### 3.2.9 Caracterização morfológica por MEV

O material vegetal foi caracterizado morfológicamente utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), antes e após as extrações com fluido supercrítico e das extrações assistidas por ultrassom nas condições de maior rendimento de extrato.

Também foram analisadas algumas amostras do extrato obtido na extração com fluido supercrítico a fim de caracterizar morfologicamente o pó obtido após o tempo total de extração e em diferentes tempos intermediários.

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LRAC/FEQ/UNICAMP).

As amostras foram preparadas realizando-se um recobrimento metálico com ouro utilizando-se o equipamento Sputter Coater EMITECH, Modelo: K450. Para obtenção das micrografias, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura modelo Leo 440i (LEO Electron Microscopy). Utilizou-se tensão de aceleração igual a 15 kV e corrente do feixe igual a 50 pA

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados da caracterização inicial das amostras, dos rendimentos dos dois métodos de extração, bem como as caracterizações químicas e quantificações de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. Também são apresentados os resultados das análises estatísticas para verificação das variáveis que influenciam no rendimento das extrações.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os resultados da análise de granulometria das folhas de uvaia depois de trituradas, são apresentados na Tabela 4.1. Sendo que a maior parte do material ficou retido na fração 20/28 mesh, apresentando diâmetro médio das partículas nessa fração de 0,725 mm.

Tabela 4.1 - Distribuição Granulométrica das folhas de Uvaia após secagem e moagem

<b>Mesh</b>	<b>Abertura das peneiras passagem/retenção (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Amostra retida (%)</b>
9/14	2,000 / 1,180	1,590	3,82
14/20	1,180 / 0,850	1,015	8,56
20/28	0,850 / 0,600	0,725	23,82
28/35	0,600 / 0,425	0,512	16,45
35/48	0,425 / 0,300	0,362	13,91
Fundo	-	<0,300	33,43

As amostras analisadas resultaram com umidade média de  $5,78 \pm 0,11$  (%). Verifica-se que a umidade das folhas é relativamente baixa, considerando-se que passaram por secagem à sombra e temperatura ambiente (que na época variava entre 25 e 30 °C) visando a preservação do material. A umidade do material é um parâmetro importante, visto que os resultados que levam em conta a massa de material vegetal são expressos em relação à massa seca de folhas.

## 4.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Neste tópico são apresentados os resultados experimentais das extrações de folhas de uvaia utilizando dióxido de carbono supercrítico. Demonstrando os efeitos dos fatores envolvidos na extração sobre as variáveis resposta rendimento de extrato, quantidade de amirinas por massa de extrato e quantidade de amirinas por massa de folhas.

Um fato importante a ser destacado é relativo às características físicas dos extratos obtidos. Em todas as condições analisadas o extrato apresentava-se na forma de pó com grânulos finos resinosos. A grande maioria dos extratos de CO<sub>2</sub> supercrítico encontram-se na forma líquida (óleos ou óleos resinosos), sendo classificados em óleos comestíveis ou óleos essenciais (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014). Na Figura 4.1 é apresentada a aparência do extrato de folhas de uvaia obtido por extração com fluido supercrítico.



Figura 4.1 - Aspecto físico dos extratos de Uvaia obtidos na EFS.

Mais informações relacionadas ao aspecto físico dos extratos são apresentadas no fim da seção 4.2.2, sendo que a semelhança com um pó pode ser causada pela grande quantidade de compostos químicos que são sólidos à temperatura ambiente. Todos os extratos obtidos com fluido supercrítico apresentaram tonalidade próxima ao amarelo.

#### 4.2.1 Rendimento global de extrato

As condições experimentais de temperatura e pressão, foram selecionadas levando em consideração as limitações operacionais do equipamento, mas de forma a garantir uma ampla variação dos parâmetros. A Tabela 4.2 apresenta os resultados, em termos de rendimento, das extrações nas condições determinadas pelo planejamento experimental. A vazão de CO<sub>2</sub> foi mantida constante ( $2,0 \times 10^{-3}$  kg min<sup>-1</sup>), o tempo de extração foi o mesmo para todos os experimentos (180 minutos). Os experimentos foram realizados de forma aleatória, para evitar resultados tendenciosos.

Tabela 4.2 - Condições do operacionais das EFS e seus respectivos rendimentos

Ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade CO <sub>2</sub> (kg m <sup>-3</sup> )	Rendimento (%) <sup>*</sup>	m extrato / m CO <sub>2</sub> (g kg <sup>-1</sup> )
1	100	40	629,90	0,24	0,07
2	100	60	289,72	0,08	0,02
3	200	40	840,67	1,28	0,35
4	200	60	724,11	1,69	0,45
5	150	50	700,28	0,87	0,23
6	150	50	700,28	0,90	0,25
7	150	50	700,28	0,92	0,25

Os rendimentos são expressos em base seca

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.2 observa-se que na pressão de 100 bar, o rendimento diminui de 0,24 para 0,08% com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C. Entre essas duas condições ocorre uma diminuição significativa na densidade do solvente (CO<sub>2</sub> supercrítico), que está relacionada com a solubilidade dos compostos no fluido supercrítico, sendo que em maiores densidades os compostos se tornam mais solúveis. Entretanto, acima de determinadas pressões outros fenômenos podem exercer efeitos mais intensos, como a pressão de vapor do soluto (SOLANA; RIZZA; BERTUCCO, 2014). Isso foi verificado nas extrações realizadas na pressão de 200 bar, o

rendimento aumentou de 1,28 para 1,69 % com o aumento da temperatura de 40 para 60 °C.

Em relação ao consumo de CO<sub>2</sub> por massa de extrato obtido, a condição de 200 bar e 60°C mostrou-se superior às demais condições por ser possível obter 0,45 gramas de extrato por quilo de CO<sub>2</sub> consumido.

Utilizando-se o programa computacional *Statistica 7* (STATSOFT), foram realizadas as análises estatísticas, visando determinar os efeitos das variáveis (temperatura e pressão) sobre o rendimento global da extração. Para isso, foram considerados modelos lineares com intervalo de confiança de 95%. Na Tabela 4.3 são apresentados os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração

Tabela 4.3 – Tabela de efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS

	<b>Efeito</b>	<b>p-valor*</b>
<b>Média/Intercepto</b>	0,854571	0,000042
<b>Pressão</b>	1,325000	0,000208
<b>Temperatura</b>	0,125000	0,130515
<b>PxT</b>	0,285000	0,018068

\*significância estatística p<0,05

Observa-se que o efeito da pressão é significativo e positivo, o que explica o aumento do rendimento quando são utilizadas pressões maiores, da mesma forma, a interação entre as duas variáveis é significativa e positiva, indicando efeito favorável, pois ao aumentar os dois fatores simultaneamente, ocorre um aumento no rendimento da extração. Na Figura 4.2 é apresentado o gráfico de Pareto que permite visualizar com clareza os efeitos das variáveis do planejamento sobre o rendimento global da extração supercrítica.

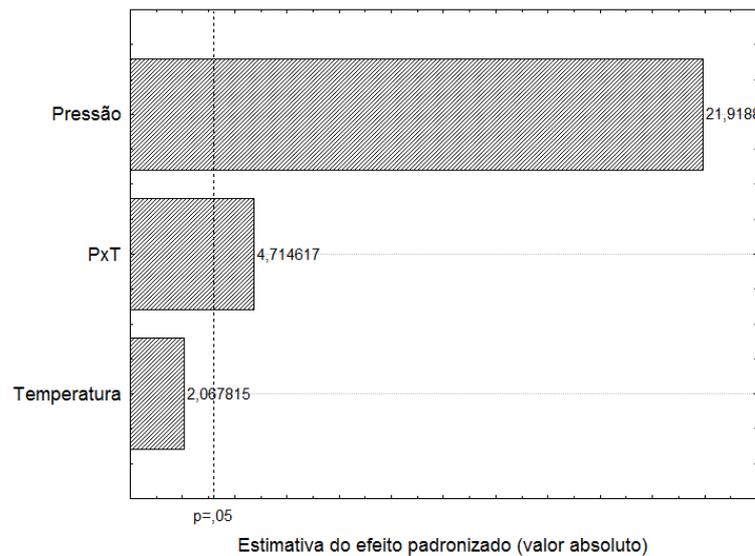


Figura 4.2 – Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da EFS.

O gráfico de Pareto (Figura 4.2) permite a confirmação da significância dos efeitos principais e suas interações. É possível confirmar os efeitos estatisticamente significativos das variáveis isoladas e de suas interações localizados à direita da linha tracejada, que indica ponto de significância dos resultados ( $p \leq 0,05$ ).

Observa-se que o efeito da pressão foi o mais importante para o rendimento das extrações com fluido supercrítico. A influência desse parâmetro foi positiva, significando que, o aumento quantitativo dessa variável implica no aumento do rendimento da extração, ou seja, quanto maior a pressão utilizada durante a extração, maior deve ser o rendimento.

A validação do modelo foi realizada pelo teste “F”, obtido a partir da análise de variância (ANOVA). Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos a partir da ANOVA, observando-se que o  $F_{\text{calc}}$  é muito maior do que o  $F_{\text{tab}}$ , o modelo é válido no nível de significância de 5% e representa muito bem os resultados experimentais obtidos, dentro da faixa estabelecida nos níveis para as variáveis em estudo para a resposta rendimento. O modelo obtido pela regressão linear é apresentado na Equação 4.1, sendo que ele explica 99,41% das variações entre os valores experimentais e os previstos, indicando ótima concordância.

Tabela 4.4 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento da EFS

Causas de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub> *
Modelo	1,8524	3	0,6175	166,8919	9,2766
Resíduos	0,0110	3	0,0037		
Total	1,8634	6			

R<sup>2</sup>: 0,99412    R<sup>2</sup><sub>adj</sub>: 0,98823    \*F<sub>tab</sub>(3;3;0,05)

$$\text{Rendimento (\%)} = 0,692 - 0,001P - 0,0365T + 0,000285PT \quad (4.1)$$

A Figura 4.3 apresenta a superfície de resposta para o rendimento da extração com fluido supercrítico, a partir da variação da pressão e temperatura. Pode-se observar que a região com melhores resultados está localizada nas condições de maior pressão e temperatura.

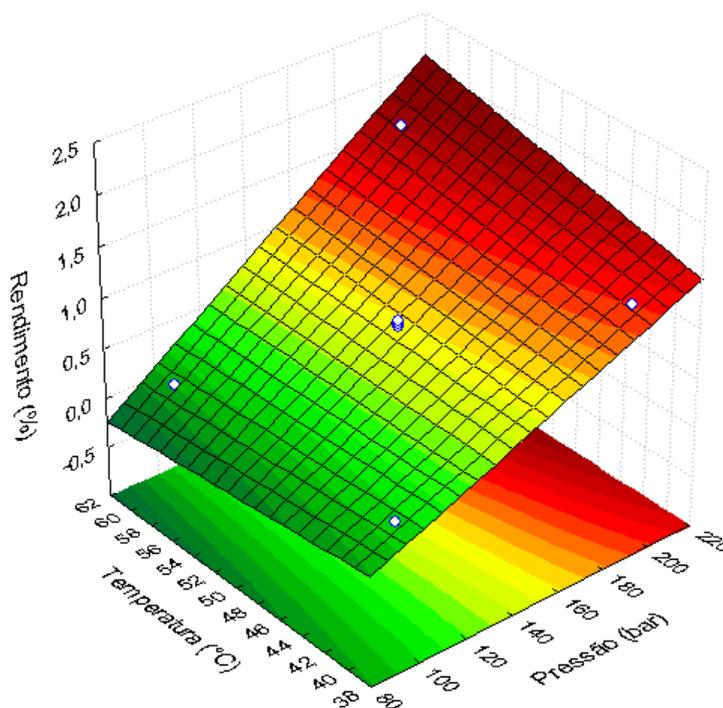


Figura 4.3 – Superfície de resposta para o rendimento da EFS.

Pode-se observar na superfície de resposta que para os níveis das variáveis estudados, os maiores rendimentos são obtidos na região de maior

pressão e temperatura, sendo que o experimento realizado na condição de maior pressão e temperatura (200 bar e 60 °C) apresentou o maior rendimento (1,69 %).

#### 4.2.2 Curvas cinéticas

As curvas cinéticas do processo de extração com fluido supercrítico, obtidas a partir da pesagem periódica do extrato acumulado, são apresentadas na Figura 4.4, entretanto, para melhor compreensão do comportamento de cada extração as Figura 4.5 a Figura 4.8 apresentam as cinéticas individuais de cada condição de extração. Em todas as condições, observa-se que a variação da massa acumulada é muito pequena quando a extração aproxima-se do tempo final de extração, o que pode indicar o esgotamento do extrato disponível para extração.

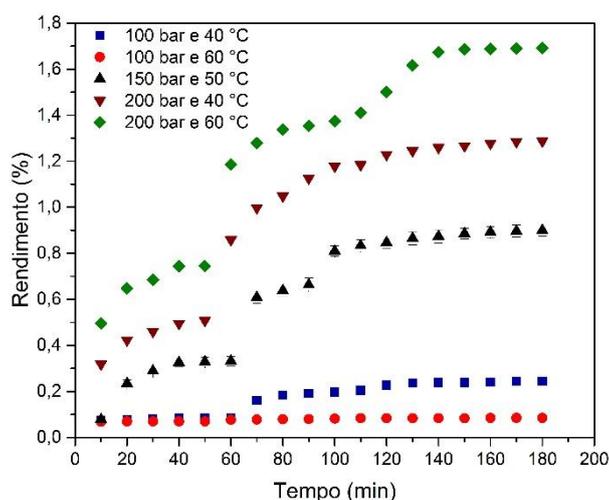


Figura 4.4 - Curvas cinéticas das EFS das condições utilizadas no planejamento experimental

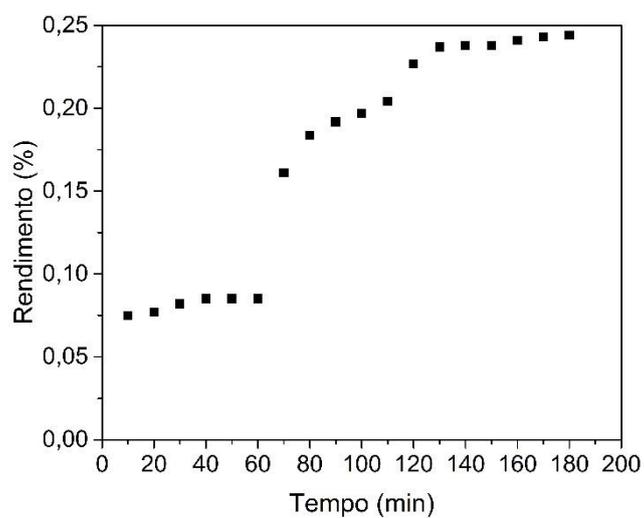


Figura 4.5 - Curva cinética da EFS na condição de 100 bar e 40 °C.

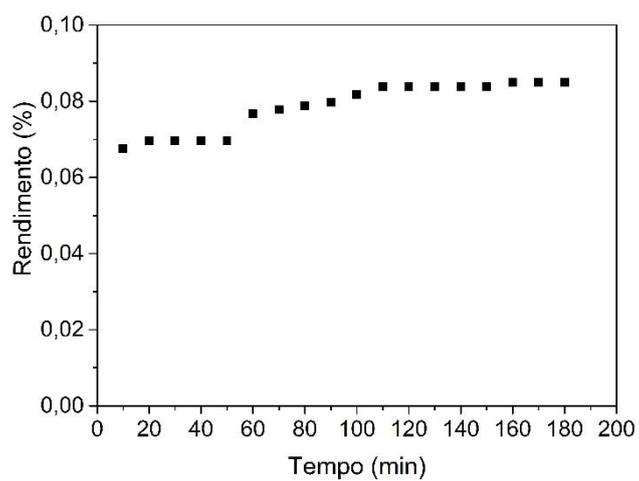


Figura 4.6 - Curva cinética da EFS na condição de 100 bar e 60 °C.

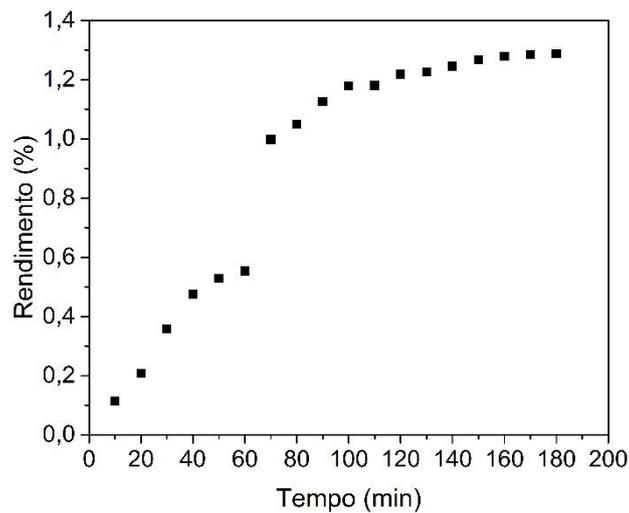


Figura 4.7 - Curva cinética da EFS na condição de 200 bar e 40 °C.

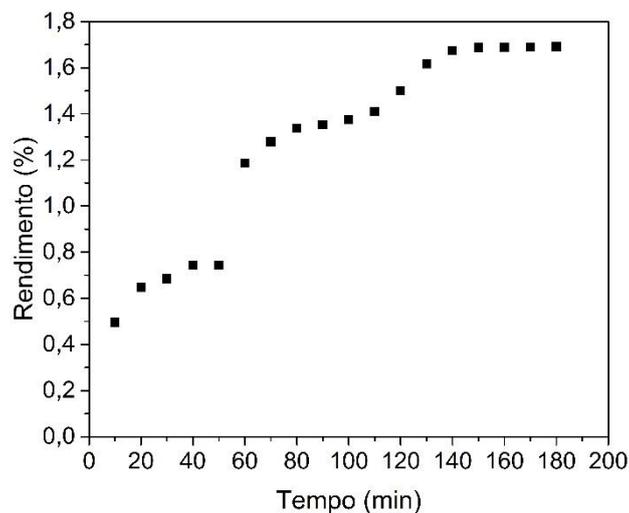


Figura 4.8 - Curva cinética da EFS na condição de 200 bar e 60 °C.

Na Figura 4.9 é apresentada a curva cinética com a média das três replicatas realizadas nas condições do ponto central do planejamento experimental, juntamente com as barras de desvio padrão. Observa-se que os pontos apresentam desvio padrão pequeno, indicando que as curvas cinéticas foram similares e com boa reprodutibilidade do processo de extração no módulo experimental utilizado.

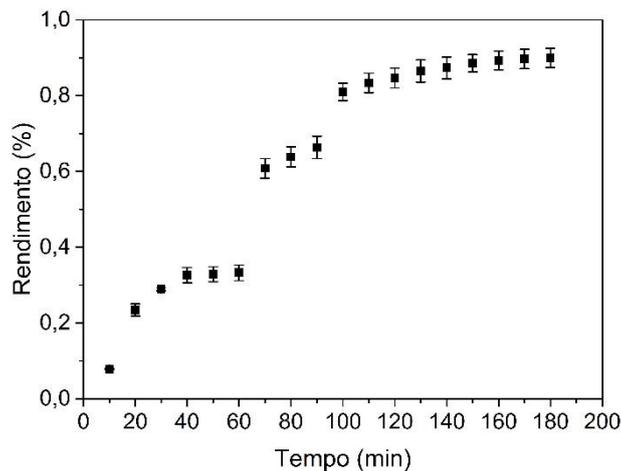


Figura 4.9 – Curvas cinéticas da triplicata do ponto central (150 bar e 50 °C).

Nas curvas cinéticas é possível observar a presença de três estágios distintos durante a extração, o primeiro entre o início da extração e 60 minutos, outro de 70 minutos até próximo de 100 e 110 minutos e um estágio final iniciando em aproximadamente 110 e 120 minutos até o fim da extração em 180 minutos. O comportamento apresentado nas cinéticas de extração das folhas de uvaia com CO<sub>2</sub> supercrítico, é incomum, sendo que não foram encontrados relatos na literatura de casos semelhantes. A Figura 4.10 apresenta as fotos dos extratos obtidos em cada um dos estágios da extração realizada com 150 bar e 50 °C.

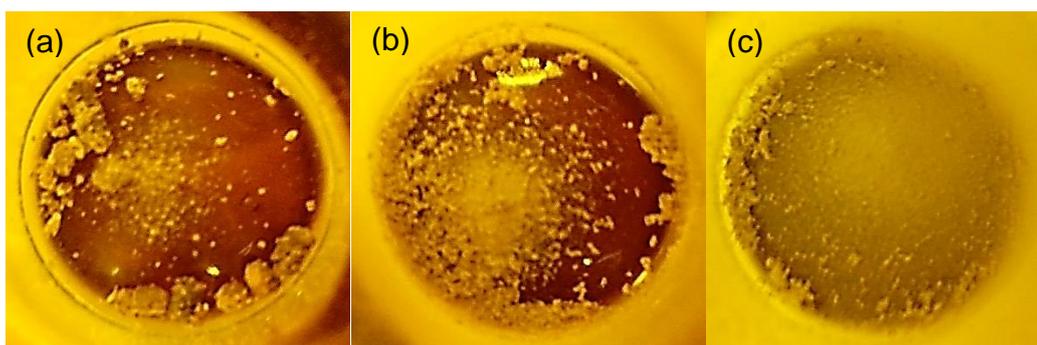


Figura 4.10 - Modificação na aparência do extrato obtido por EFS de acordo com o tempo de extração na condição de 150 bar e 50 °C, (a) 0-60 min, (b) 61-90 min e (c) 91-180 min.

A primeira imagem apresenta o extrato obtido na condição de 150 bar e 50 °C com tempo de extração de 60 minutos, a segunda imagem apresenta o

extrato obtido entre 61 e 90 minutos, já a última imagem diz respeito ao extrato obtido entre 91 e 180 minutos. Aparentemente, ocorre a diminuição do diâmetro das partículas do extrato entre um estágio e o estágio seguinte, fato esse que foi observado em todas as condições analisadas. Para melhor compreender esse fenômeno foram realizadas análises de microscopia óptica (MO) para avaliar as características morfológicas dos extratos. As Figura 4.11, Figura 4.12 e Figura 4.13 apresentam imagens obtidas por microscopia óptica dos extratos isolados de cada período de extração obtidos no ponto central do planejamento experimental (150 bar e 50 °C).

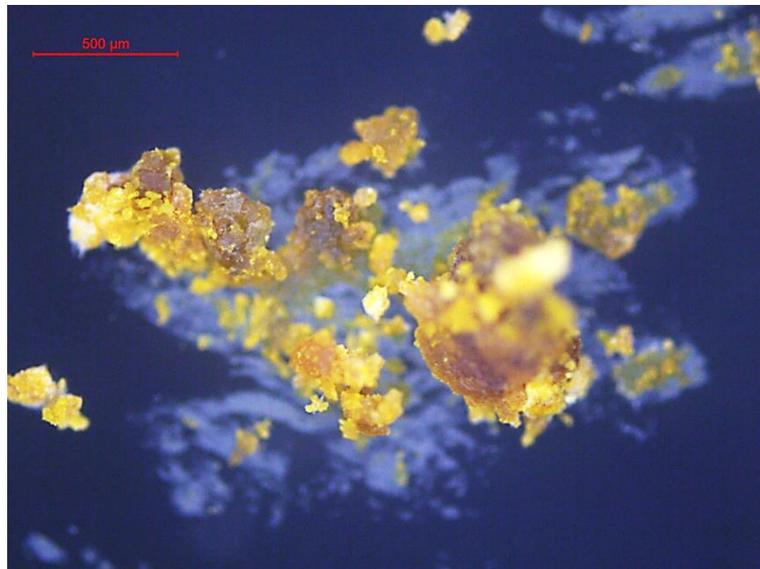


Figura 4.11 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS com 60 min de extração - ampliação 50 X

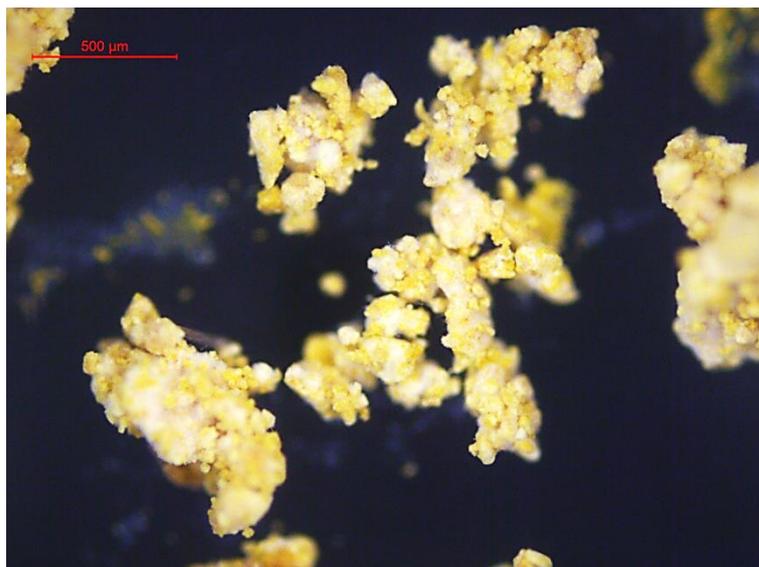


Figura 4.12 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 61 e 90 min de extração - ampliação 50 X

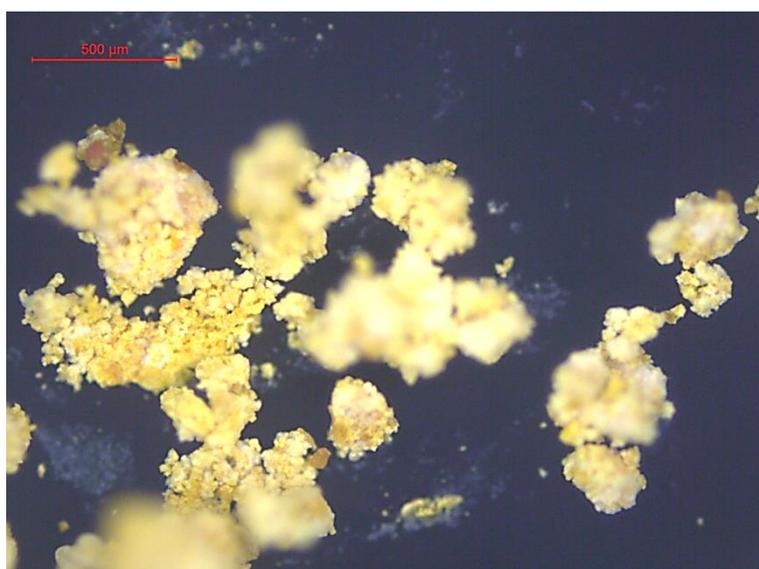


Figura 4.13 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 91 e 180 min de extração - ampliação 50 X

É possível observar alterações nas características visuais dos extratos obtidos em cada período de extração, sendo que no período até 60 minutos, o extrato apresenta-se como grânulos resinosos, entretanto, nos extratos obtidos de 61 a 90 minutos e 91 a 180 minutos observa-se a diminuição do tamanho dos grânulos e aumento da presença de estruturas cristalinas. No extrato obtido entre

91 e 180 minutos observa-se ainda, que os grânulos são formados pela aglomeração de partículas finas.

As estruturas cristalinas citadas anteriormente podem ser observadas na Figura 4.14 que apresenta o extrato obtido entre 61 e 90 minutos com ampliação de 200 X.



Figura 4.14 - Imagem de MO do extrato obtido por EFS entre 61 e 90 min de extração - ampliação 200 X

Também foram feitas análises por cromatografia líquida de alta eficiência dos compostos majoritários em cada estágio para o extrato obtido na condição de 150 bar e 50 °C. Os resultados dessas análises serão apresentados na seção 4.5.2, juntamente com os demais resultados de quantificação dos compostos majoritários.

#### 4.2.3 Modelagem matemática da cinética de extração

Por meio do ajuste das curvas de extração com os modelos empíricos descritos na Seção 2.2.2 foi gerado o conjunto de parâmetros ajustáveis mostrados na Tabela 4.5. Para cada condição experimental são gerados três valores para cada parâmetro, referentes aos três estágios em que as curvas

cinéticas de extração estão divididas, visto que os modelos foram alterados para levar em consideração essas três etapas, mostradas nas Figura 4.15 a Figura 4.19.

Tabela 4.5 - Parâmetros ajustáveis obtidos

Condição experimental	Modelo			
	Naik		Barton	
	$y_0$	$b$	$y_0$	$B$
100 bar 40 °C	0,08776	0,51585	0,08188	0,23498
	0,13158	0,15059	0,11278	0,11720
	0,03459	0,19978	268,78268	$2,1985 \times 10^{-6}$
100 bar 60 °C	0,07039	2,56462	0,06959	0,35237
	0,00931	1,01910	98,55327	$2,3138 \times 10^{-6}$
	0,00520	0,47456	-585,0977	$3,4015 \times 10^{-7}$
200 bar 40 °C	0,59818	0,11531	0,502443	0,09557
	0,77728	0,07310	0,69999	0,05928
	0,03238	0,01439	173,95236	$6,523 \times 10^{-6}$
200 bar 60 °C	0,87783	0,13153	0,73975	0,10710
	0,55649	1,80261	0,67445	0,08701
	0,38536	0,06428	0,27916	0,09971
150 bar 50 °C	0,64552	0,02391	0,38152	0,04142
	0,22990	0,85910	0,51236	0,04004
	0,15532	0,53132	0,00510	3,07948

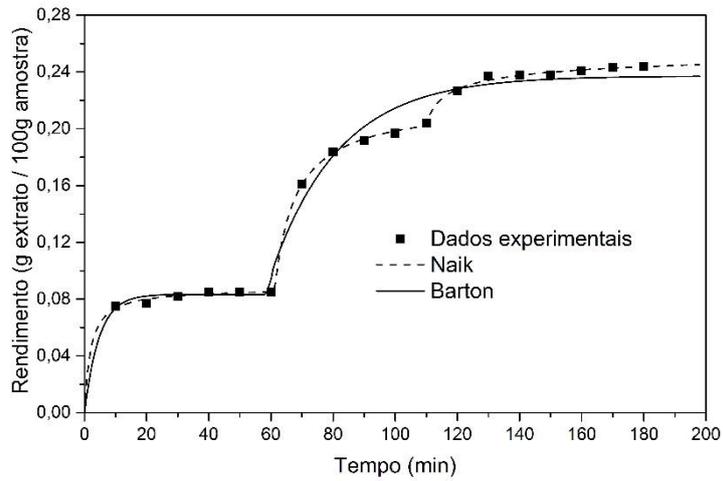


Figura 4.15 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 100 bar e 40 °C

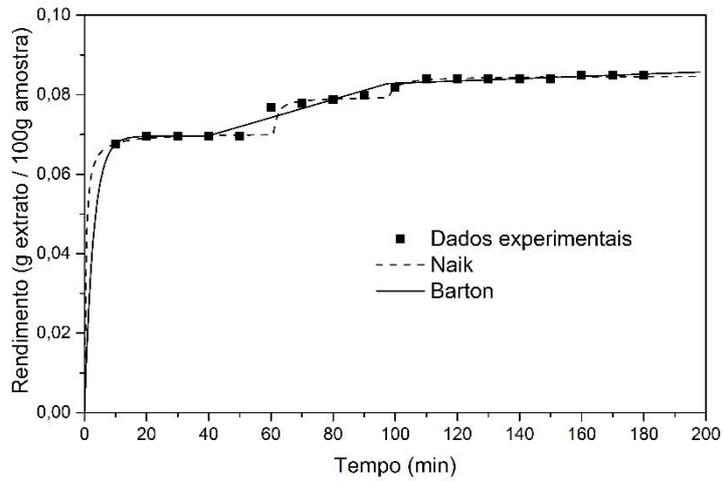


Figura 4.16 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 100 bar e 60 °C

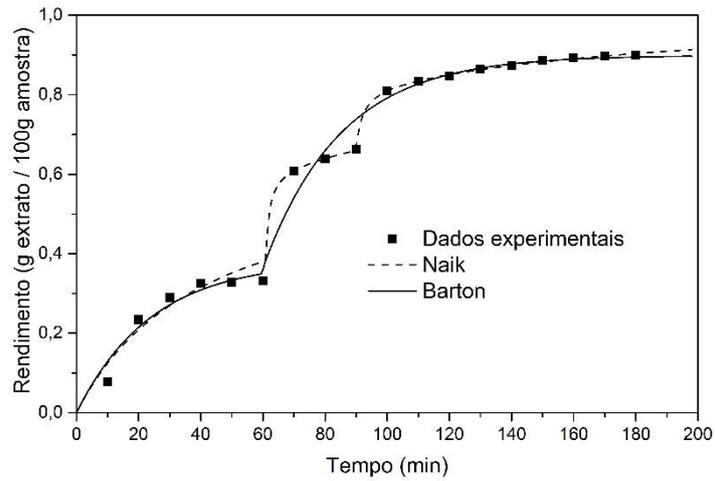


Figura 4.17 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 150 bar e 50 °C

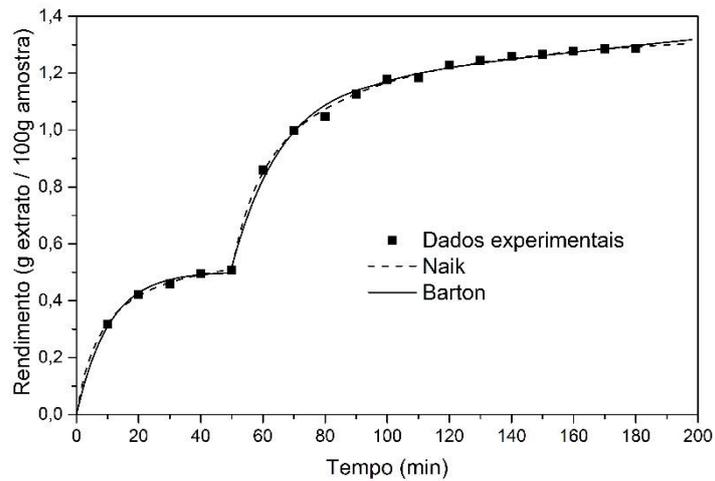


Figura 4.18 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 200 bar e 40 °C

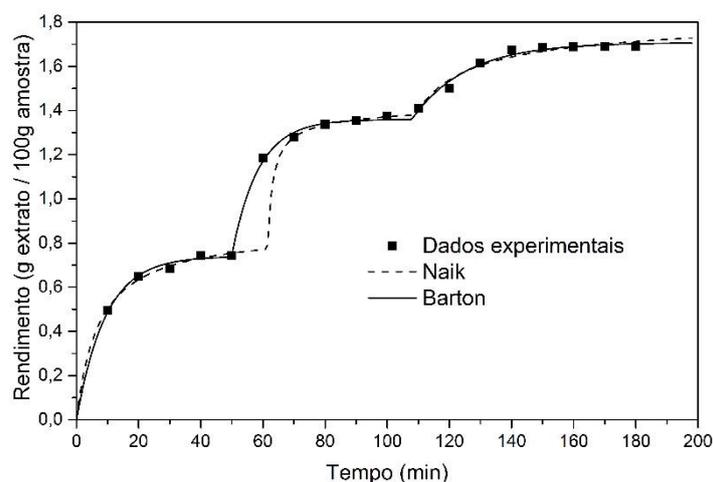


Figura 4.19 - Curvas de extração experimental e simuladas pelos modelos propostos na condição de 200 bar e 60 °C

Na Tabela 4.6 são apresentados os parâmetros de comparação entre os modelos utilizados no que diz respeito à qualidade do ajuste.

Tabela 4.6 - Parâmetros de comparação dos modelos utilizados nas cinéticas de extração

Condição experimental	Modelo	Erro médio	Soma Quadrática dos erros	Critério de Informação de Akaike (AIC)
100 bar 40 °C	Naik	0,76	$3,10 \times 10^{-5}$	-170,88
	Barton	2,50	$6,19 \times 10^{-4}$	-116,978
100 bar 60 °C	Naik	0,89	$4,87 \times 10^{-5}$	-162,721
	Barton	0,80	$1,73 \times 10^{-5}$	-181,39
200 bar 40 °C	Naik	0,68	$1,30 \times 10^{-3}$	-103,583
	Barton	1,40	$3,98 \times 10^{-3}$	-83,4701
200 bar 60 °C	Naik	2,87	$1,69 \times 10^{-1}$	-15,9895
	Barton	1,35	$7,25 \times 10^{-3}$	-72,6750
150 bar 50 °C	Naik	5,76	$6,16 \times 10^{-3}$	-75,5961
	Barton	6,99	$1,54 \times 10^{-2}$	-59,1077

Para todas as condições experimentais e para ambos modelos, o coeficiente de determinação  $R^2$  foi superior a 0,9999.

O critério de informação de Akaike (AIC) é uma medida da qualidade do ajuste baseada na máxima verossimilhança. Na comparação de modelos, o modelo com menor valor de AIC é definida como o que apresenta melhor ajuste dos dados (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

Portanto, observa-se que o modelo de Naik ajustou-se melhor às curvas cinéticas de extração nas condições de 100 bar/40 °C, 200 bar/40 °C e 150 bar/50 °C. Já o modelo de Barton, ajustou melhor os dados experimentais das condições 100 bar/60 °C e 200 bar/60 °C.

### 4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

#### 4.3.1 Cinética experimental da extração assistida por ultrassom

A fim de determinar o tempo de extração mais apropriado para conduzir as extrações assistidas por ultrassom, utilizando-se hexano como solvente, foram realizadas extrações com diferentes tempos, mantendo-se constante os demais parâmetros, fixados nos valores correspondentes ao ponto central do planejamento experimental. Os valores fixados nos parâmetros foram: 50 °C, 50 % de potência nominal do ultrassom e razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15. Essas condições foram definidas a fim de estar numa faixa intermediária das limitações operacionais. A Figura 4.20 apresenta o gráfico de cinética da extração assistida por ultrassom nas condições citadas acima.

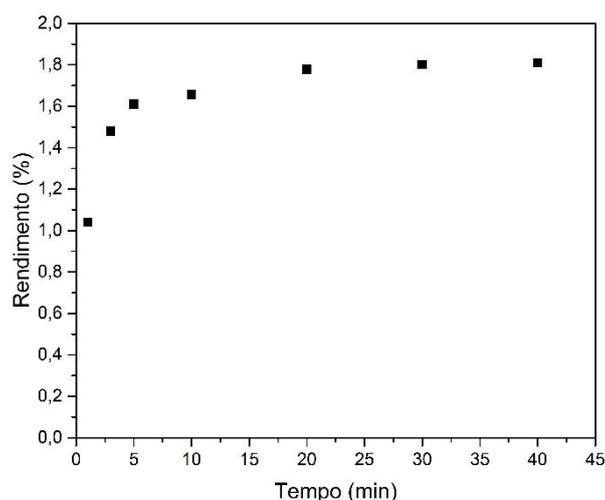


Figura 4.20 - Cinética de extração assistida por ultrassom.

É possível observar que o processo de extração ocorre rapidamente, atingindo valores próximos ao equilíbrio a partir de 20 minutos, o que está de acordo com a literatura que informa que geralmente os processos de extração assistida por ultrassom ocorrem com períodos entre 2 minutos até uma hora (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

A partir dos resultados obtidos na determinação da cinética experimental da extração assistida por ultrassom em função da massa de amirinas, que serão apresentados na Seção 4.5.3, o tempo de extração foi fixado em 3 minutos, visto que com este tempo de extração, o processo apresentou características desejáveis, tais como: teores de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina elevados, e que com tempos maiores de extração, outros compostos acabavam sendo extraídos, diminuindo a pureza; menor consumo energético e menor gasto de tempo, reduzindo os gastos finais do processo.

A fim de comparar os resultados obtidos na extração com solvente assistida por ultrassom, foram realizados experimentos para determinar a cinética experimental da extração por maceração.

As condições experimentais foram escolhidas de forma que o processo de extração por maceração fosse semelhante à extração assistida por ultrassom, sendo que foi utilizada agitação mecânica ao invés de submeter ao ultrassom. Os valores fixados nos parâmetros foram: 50 °C, razão entre massa de folha e

volume de solvente igual a 1:15 e agitação de 100 RPM. A Figura 4.21 apresenta o gráfico de cinética da extração assistida por maceração.

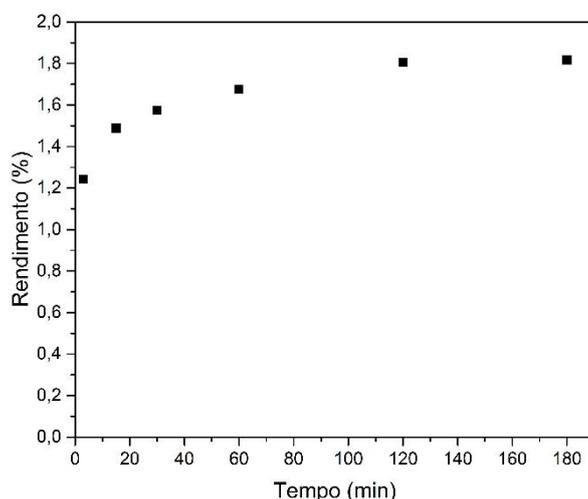


Figura 4.21 - Cinética de extração convencional por maceração.

É possível observar que o processo de extração por maceração ocorreu de forma consideravelmente mais lenta que a extração com ultrassom, chegando ao equilíbrio somente após 120 minutos enquanto com ultrassom foram necessários somente 20 minutos.

#### 4.3.2 Rendimentos das extrações assistidas por ultrassom

A fim de avaliar os efeitos das condições experimentais (potência, temperatura e razão), foi realizado um planejamento experimental completo  $2^3$ . Os níveis utilizados em cada fator foram escolhidos levando em consideração limitações operacionais de forma a garantir uma ampla variação dos parâmetros. O volume de solvente (hexano) foi mantido constante (50 mL).

Os experimentos foram realizados de forma aleatória, para evitar resultados tendenciosos. Os valores de rendimentos obtidos são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Condições do planejamento experimental da EAU e seus respectivos rendimentos

Ensaio	Potência (%)	Temperatura (°C)	Razão Massa/Solvente (g:mL)	Rendimento (%) <sup>*</sup>
1	30	40	1:10	1,27
2	70	40	1:10	1,38
3	30	60	1:10	1,53
4	70	60	1:10	1,57
5	30	40	1:20	1,52
6	70	40	1:20	1,40
7	30	60	1:20	1,79
8	70	60	1:20	1,69
9	50	50	1:15	1,50
10	50	50	1:15	1,50
11	50	50	1:15	1,46

\* Os rendimentos são expressos em base seca

O maior rendimento (1,79 %) foi obtido no ensaio 7, no qual a potência era de 30% (-1), a temperatura de 60 °C (+1) e a razão de 1:20 (+1), enquanto o menor rendimento foi obtido no ensaio 1 (1,27 %) no qual a potência era de 30% (-1), a temperatura de 40 °C (-1) e a razão de 1:10 (-1).

Observa-se que fixando a temperatura tanto em 40 °C quanto em 60 °C, na razão 1:10 o aumento da potência causou um aumento no rendimento, entretanto, com razão de 1:20, ocorre um efeito inverso, sendo que maiores potências resultam em menores rendimentos. Fixando-se a potência, ocorre um aumento do rendimento com o aumento da temperatura, independentemente da razão massa/solvente utilizada. Ao fixar os valores de potência e temperatura, pode-se observar que o aumento na razão ocasiona um aumento no rendimento.

Utilizando-se o programa computacional *Statistica 7* (STATSOFT), foram realizadas as análises estatísticas, visando determinar os efeitos das variáveis (potência, temperatura e razão) sobre o rendimento global da extração. Para isso, foram considerados modelos lineares com intervalo de confiança de 95%. A

Tabela 4.8 apresenta os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração

Tabela 4.8 – Tabela de efeitos para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU

	<b>Efeito</b>	<b>p-valor*</b>
<b>Média/Intercepto</b>	1,51	$1,02 \times 10^{-8}$
<b>Potência</b>	-0,02	0,50
<b>Temperatura</b>	0,25	$3,97 \times 10^{-4}$
<b>Razão</b>	0,16	$2,15 \times 10^{-3}$
<b>PxT</b>	-0,01	0,57
<b>PxR</b>	-0,09	0,02
<b>TxR</b>	-0,02	0,33

\*significância estatística  $p < 0,05$

Observa-se que o efeito da temperatura é significativo e positivo, o que explica o aumento do rendimento quando são utilizadas temperaturas maiores, da mesma forma, o efeito da razão massa/solvente é significativo e positivo. O efeito da potência não é significativo, contudo, o efeito da interação da potência com a razão é significativo e negativo, indicando efeito desfavorável, pois ao aumentar os dois fatores simultaneamente, ocorre um aumento no rendimento da extração.

Na Figura 4.22 pode-se visualizar com clareza as variáveis que apresentaram significância estatística sobre o rendimento global da extração supercrítica.

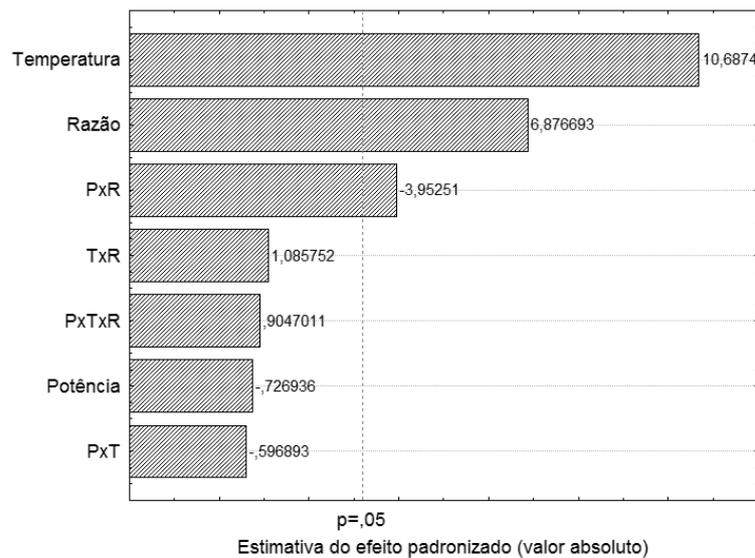


Figura 4.22 – Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU.

O gráfico de Pareto (Figura 4.22) permite a confirmação da significância dos efeitos principais e suas interações. É possível confirmar os efeitos estatisticamente significativos das variáveis isoladas e de suas interações localizados à direita da linha tracejada, que indica ponto de significância dos resultados ( $p \leq 0,05$ ).

Observa-se que o efeito da temperatura e da razão foram significativos, sendo que a temperatura foi mais importante para o rendimento das extrações com solvente assistidas por ultrassom. A influência desses parâmetros foi positiva, significando que, o aumento quantitativo dessas variáveis implica no aumento do rendimento da extração. A interação entre a potência e a razão massa/solvente também demonstrou-se significativa, porém negativa.

A validação do modelo foi realizada pelo teste “F”, obtido a partir da análise de variância (ANOVA). A Tabela 4.9 apresenta os valores obtidos a partir da ANOVA, observando-se que o  $F_{\text{calc}}$  é aproximadamente três vezes maior do que o  $F_{\text{tab}}$ , o modelo é válido no nível de significância de 5% e representa muito bem os resultados experimentais obtidos, dentro da faixa estabelecida nos níveis para as variáveis em estudo para a resposta rendimento. O modelo obtido pela regressão linear é apresentado na Equação 4.2, sendo que ele explica 98,36%

das variações entre os valores experimentais e os previstos, indicando ótima concordância.

Tabela 4.9 – ANOVA do modelo cuja resposta é rendimento da EAU

Causas de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub> *
Modelo	0,1958	7	0,0280	25,4545	8,8867
Resíduos	0,0033	3	0,0011		
Total	0,1991	10			

R<sup>2</sup>: 0,9836    R<sup>2</sup><sub>adj</sub>: 0,9454    \*F<sub>tab</sub>(7;3;0,05)

$$\text{Rendimento (\%)} = 0,0296 - 0,0161P - 0,0183T + 0,0528R - 0,0002PT - 0,0010PR - 0,0003TR + 0,000001PTR \quad (4.2)$$

As Figura 4.23, Figura 4.24 e Figura 4.25 apresentam as superfícies de resposta para o rendimento da extração com solvente, mantendo-se um dos fatores constante no valor referente ao ponto central.

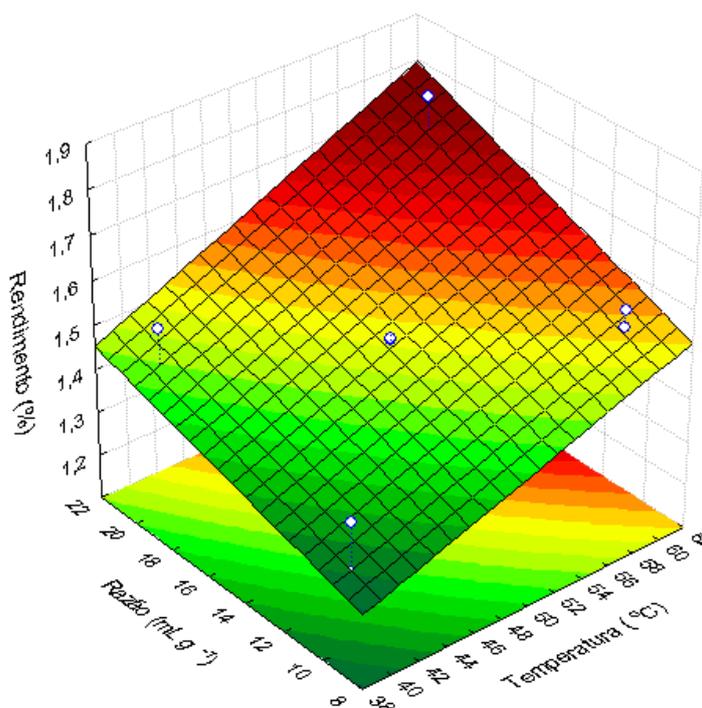


Figura 4.23 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Potência = 50%).

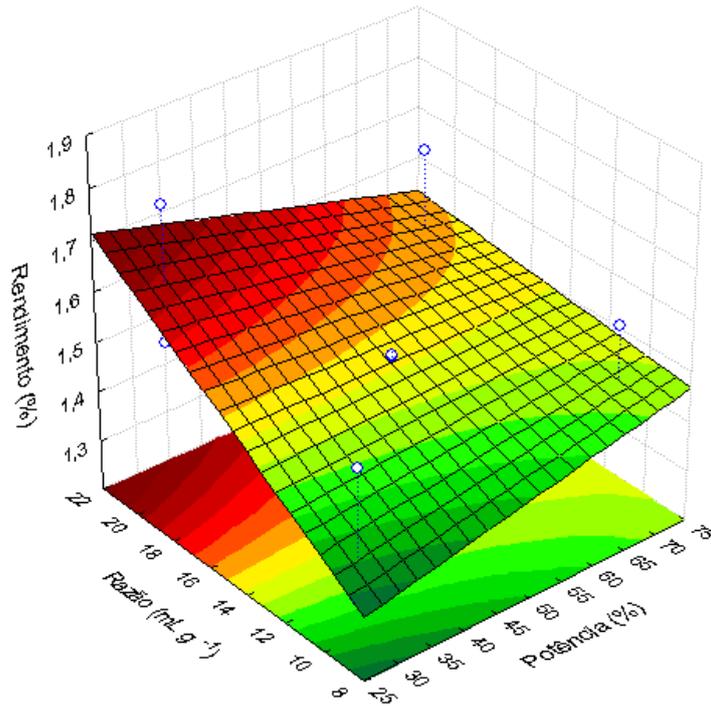


Figura 4.24 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Temperatura = 50 °C).

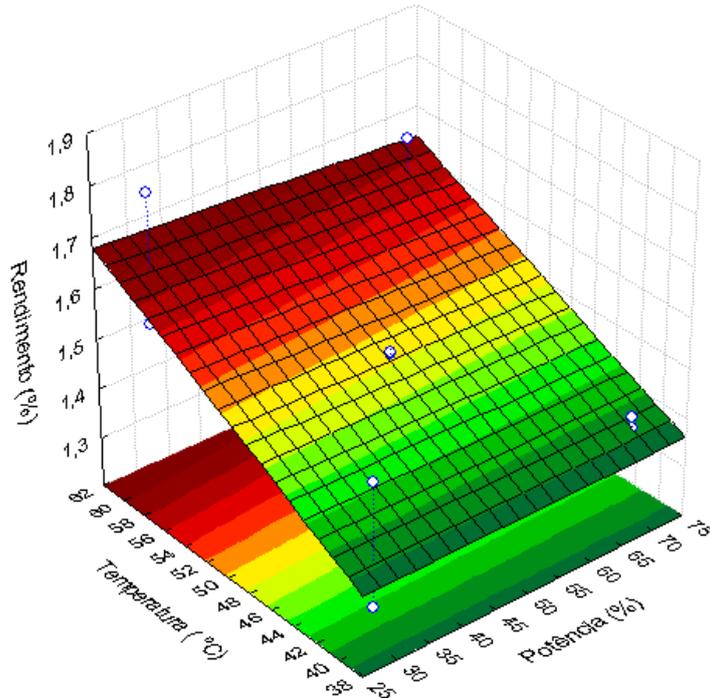


Figura 4.25 – Superfície de resposta para o rendimento da EAU (Razão = 1:15).

#### 4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DETERMINADA POR CG-EM

Devido ao alto custo da análise de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, optou-se por realizar a caracterização química completa de apenas uma amostra de cada método de extração.

O extrato obtido por extração com fluido supercrítico escolhido para a caracterização química foi o referente ao ponto central do planejamento (150 bar e 50 °C). Para a extração assistida por ultrassom, também foi analisado o extrato obtido no ponto central do planejamento (50 % de potência, 50 °C e razão massa/solvente 1:15). Já para a maceração, para efeitos de comparação, foi escolhido o extrato obtido com 3 minutos de extração, sendo as outras condições: 50 °C e 100 RPM de agitação e razão massa/solvente 1:15.

Nas Figura 4.26, Figura 4.27 e Figura 4.28 são apresentados os cromatogramas obtidos para cada extrato, onde observa-se diversos picos com seus respectivos tempos de retenção. Cada pico representa um composto identificado.

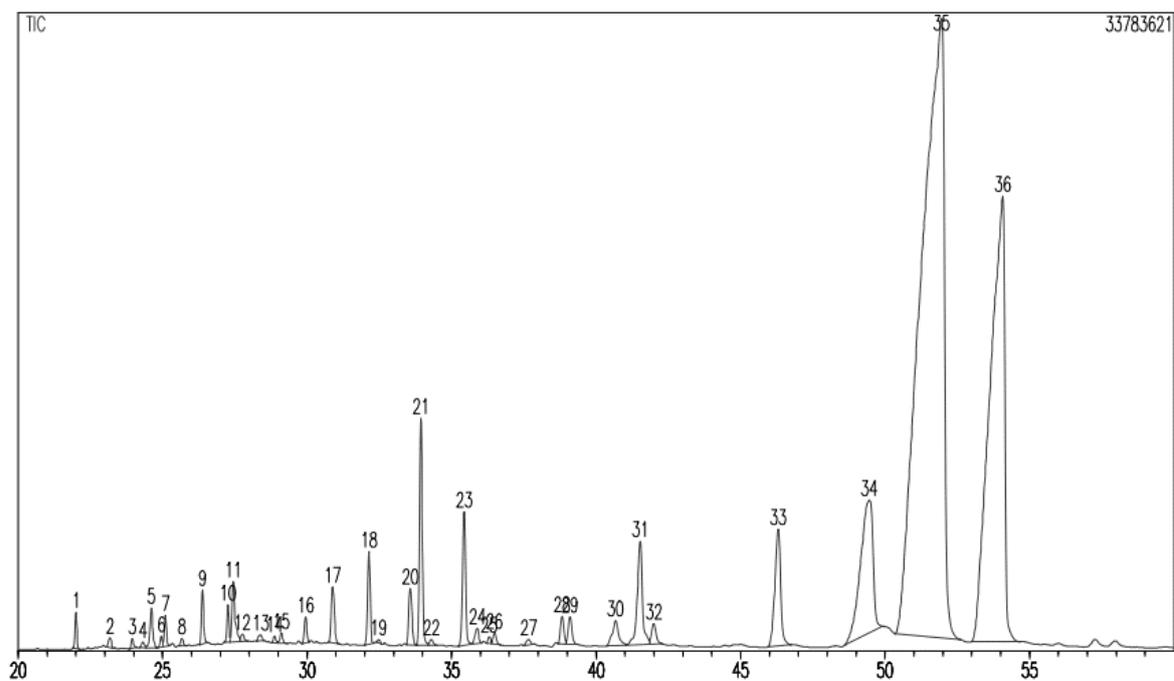


Figura 4.26 - Cromatograma do extrato obtido na EFS com 150bar, 50 °C e 180 minutos de extração.

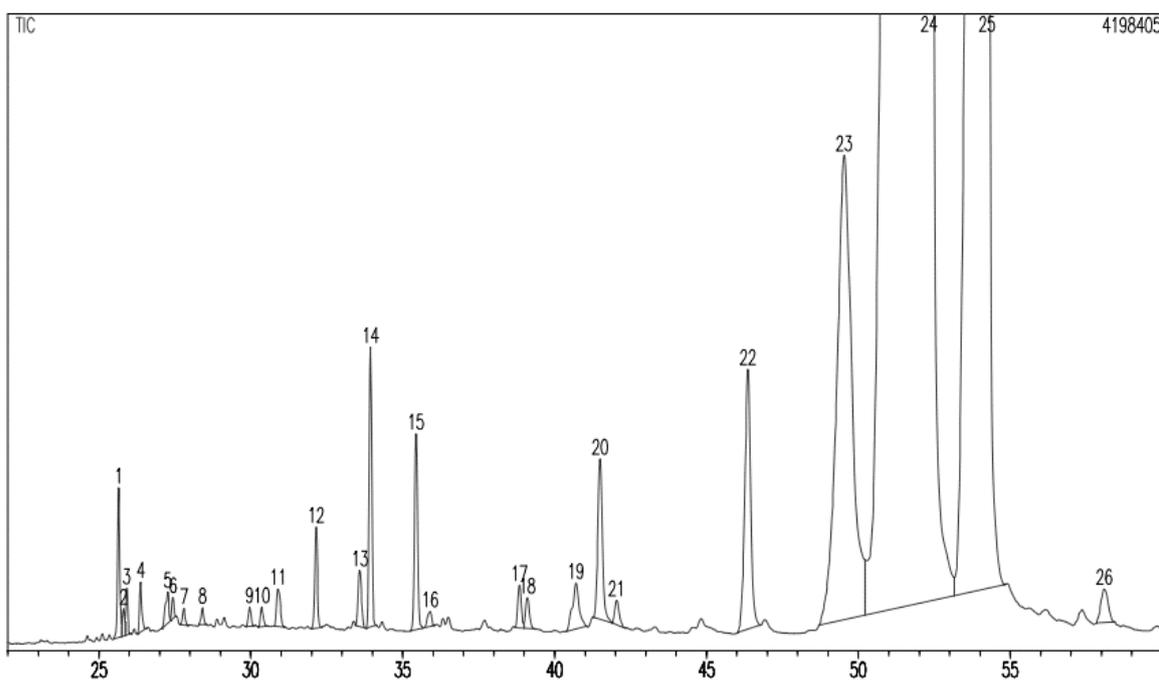


Figura 4.27 - Cromatograma do extrato obtido por EAU com 50% de potência, 50°C, razão massa solvente 1:15 e 3 minutos de extração.

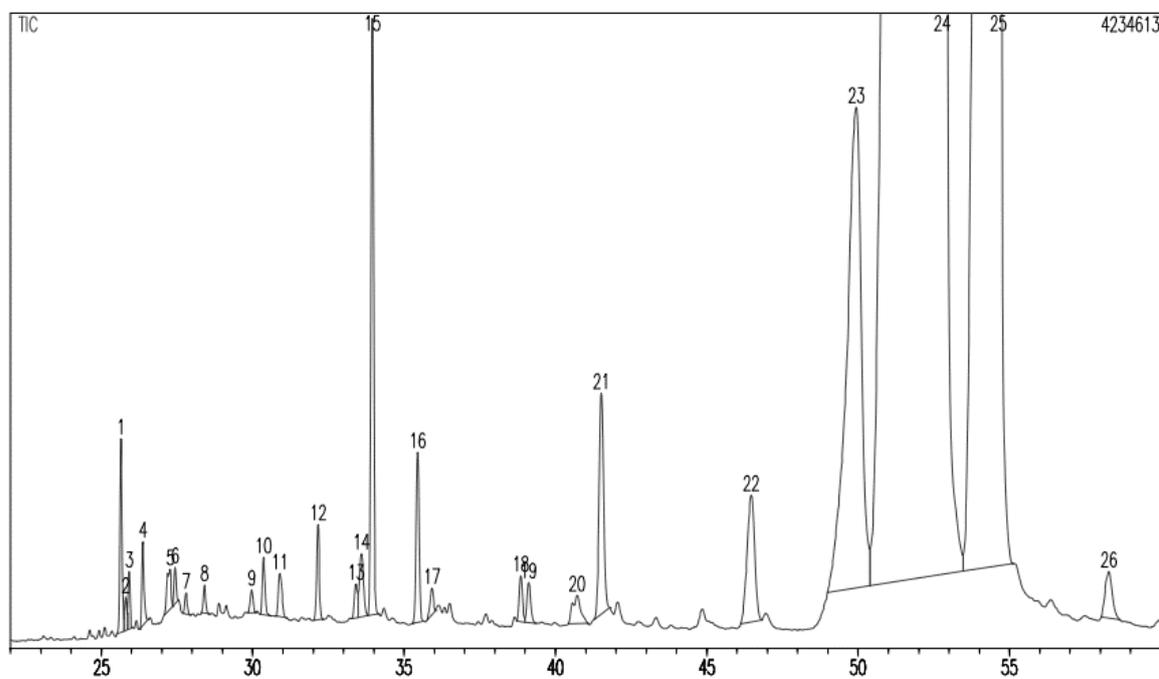


Figura 4.28 - Cromatograma do extrato obtido por maceração com 100 RPM de agitação, 50 °C, razão massa/solvente 1:15 e 3 minutos de extração.

A Tabela 4.10 apresenta os compostos identificados, bem como o número CAS (registro no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*) e a porcentagem de área normalizada, que indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

Para a determinação da composição química dos extratos, levou-se em consideração a qualidade da similaridade dos espectros de massas obtidos para cada pico em relação aos registrados nas bibliotecas utilizadas, sendo que compostos que apresentaram similaridade inferior a 85 % não são apresentados.

Tabela 4.10 - Composição química dos extratos obtidos nos diferentes métodos de extração

Nome do Composto	CAS	% Área		
		EFS (*)	EAU (*)	Maceração (*)
$\beta$ -elemeno	515-13-9	0,25 (1)	-	-
$\beta$ -selineno	17066-67-0	0,11 (2)	-	-
Viridifloreno	21747-46-6	0,40 (5)	-	-
Tetradecil Oxirano	7320-37-8	-	0,16 (1)	0,15 (1)
Fitol	150-86-7	0,07 (8)	-	-
Ácido Hexadecanóico	57-10-3	0,41 (9)	0,05 (3)	0,07 (3)
Tetrametil Hexadecenol	102608-53-7	0,27 (10)	0,04 (4)	0,04 (4)
Ácido oleico	112-80-1	0,67 (11)	0,02 (6)	0,03 (6)
Pentatriacontano	630-07-9	0,84 (18)	0,12 (12)	0,09 (12)
Hexil decanol	2425-77-6	0,66 (20)	-	-
Esqualeno	111-02-4	2,17 (21)	0,33 (14)	0,56 (15)
Tetratetracontano	7098-22-8	1,41 (23)	0,26 (15)	0,18 (16)
Tetradecanal	124-25-4	0,07 (25)	-	-
Vitamina E	059-02-9	1,92 (31)	0,33 (20)	0,35 (21)
Octadecanal	638-66-4	0,32 (32)	-	-
Z-2-Octadecen-1-ol	-	2,47 (33)	-	-
Beta-sitosterol	083-46-5	6,28 (34)	3,30 (23)	2,59 (23)
$\beta$ -amirina	559-70-6	53,72 (35)	71,25 (24)	72,17 (24)
$\alpha$ -amirina	638-95-9	24,63 (36)	22,69 (25)	22,71 (25)

EFS: Extração com fluido supercrítico; EAU: Extração assistida por ultrassom, (\*) número do pico nos cromatogramas

Nota-se que a porcentagem dos terpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina é bastante elevada, variando entre 22,69 e 24,63 % para  $\alpha$ -amirina e entre 53,72 e

72,17 % para  $\beta$ -amirina. Valores bastante superiores aos encontrados no extrato da casca de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) que também apresenta  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, sendo identificados 15,87 % de  $\beta$ -amirina e 13,90 % de  $\alpha$ -amirina (LUO *et al.*, 2014). Já para extratos secos obtidos por maceração com hexano de óleos-resinas de 7 espécies de árvores do gênero *Protium*, as porcentagens variaram entre 7,00 e 32,3 % de  $\alpha$ -amirina e entre 5,00 e 41,1 % de  $\beta$ -amirina, sendo que as plantas *Protium strumosum* e *Protium tenuifolium* apresentaram porcentagens de  $\alpha$ -amirina superiores aos identificados na uvaia, 32,30 % na *P. strumosum* e 25,6 % na *P. tenuifolium* (SILVA *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos indicam que os extratos obtidos pelos três métodos são relativamente semelhantes, sendo essa semelhança mais acentuada entre os extratos obtidos na extração assistida por ultrassom e na extração por maceração. Possivelmente isso ocorreu pois ambos métodos utilizaram o mesmo solvente e condições semelhantes de extração, diferenciando somente pelo uso do ultrassom na extração assistida por ultrassom e pela agitação mecânica na extração por maceração.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE $\alpha$ -AMIRINA E $\beta$ -AMIRINA POR CLAE

Visto que os compostos majoritários encontrados na caracterização química foram os terpenos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina e como a porcentagem desses compostos foi bastante alta no extrato analisado, foram realizadas análises de quantificação a partir de curvas de calibração com padrões analíticos. A Figura 4.29 apresenta um cromatograma dos padrões  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, sendo o pico em 9,4 min relativo à  $\beta$ -amirina e o de 10,1 min relativo à  $\alpha$ -amirina.

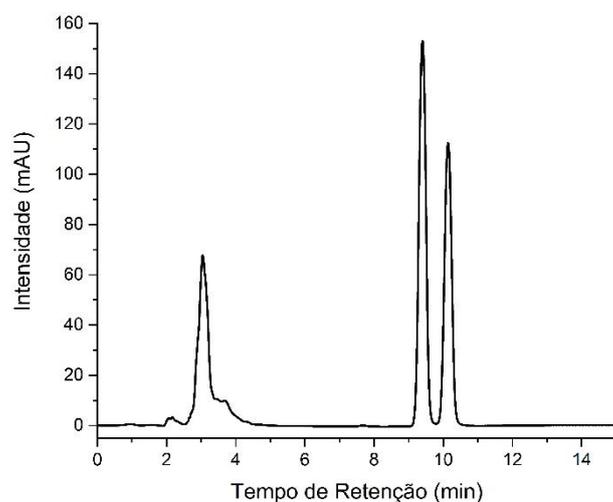


Figura 4.29 - Cromatograma dos padrões  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina.

A quantificação foi realizada tendo como base a curva padrão para cada composto. Utilizaram-se soluções com concentrações de 10, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos padrões analíticos de  $\alpha$ -Amirina e de  $\beta$ -Amirina também solubilizados em Álcool Isopropílico. As curvas de calibração para  $\alpha$ -Amirina e  $\beta$ -Amirina são apresentadas na Figura 4.30 e na Figura 4.31.

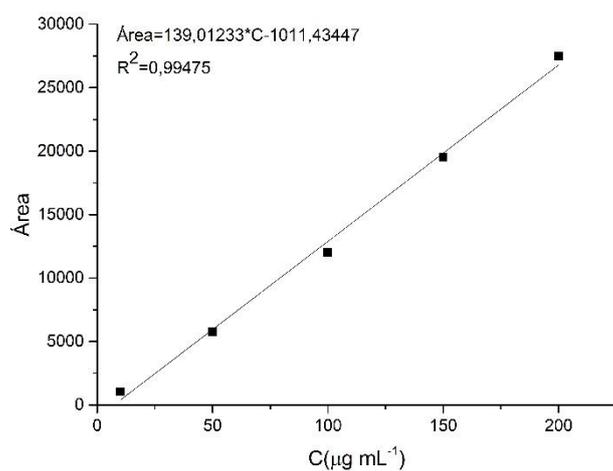


Figura 4.30 - Curva de calibração de  $\alpha$ -amirina.

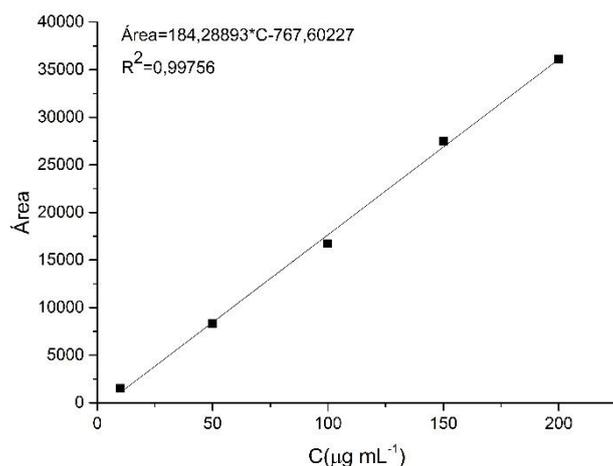


Figura 4.31 - Curva de calibração de β-amirina.

#### 4.5.1 Quantificação de α-amirina e β-amirina nos extratos obtidos no planejamento experimental da extração com fluido supercrítico

Na Tabela 4.11 são apresentados os resultados da quantificação das amirinas para as diferentes condições do planejamento experimental da extração com fluido supercrítico.

Tabela 4.11 - Teor de amirinas (α e β) presentes no extrato supercrítico de uvaia (%) obtidos por EFS

<b>Condição Experimental</b>	<b>Densidade CO<sub>2</sub> (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>α-amirina (%)</b>	<b>β-amirina (%)</b>	<b>Total (%)</b>
100 bar e 40 °C	629,90	18,07	61,30	79,37
100 bar e 60 °C	289,72	28,75	68,68	97,43
200 bar e 40 °C	840,67	13,47	49,85	63,32
200 bar e 60 °C	724,11	14,76	52,81	67,57
150 bar e 50 °C	700,28	17,38	54,60	71,98
150 bar e 50 °C	700,28	16,85	54,66	71,50
150 bar e 50 °C	700,28	17,05	54,48	71,53

Os resultados revelam teores bastante elevados de amirinas nos extratos de uvaia, sendo que houve uma variação entre 63,32 e 97,43 % de mistura dos isômeros no extrato. A condição que apresentou maior pureza de amirinas foi a com pressão de 100 bar e temperatura de 60 °C, sendo que as amirinas representam 97,43 % (m/m) do extrato bruto. O terpeno com maior concentração é a  $\beta$ -amirina, variando entre 49,85 e 68,68 %, já a  $\alpha$ -amirina variou entre 13,47 e 28,75 %. Os melhores resultados, quando avaliados isoladamente, também ocorreram na condição de 100 bar e 60 °C.

Em comparação aos resultados obtidos pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), observar-se uma diferença nas porcentagens dos dois compostos aqui quantificados. Na análise de CG-EM foram identificados 24,63 % de  $\alpha$ -amirina e 53,72 % de  $\beta$ -amirina enquanto na análise por CLAE foram quantificados 16,85 % e 54,66 % respectivamente. Essa diferença deve-se ao fato da análise por CG-EM ser semi-quantitativa, pois utiliza somente a área dos picos na determinação das porcentagens, enquanto que com CLAE, os compostos são quantificados utilizando padrões analíticos, tornando os resultados muito mais precisos.

Observou-se que na faixa de valores para as variáveis em estudo, a quantidade de amirinas presentes em cada extrato variou de acordo com a densidade do CO<sub>2</sub>, sendo que em valores maiores de densidade, a pureza dos extratos obtidos foi menor em relação às amirinas. Este resultado indica que o método de extração pode ser seletivo, pois ao modificar os valores das variáveis pode ser modificada a quantidade de amirinas presente nos extratos. Resultado semelhante foi encontrado por VIGANÓ *et al.* (2016) ao modificar as condições de pressão e temperatura para obter extratos com composições diferentes a partir do bagaço de maracujá.

Contudo, para melhor avaliar os resultados obtidos na quantificação, é necessário que o rendimento seja levado em consideração para que se possa discutir em quais condições o processo é mais viável para obtenção dos isômeros  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. Dessa forma, a Tabela 4.12 apresenta a quantidade de amirinas em função da massa de folhas.

Tabela 4.12 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos por EFS ( $\text{g kg}^{-1}$ )

<b>Condição Experimental</b>	<b>Densidade <math>\text{CO}_2</math> (<math>\text{kg/m}^3</math>)</b>	<b><math>\alpha</math>-amirina *</b>	<b><math>\beta</math>-amirina *</b>	<b>Total *</b>
100 bar e 40 °C	629,90	0,44	1,50	1,94
100 bar e 60 °C	289,72	0,24	0,58	0,82
200 bar e 40 °C	840,67	1,73	6,40	8,13
200 bar e 60 °C	724,11	2,49	8,91	11,40
150 bar e 50 °C	700,28	1,51	4,75	6,26
150 bar e 50 °C	700,28	1,52	4,93	6,45
150 bar e 50 °C	700,28	1,57	5,02	6,59

\* Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

Observa-se que o melhor resultado ocorreu na condição de 200 bar com 60 °C, visto que apresentou o melhor rendimento entre todas as extrações. Nessa condição obteve-se 11,40 g da mistura dos isômeros por kg de folas secas, sendo que foram 2,49 g de  $\alpha$ -amirina e 8,91 g de  $\beta$ -amirina.

Entretanto, é importante destacar que a finalidade para a qual os extratos serão utilizados pode justificar a escolha por outras condições. Caso o interesse seja por extratos com elevada pureza, é preferível utilizar os extratos obtidos na condição de 100 bar e 60 °C, lembrando que nessa condição a pureza é bastante elevada (97,43 %) conforme Tabela 4.11, mas o rendimento é muito pequeno conforme a Tabela 4.2. Em outra situação em que há necessidade de grandes quantidades dos isômeros usando menos massa de folhas, é preferível utilizar a condição de 200 bar e 60 °C.

Os resultados obtidos neste estudo em relação ao rendimento de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina foram elevados e superiores aos teores encontrados em outros trabalhos da literatura. A Tabela 4.13 apresenta resultados obtidos por outros autores no que diz respeito à massa de amirinas por massa de matéria-prima utilizada.

Tabela 4.13 - Resultados de algumas quantificações de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) encontradas na literatura ( $\text{g kg}^{-1}$ )

Planta	$\alpha$ -amirina	$\beta$ -amirina	$\alpha/\beta$ -amirina	Referência
<i>Protium sp</i> (resina)	3,1	1,7	4,8	(DIAS <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ficus carica</i> (látex)		1,2		(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Canarium sp</i> (resina)	2,4	1,1	3,5	(HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ <i>et al.</i> , 2010)
<i>Vitex agnus</i> (fruta)		0,63		(COSSUTA <i>et al.</i> , 2008)
<i>Eugenia pyriformis</i> (EFS)	2,49	8,91	11,40	(Este trabalho)
<i>Eugenia pyriformis</i> (EAU)	2,41	9,71	12,13	(Este trabalho)

#### 4.5.2 Efeito do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos com fluido supercrítico

Para verificar possíveis diferenças nas quantidades de amirinas nos diferentes estágios da extração com fluido supercrítico, foi realizada a quantificação de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina nos extratos obtidos em cada estágio. A Tabela 4.14 apresenta os resultados obtidos na quantificação das amirinas em cada estágio.

Tabela 4.14 - Teor de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) presentes no extrato supercrítico de uvaia obtido com 150 bar e 50 °C

Estágio	Tempo de extração	$\alpha$ -amirina (%)	$\beta$ -amirina (%)	Total (%)
1	0 – 60 min	20,05	46,61	66,66
2	61 – 90 min	15,50	53,30	68,80
3	91 – 180 min	14,87	62,84	77,71

Pode-se observar que para a  $\alpha$ -amirina ocorre uma leve redução na porcentagem presente nos extratos com o aumento do tempo de extração.

Entretanto, para  $\beta$ -amirina ocorre o efeito contrário, sendo que os estágios com maiores tempos de extração apresentam consideravelmente maiores quantidades desse composto.

Quando avaliada a soma dos compostos, pode-se inferir que o aumento da proporção dos compostos presentes nos extratos (de 66,66 para 77,71%) pode ser responsável pelas alterações no aspecto visual dos extratos em função do tempo de extração discutido no fim da seção 4.2.2.

#### 4.5.3 Avaliação da influência do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos por ultrassom.

Primeiramente, foi realizada a quantificação de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina nos extratos obtidos na construção da cinética de extração, a fim de avaliar possíveis efeitos do tempo sobre a composição dos extratos, nesses ensaios somente o tempo sofreu variação, as demais variáveis foram mantidas constantes (: 50 °C, 50 % de potência nominal do ultrassom e razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15). A Tabela 4.15 apresenta os rendimentos e a quantificação das amirinas em relação à massa de extrato.

Tabela 4.15 - Teor de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) presentes no extrato obtido por EAU

<b>Tempo (min)</b>	<b>Rendimento (%)<sup>*</sup></b>	<b><math>\alpha</math>-amirina (%)</b>	<b><math>\beta</math>-amirina (%)</b>	<b>Total (%)</b>
1	1,04	14,61	63,08	77,69
3	1,48	13,88	59,91	73,79
5	1,61	13,61	57,25	70,86
10	1,66	13,56	56,58	70,14
20	1,78	13,47	54,02	67,49
30	1,80	13,36	53,74	67,10
40	1,81	13,33	53,68	67,01

<sup>\*</sup> Os rendimentos são expressos em base seca.

O tempo de extração influenciou no teor de amirinas extraídas, sendo que com tempos mais curtos de extração foi possível obter extratos com maior pureza de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. Para melhor ilustrar esse efeito, a Figura 4.32 e a Figura 4.33 apresentam a variação do teor de amirina em função do tempo.

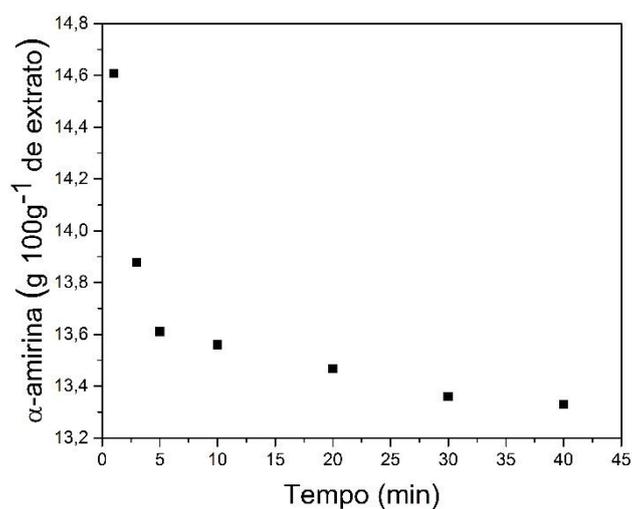


Figura 4.32 - Variação do teor  $\alpha$ -amirina presente no extrato obtidos por EAU de acordo com o tempo.

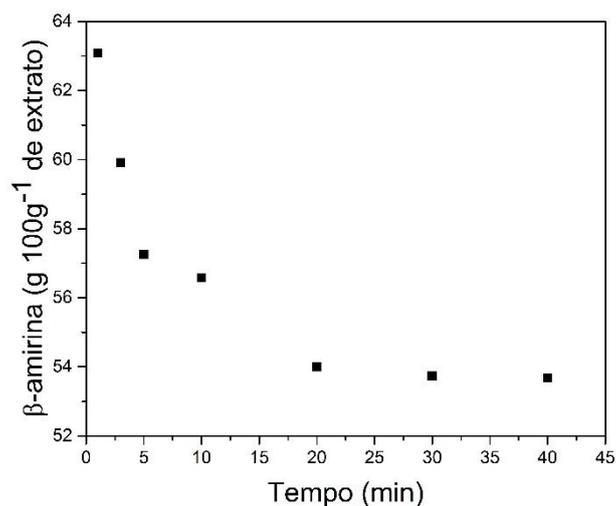


Figura 4.33 - Variação do teor de  $\beta$ -amirina presente no extrato obtido por EAU de acordo com o tempo.

Possivelmente, ocorre o esgotamento de amirinas disponível para extração, e com tempos maiores, outros compostos começam a ser extraídos. Visualmente pode-se observar a mudança na coloração dos extratos em função do tempo, a partir de 5 minutos, o extrato começa adquirir tonalidade esverdeada o que possivelmente indica a presença de clorofila, tornando-se bem escuro e passando da forma de pó para uma consistência quase pastosa com 40 minutos de extração. Na Figura 4.34 pode-se observar a alteração na coloração dos extratos em função do tempo.



Figura 4.34 - Alteração da aparência dos extratos obtidos por EAU em função do tempo de extração

Para melhor avaliar esse fenômeno seria interessante realizar análises de composição por cromatografia gasosa com espectrometria de massas para verificar quais compostos estão presentes nos extratos com baixo tempo de extração e quais presentes quando utilizados tempos maiores de extração.

Para avaliar a quantidade de amirinas obtidas em função da massa de matéria-prima utilizada pode-se visualizar graficamente na Figura 4.35 e na Figura 4.36.

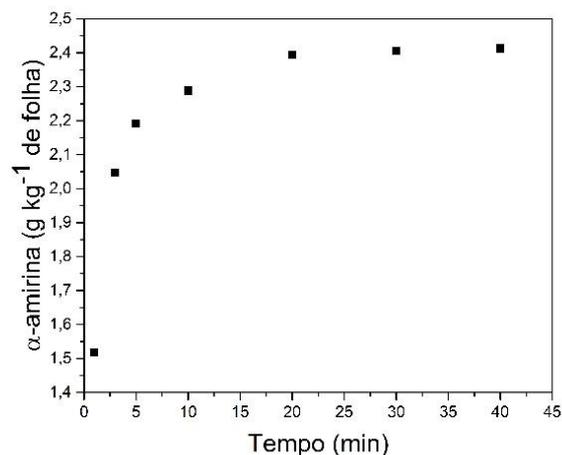


Figura 4.35 - Massa de  $\alpha$ -amirina extraídas por EAU em função do tempo.

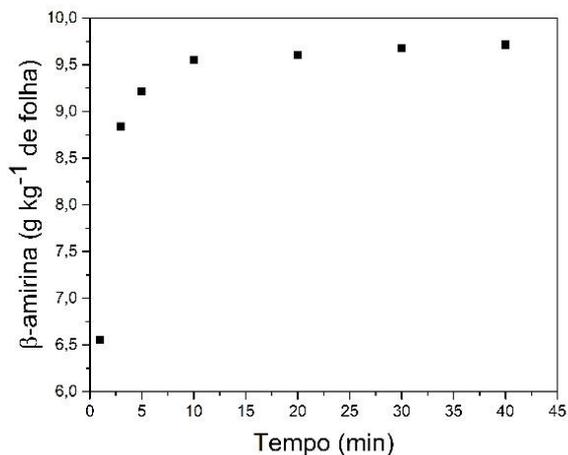


Figura 4.36 - Massa de  $\beta$ -amirina extraídas por EAU em função do tempo.

Pode-se observar que a quantidade de amirina extraída aumenta com o tempo, mas esse aumento torna-se muito pequeno quando o tempo de extração passa de 20 minutos para a  $\alpha$ -amirina e de 10 minutos para a  $\beta$ -amirina. Na Tabela 4.16 são apresentados os resultados da quantificação de amirinas por kg de folha seca.

Tabela 4.16 - Massa de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia ( $\text{g kg}^{-1}$ ) nos extratos obtidos na construção da cinética de EAU

Tempo (min)	$\alpha$ -amirina	$\beta$ -amirina	Total
1	1,52	6,56	8,07
3	2,05	8,86	10,91
5	2,19	9,22	11,41
10	2,25	9,37	11,61
20	2,39	9,61	12,00
30	2,41	9,68	12,08
40	2,41	9,71	12,13

Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

O melhor resultado obtido para massa de amirina por massa de amostra na extração assistida por ultrassom utilizando-se hexano foi alcançada com 40 minutos, há 12,13 g da mistura de isômeros por kg de folha seca, sendo que desses, 2,41 g são referentes à  $\alpha$ -amirina e 9,71 g referente à  $\beta$ -amirina.

#### 4.5.4 Avaliação das condições experimentais utilizadas no planejamento experimental da extração assistida por ultrassom

Na Tabela 4.17 são apresentados os resultados da quantificação das amirinas para as diferentes condições experimentais. Como comentado anteriormente, os resultados de quantificação por CLAE são obtidos utilizando padrões analíticos, sendo normal que o resultado apresentado aqui seja levemente diferente do apresentado anteriormente na análise por CG-EM.

Na análise de CG-EM foram identificados 22,69 % de  $\alpha$ -amirina e 71,25 % de  $\beta$ -amirina enquanto que na análise por CLAE foram quantificados 14,57 % e 62,85 % respectivamente.

Tabela 4.17 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) presentes no extrato obtidos com o uso do ultrassom (%)

<b>Condição Experimental (Potência Temperatura Razão)</b>	<b><math>\alpha</math>-amirina (%)</b>	<b><math>\beta</math>-amirina (%)</b>	<b>Total (%)</b>
30% 40°C 1:10	12,49	51,64	64,13
70% 40°C 1:10	13,13	56,13	69,26
30% 60°C 1:10	13,28	55,66	68,95
70% 60°C 1:10	11,19	45,59	56,78
30% 40°C 1:20	12,03	49,99	62,02
70% 40°C 1:20	14,64	61,89	76,53
30% 60°C 1:20	11,72	47,64	59,36
70% 60°C 1:20	12,66	49,86	62,51
50% 50°C 1:15	14,47	62,17	76,65
50% 50°C 1:15	14,57	62,85	77,42
50% 50°C 1:15	13,90	63,15	77,06

Os resultados revelam teores bastante elevados de amirinas nos extratos de uvaia, sendo que houve uma variação entre 56,78 e 77,42 g de mistura dos isômeros por 100 gramas de extrato. A condição que apresentou maior pureza de amirinas foi a com potência de 50 %, temperatura de 50 °C e razão de 1:15, sendo que as amirinas representam 77,42 % (m/m) do extrato bruto.

O terpeno com maior concentração é a  $\beta$ -amirina, variando entre 45,59 e 63,14 g por 100 g de extrato, já a  $\alpha$ -amirina variou entre 11,19 e 14,64 g por 100 g de extrato. Os melhores resultados, quando avaliados isoladamente, ocorreram na condição de potência de 50 %, temperatura de 50 °C e razão de 1:15 para  $\beta$ -amirina e potência de 70 %, temperatura de 40 °C e razão de 1:20 para  $\alpha$ -amirina.

Para melhor avaliar os resultados obtidos na quantificação, é necessário que o rendimento seja levado em consideração para que se possa discutir em quais condições o processo é mais viável para obtenção dos isômeros alfa e beta-amirina. Dessa forma, a Tabela 4.18 apresenta a quantidade de amirinas em função da massa de folhas.

Tabela 4.18 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia nos extratos obtidos com o uso de ultrassom ( $\text{g kg}^{-1}$ )

<b>Condição Experimental (Potência Temperatura Razão)</b>	<b><math>\alpha</math>-amirina</b>	<b><math>\beta</math>-amirina</b>	<b>Total</b>
30% 40°C 1:10	1,59	6,57	8,15
70% 40°C 1:10	1,81	7,76	9,57
30% 60°C 1:10	2,03	8,52	10,55
70% 60°C 1:10	1,76	7,16	8,92
30% 40°C 1:20	1,83	7,60	9,43
70% 40°C 1:20	2,05	8,69	10,74
30% 60°C 1:20	2,10	8,51	10,61
70% 60°C 1:20	2,13	8,40	10,53
50% 50°C 1:15	2,17	9,33	11,50
50% 50°C 1:15	2,19	9,45	11,65
50% 50°C 1:15	2,03	9,22	11,25

Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

Observa-se que o melhor resultado ocorreu na condição com potência de 50 %, temperatura de 50 °C e razão de 1:15, visto que apresentou o melhor rendimento entre todas as extrações, e a maior pureza de amirinas. Nessa condição, obteve-se 11,65 g da mistura dos isômeros por kg de folas secas, sendo que foram 2,19 g de  $\alpha$ -amirina e 9,45 g de  $\beta$ -amirina.

Os resultados obtidos em relação à massa de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina foram superiores aos outros estudos que empregaram diferentes matrizes sólidas apresentados na Tabela 4.13.

#### 4.5.5 Avaliação da influência do tempo de extração sobre a quantidade de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos por maceração.

A quantificação de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina nos extratos obtidos na construção da cinética de extração foi realizada a fim de avaliar o efeito do tempo sobre a composição dos extratos, nesses ensaios somente o tempo sofreu

variação, as demais variáveis foram mantidas constantes (50 °C, 100 RPM de agitação e razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15). A Tabela 4.19 apresenta os rendimentos e a quantificação das amirinas em relação à massa de extrato.

Tabela 4.19 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) presentes no extrato obtido por maceração (%)

<b>Tempo (min)</b>	<b>Rendimento (%)*</b>	<b><math>\alpha</math>-amirina (%)</b>	<b><math>\beta</math>-amirina (%)</b>	<b>Total (%)</b>
3	1,24	14,59	60,52	75,11
15	1,49	13,53	55,44	68,97
30	1,57	13,18	52,29	65,47
60	1,68	12,56	49,08	61,65
120	1,81	11,69	45,46	57,15
180	1,82	11,43	45,29	56,72

Os rendimentos são expressos em base seca.

O tempo de extração influencia diretamente na quantidade de amirinas extraídas, sendo que com tempos mais curtos de extração é possível obter extratos com maior quantidade de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina. Para melhor ilustrar esse efeito, a Figura 4.37 e a Figura 4.38 apresentam a variação do teor de amirina em função do tempo.

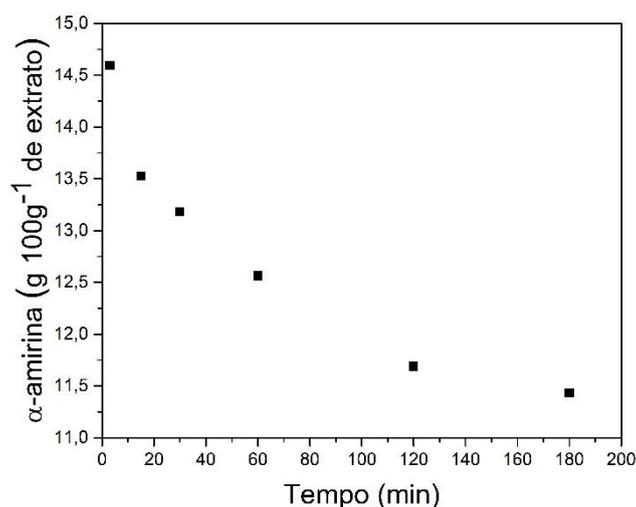


Figura 4.37 - Variação do teor de  $\alpha$ -amirina presente no extrato obtido por maceração de acordo com o tempo.

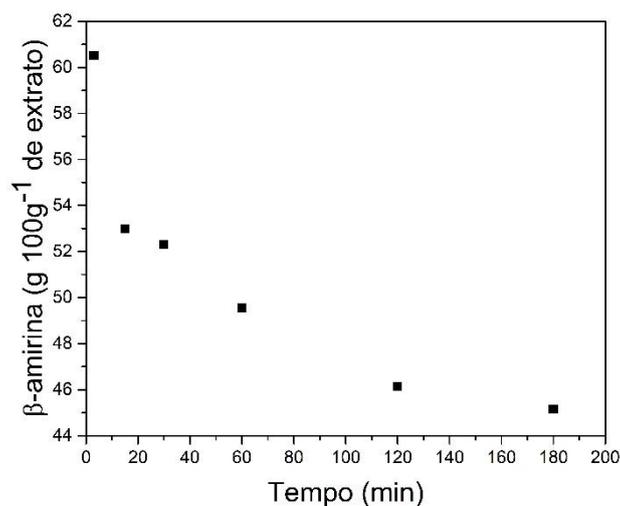


Figura 4.38 - Variação do teor de  $\beta$ -amirina presente no extrato obtido por maceração de acordo com o tempo.

Da mesma forma que ocorre na extração assistida por ultrassom, na extração por maceração em tempos maiores de extração outros compostos passam a ser extraídos, diminuindo a fração mássica de amirinas nos extratos.

Visualmente pode-se observar a mudança na coloração dos extratos em função do tempo, a partir de 15 minutos, o extrato começa adquirir tonalidade

esverdeada o que possivelmente indica a presença de clorofila, tornando-se bem escuro e passando da forma de pó para uma consistência quase pastosa a partir de 60 minutos de extração. Na Figura 4.39 pode-se observar a alteração na aparência dos extratos em função do tempo.



Figura 4.39 - Alteração da aparência dos extratos obtidos por maceração em função do tempo de extração

Para melhor avaliar esse fenômeno seria interessante realizar análises de composição por cromatografia gasosa com espectrometria de massas para verificar quais compostos estão presentes nos extratos com baixo tempo de extração e quais presentes quando utilizados tempos maiores de extração.

Para avaliar a quantidade de amirinas obtidas em função da massa de matéria-prima utilizada pode-se visualizar graficamente na Figura 4.40 e na Figura 4.41.

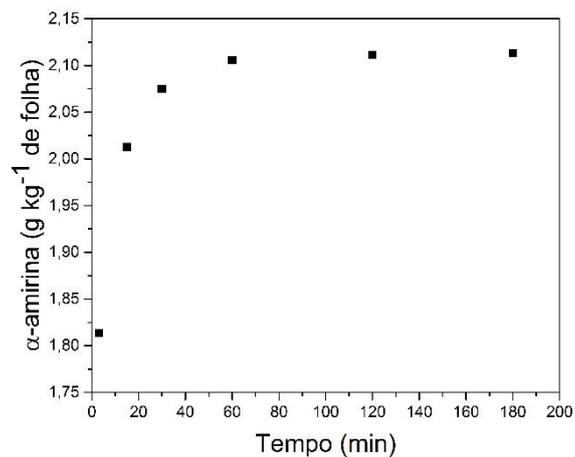


Figura 4.40 - Massa de  $\alpha$ -amirina extraídas por maceração em função do tempo.

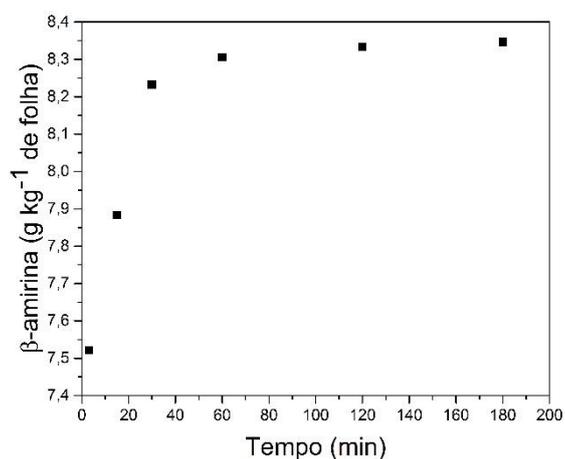


Figura 4.41 - Massa de  $\beta$ -amirina extraídas por maceração em função do tempo.

Pode-se observar que a quantidade de amirina extraída aumenta com o tempo, mas esse aumento torna-se muito pequeno quando o tempo de extração passa de 20 minutos para a  $\alpha$ -amirina e de 10 minutos para a  $\beta$ -amirina. Na Tabela 4.20 são apresentados os resultados da quantificação de amirinas por kg de folha seca.

Tabela 4.20 - Quantificação de amirinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em relação à massa de folhas de uvaia ( $\text{g kg}^{-1}$ ) no extrato obtido por maceração

Tempo (min)	$\alpha$ -amirina	$\beta$ -amirina	Total
3	1,81	7,52	9,34
15	2,01	7,88	9,90
30	2,08	8,23	10,31
60	2,11	8,31	10,41
120	2,11	8,33	10,44
180	2,11	8,35	10,46

Os resultados são expressos em relação à massa de folhas secas.

#### 4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO MATERIAL VEGETAL

A Figura 4.42 e a Figura 4.43 mostram imagens feitas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de partículas de folhas de uvaia após moagem e classificação granulométrica. É possível observar que a superfície da folha apresenta características diferentes na face adaxial (superior) e abaxial (inferior) da folha.

Na face abaxial (Figura 4.44) é possível observar a presença de inúmeros estômatos (estruturas relacionadas com as trocas gasosas) e tricomas tectores unicelulares, estruturas semelhantes a pelos, que não liberam secreção e têm, entre outras funções, reduzir a perda de água por transpiração, auxiliar na defesa contra insetos predadores e diminuir a incidência luminosa. Esses resultados estão de acordo com as características morfoanatômicas das folhas de Uvaia descritas na literatura (ARMSTRONG; DO ROCIO DUARTE; MIGUEL, 2012).

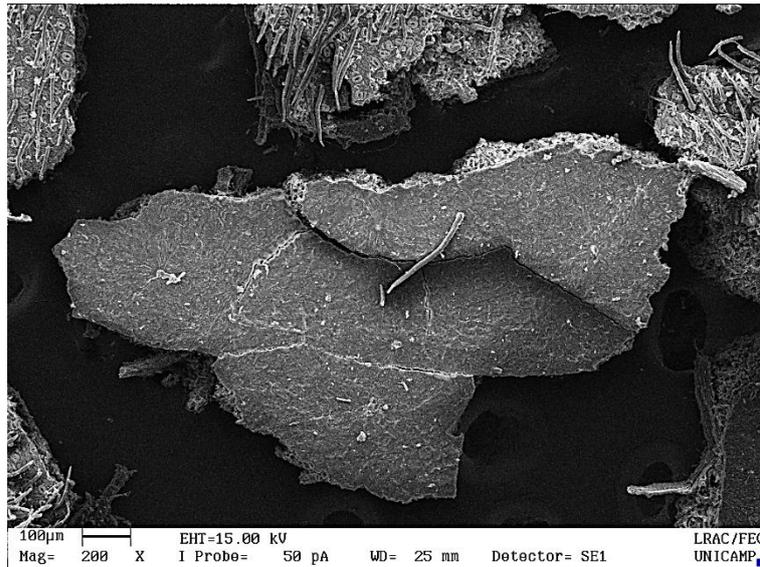


Figura 4.42 - Imagem obtida por MEV da face adaxial de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 200 X

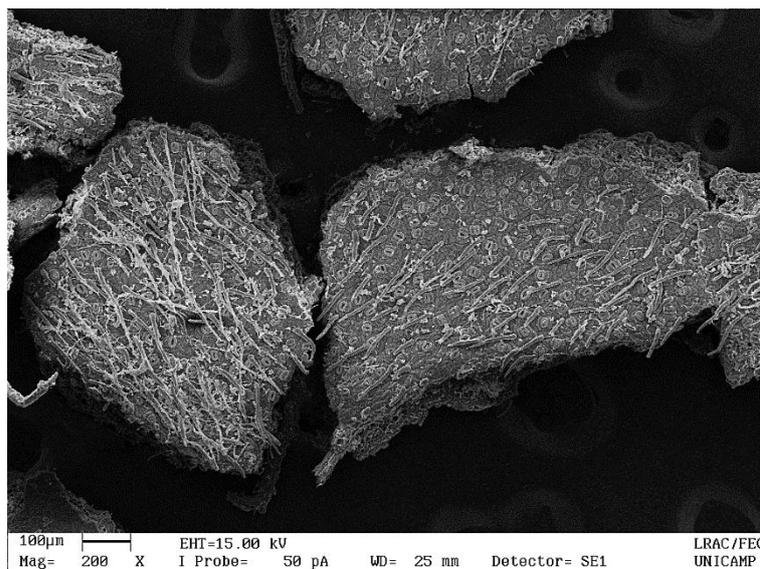


Figura 4.43 - Imagem obtida por MEV da face abaxial de partículas de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 200 X

Ao comparar as micrografias obtidas antes e após os processos de extração foi possível observar que na superfície (tanto superior quanto inferior) não houve alterações morfológicas, entretanto, observou-se que na região localizada na borda das partículas haviam estruturas cristalinas nas partículas que não passaram por extração e que tais estruturas não estavam mais presentes nas partículas que passaram pelos processos de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e

com hexano assistido por ultrassom. Possivelmente tais estruturas cristalinas são formadas pelos compostos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina que em temperatura ambiente estão na fase sólida e com grande quantidade disponível para extração.

Na Figura 4.44 é possível observar a região da borda citada acima, essas estruturas fazem parte do interior das folhas, que tornou-se disponível devido à fragmentação das folhas.

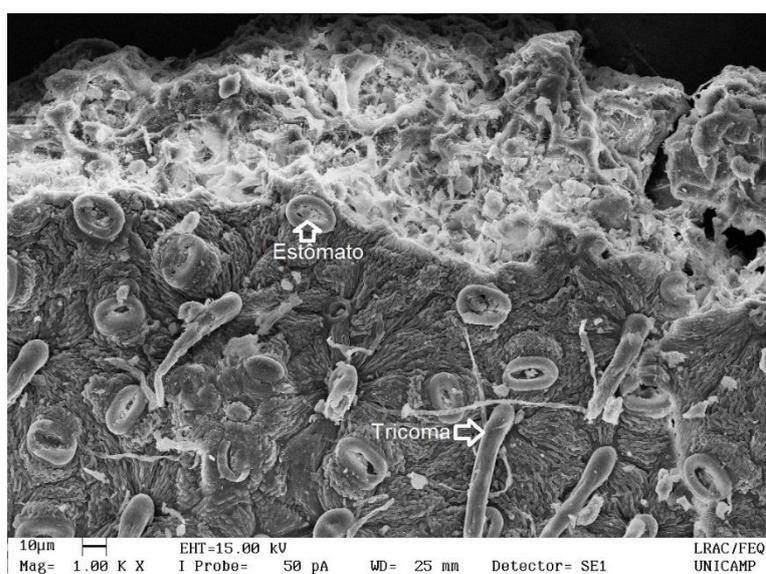


Figura 4.44 - Imagem obtida por MEV de uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 1000 X

Na Figura 4.45 pode-se observar as estruturas cristalinas presentes na borda da partícula, sendo que essas estruturas cristalinas não estão presentes após os processos de extração supercrítica (Figura 4.46) assistida por ultrassom com 3 minutos de extração (Figura 4.47) e após 20 minutos de extração (Figura 4.48). Observou-se ainda, que com 20 minutos de extração assistida por ultrassom, a borda da partícula possui mais espaços vazios do que com 3 minutos de extração, corroborando os resultados obtidos para a quantificação das amirinas, em que com tempos maiores de extração outros compostos passam a ser extraídos em quantidade maiores.

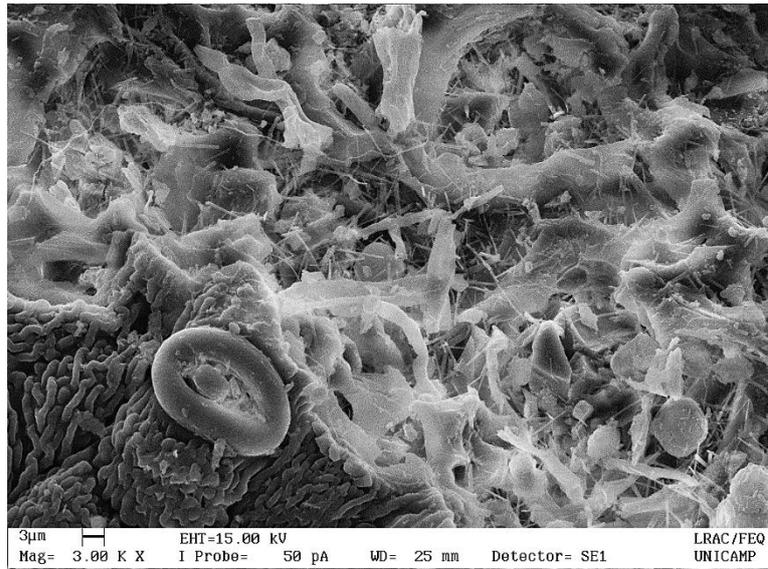


Figura 4.45 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia que não passou por nenhum processo de extração – ampliação 3000 X

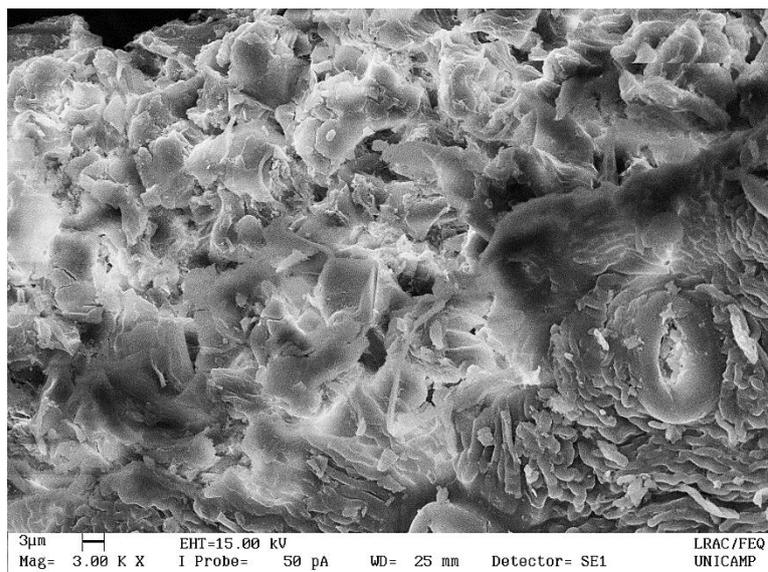


Figura 4.46 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico – ampliação 3000 X

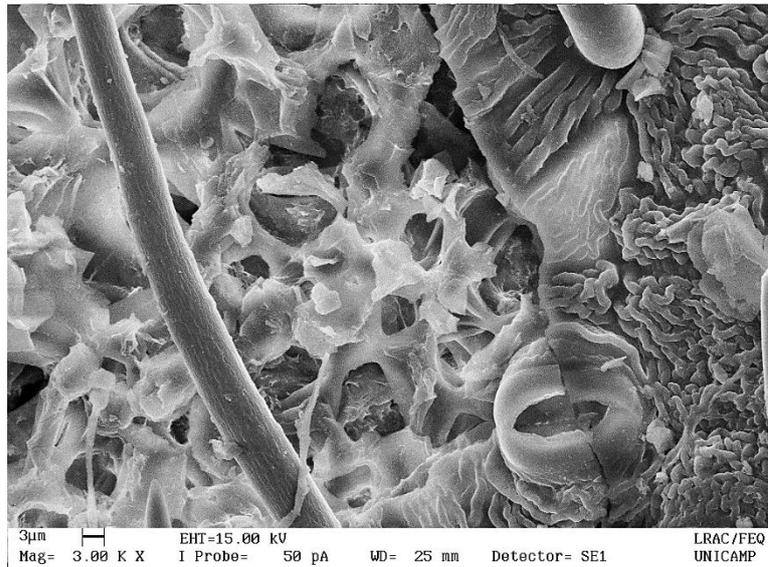


Figura 4.47 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 3 minutos de extração assistida por ultrassom– ampliação 3000 X

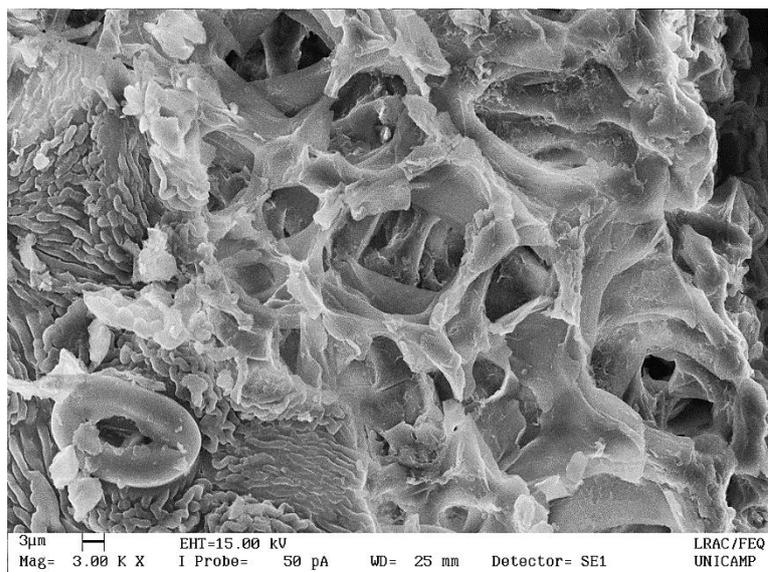


Figura 4.48 - Imagem obtida por MEV da borda uma partícula de folha de uvaia após 20 minutos de extração assistida por ultrassom – ampliação 3000 X

Na Figura 4.49 é apresentado o aspecto visual do extrato de uvaia obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico.

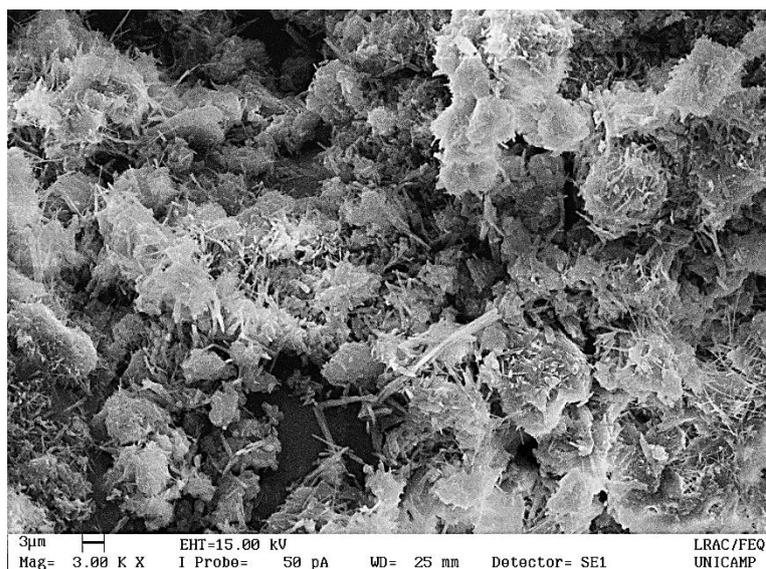


Figura 4.49 - Imagem obtida por MEV do extrato obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico – ampliação 3000 X

O extrato utilizado para obtenção da micrografia foi o obtido com as condições do ponto central do planejamento experimental. Como apresentado anteriormente na Seção 4.5.1, esse extrato apresenta em média  $71,87 \pm 0,33\%$  da mistura de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, acredita-se que os cristais presentes nos extratos que são semelhantes aos observados nas folhas sejam dos isômeros  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina.

#### 4.7 COMPARAÇÃO DOS MELHORES RESULTADOS OBTIDOS EM CADA MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Neste ítem será apresentada uma comparação global dos métodos avaliados nesse estudo levando em consideração os resultados obtidos de uma forma geral, sem relacionar vantagens e desvantagens inerentes a cada processo.

#### 4.7.1 Comparação das cinéticas de extração

Na Figura 4.50 são apresentadas as curvas cinéticas dos três métodos de extração estudados: extração com fluido supercrítico (EFS), extração com solvente assistida por ultrassom e extração por maceração. Para a extração com fluido supercrítico, optou-se por apresentar a curva referente ao ponto com condições de 200 bar e 60 °C por apresentar valores de rendimento final maiores que as demais, facilitando a comparação com as cinéticas dos outros processos.

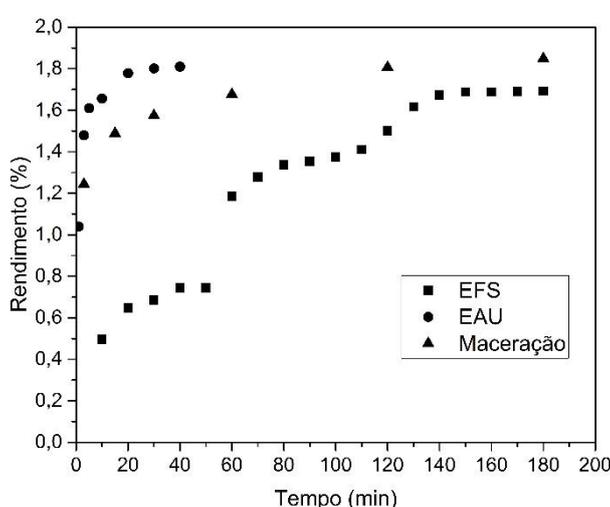


Figura 4.50 - Comparação entre as cinéticas de extração dos métodos estudados

É possível observar que a extração com fluido supercrítico é a mais lenta, com uma taxa de extração inicial menor e chegando ao equilíbrio após 140 minutos. A extração por maceração apresenta uma taxa inicial de extração consideravelmente maior que na EFS, mas o tempo de extração também é elevado, atingindo o equilíbrio próximo de 120 minutos. Entretanto, a extração assistida por ultrassom apresenta taxa inicial maior que dos outros dois processos e tempo de extração consideravelmente menor, chegando ao equilíbrio após 20 minutos de extração.

#### 4.7.2 Comparação dos rendimentos

Para comparar os resultados de rendimento, foram escolhidas as condições com melhores resultados em cada método de extração. Na Tabela 4.21 são apresentados os melhores resultados de rendimento para cada método de extração.

Para a extração com fluido supercrítico o resultado foi obtido na extração com 200 bar, 60 °C e 180 minutos de extração. Para a extração com solvente assistida por ultrassom as condições foram 50 °C, 50 % de potência nominal do ultrassom, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15 e tempo de extração de 40 minutos. Para maceração 50 °C, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15, agitação de 100 RPM e tempo de extração de 180 minutos.

Tabela 4.21 - Comparação dos melhores rendimentos de cada método de extração

Método de extração	Rendimento (%) <sup>*</sup>
EFS	1,69
Ultrassom	1,81
Maceração	1,82

<sup>\*</sup>Os rendimentos são expressos em base seca.

Pode-se observar que os melhores rendimentos obtidos na extração com ultrassom e com maceração são muito próximos e ligeiramente maiores que o rendimento obtido na extração com fluido supercrítico. Contudo, deve levar em conta que para a extração com solvente assistida por ultrassom o tempo de extração foi muito menor que nos demais métodos, para ultrassom foram 40 minutos e para os demais 180 minutos.

#### 4.7.3 Comparação dos resultados dos teores de $\alpha$ -amirina e $\beta$ -amirina nos extratos obtidos

Para comparar os resultados de pureza, foram escolhidas as condições que apresentam os melhores resultados em relação aos teores de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina em cada método de extração, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.22.

Na extração com fluido supercrítico o resultado foi obtido na extração com 100 bar, 60 °C e 180 minutos de extração. Para a extração com solvente assistida por ultrassom as condições foram 50 °C, 50 % de potência nominal do ultrassom, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15 e tempo de extração de 1 minutos. Para maceração 50 °C, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15, agitação de 100 RPM e tempo de extração de 3 minutos.

Tabela 4.22 - Comparação dos melhores resultados de pureza de cada método de extração (%)

Método de extração	$\alpha$ -amirina (%)	$\beta$ -amirina (%)	Total (%)
EFS	28,75	68,68	97,43
Ultrassom	14,61	63,08	77,69
Maceração	14,59	60,52	75,11

É notável que para a extração com fluido supercrítico foi obtido um extrato com pureza muito superior (97,43 %) aos obtidos nas extrações com ultrassom (77,69 %) e por maceração (75,11%) que tiveram resultados próximos.

Entretanto, é importante também comparar os resultados de quantificação de amirina em relação à massa de folhas utilizada. Para esses resultados as melhores condições foram diferentes das encontradas quando avaliou-se a pureza.

Para a extração com fluido supercrítico o resultado foi obtido na extração com 200 bar, 60 °C e 180 minutos de extração. Para a extração com solvente assistida por ultrassom as condições foram 50 °C, 50 % de potência nominal do

ultrassom, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15 e tempo de extração de 40 minutos. Para maceração 50 °C, razão entre massa de folha e volume de solvente igual a 1:15, agitação de 100 RPM e tempo de extração de 180 minutos.

Tabela 4.23 - Comparação dos melhores resultados de massa de amirinas por massa de folhas para cada método de extração (g kg<sup>-1</sup>)

Método de extração	$\alpha$ -amirina	$\beta$ -amirina	Total
EFS	2,49	8,91	11,40
Ultrassom	2,41	9,71	12,13
Maceração	2,11	8,35	10,46

Quando a massa de amirinas obtida é relacionada com a massa de folhas é possível observar que os resultados são muito próximos, pois possivelmente ambos os métodos foram capazes de remover todo o conteúdo de amirinas disponível para extração. Porém, diferenças podem ser observadas novamente no que diz respeito ao tempo de extração utilizado, pois para o ultrassom foram necessários somente 40 minutos enquanto para a extração com fluido supercrítico e para a extração por maceração foram necessários 180 minutos.

Entretanto, deve-se destacar que na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, o extrato é obtido diretamente pela depressurização do fluido, enquanto para a extração assistida por ultrassom são necessárias etapas adicionais até chegar ao extrato seco, como por exemplo, filtração, evaporação com uso de vácuo e secagem forçada em estufa. Tornando-se necessária uma avaliação da viabilidade de cada um desses processos de extração, a fim de determinar qual é mais adequado e em quais circunstâncias deve-se optar por um ou outro.

## 5 CONCLUSÃO

Ao avaliar os métodos não convencionais de extração (extração supercrítica e assistida por ultrassom), foi possível verificar que a extração assistida por ultrassom obteve maior rendimento de extrato (1,81 %).

As quantificações de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina demonstraram elevados teores desses compostos nos extratos, sendo que a extração supercrítica apresentou maior quantidade de amirina por massa de extrato (97,43 %) e apresentou maior seletividade. Contudo, quando avaliada a quantidade em relação à massa de folhas, a extração assistida por ultrassom apresentou resultados melhores (12,13 g de amirina / kg de material vegetal).

Observou-se que as condições experimentais de ambos métodos influenciaram no rendimento e nas quantidades de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, sendo importante o estudo desses métodos a fim de encontrar condições ideais para cada processo. Os fatores que influenciam estatisticamente os resultados de rendimento são: pressão e a interação entre pressão e temperatura na extração com fluido supercrítico e temperatura, razão massa/solvente e a interação entre potência e razão massa/solvente na extração com solvente assistida por ultrassom.

A modelagem matemática resultou em modelos capazes de se ajustar satisfatoriamente aos dados experimentais, sendo que cada modelo foi mais eficiente em diferentes condições. O modelo de Naik ajustou-se melhor às curvas cinéticas de extração nas condições de 100 bar/40 °C, 200 bar/40 °C e 150 bar/50 °C. Já o modelo de Barton, ajustou melhor os dados experimentais das condições 100 bar/60 °C e 200 bar/60 °C.

## REFERÊNCIAS

APEL, M. A. *et al.* Chemical Composition of the Essential Oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section *Dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 191–192, 28 maio 2004.

ARAGÃO, G. F. *et al.* A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006.

ARMSTRONG, L.; DO ROCIO DUARTE, M.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 475–481, 2012.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BARROS, F. W. A *et al.* Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.

BARTON, P.; HUGHES, R. E.; HUSSEIN, M. M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, n. 3, p. 157–162, set. 1992.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509–515, ago. 2001.

CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. [s.l.] Elsevier, 2012.

CHÁFER, A.; BERNA, A. Study of kinetics of the d-pinitol extraction from carob pods using supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 212–215, out. 2014.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

CHING, J. *et al.*  $\beta$ -amyrin from *Ardisia elliptica* Thunb. Is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 275–279, 2010.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. *et al.* Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047–2053, 2011.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul.** [s.l.: s.n.].

COSSUTA, D. *et al.* Supercritical fluid extraction of Vitex agnus castus fruit. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 188–194, 2008.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, maio 2001.

CYBORAN, S. *et al.* Phenolic content and biological activity of extracts of blackcurrant fruit and leaves. **Food Research International**, v. 65, p. 47–58, 2014.

DANLAMI, J. M. *et al.* A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605–626, 2014.

DAWIDOWICZ, A. L. *et al.* Application of PLE for the determination of essential oil components from Thymus vulgaris L. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 878–84, 15 ago. 2008.

DE 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.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. SEPARAÇÃO SEMIPREPARATIVA DE  $\alpha$  E  $\beta$ -AMIRINA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704–706, 2011.

DÍAZ-RUIZ, G. *et al.* Growth inhibition of streptococcus from the oral cavity by  $\alpha$ -Amyrin esters. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12603–12611, 2012.

DO NASCIMENTO, L. A. S. *et al.* Biflavones and triterpenoids isolated from Ouratea castaneifolia (DC.) Engl., Ochnaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 823–827, 2009.

HALDAR, S. *et al.* Lipase mediated separation of triterpene structural isomers,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 19, p. 3122–3125, maio 2014.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, M. *et al.* Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of Sideritis candicans Ait. var. eriocephala Webb aerial part. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 279–284, 2004.

HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L. *et al.* Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 3, p. 476–480, 2010.

HERNANDEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCA, A. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities. In: **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. [s.l.] InTech, 2012. v. 426p. 478–502.

HOLANDA PINTO, S. A. *et al.* Antinoceptive effect of triterpenoid  $\alpha$ , $\beta$ -amyryn in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 630–634, 2008.

IBAÑEZ, E. *et al.* Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: HAYES, M. (Ed.). **Marine Bioactive Compounds SE - 2**. [s.l.] Springer US, 2012. p. 55–98.

JOHANN, S. *et al.* Antifungal activity of the amyryn derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 2, p. 148–53, ago. 2007.

KANNAN, S. *et al.* Insect antifeedant and growth regulating activities of  $\beta$ -amyryn from *Sarcostemma acidum*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 1167–1168, 2013.

KARABEGOVIĆ, I. T. *et al.* The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 142–148, 2014.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 56, n. 3, p. 197–213, 2008.

KNEZ, Ž. *et al.* Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 2013.

KO, T. F.; WENG, T. M.; CHIOU, R. Y. Squalene Content And Antioxidant Activity Of *Terminalia catappa* Leaves And Seeds. **J. Agri. Food Chem.**, v. 50, p. 5343–5348, 2002.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. **Talanta**, v. 53, n. 4, p. 771–782, 2001.

LUO, H. *et al.* Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. **Chemistry Central journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2014.

LUZIA, D.; BERTANHA, B.; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista do Instituto ...**, v. 69, n. 2, p. 175–180, 2010.

LUZIA, D. M. M.; N., J. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231–235, 2013.

MATOS, I. *et al.* Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. **Molecular Immunology**, v. 54, n. 3-4, p. 482–492, 2013.

MATTOS, J. R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. **Roessléria**, v. 6, n. 1, p. 163–167, 1984.

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, jan. 1989.

NARENDER, T. *et al.* Synthesis of  $\alpha$ -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1215–1222, 2009.

OLIVEIRA, A. P. *et al.* Further insight into the latex metabolite profile of *ficus carica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10855–10863, 2010.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* Pentacyclic triterpenoids,  $\alpha,\beta$ -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 719–725, 2004a.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta medica**, v. 70, n. 8, p. 780–2, ago. 2004b.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 978–989, jul. 2011.

PADOVAN, A. *et al.* The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, p. 695–716, 2013.

PEREIRA, M. C. *et al.* Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

PERES, M. T. L. P. *et al.* Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 836–846, 2013.

PYO, D.; KIM, E. Rapid and Efficient Extraction of Curcumins from Curry Powder Using. v. 35, n. 10, p. 3107–3110, 2014.

RASEIRA, M. *et al.* Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil. **Embrapa Clima Temperado**, p. 122p., 2004.

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

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

SANTOS, F. *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 98, 2012.

SHARIF, K. M. *et al.* Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SIHVONEN, M. *et al.* Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 6-7, p. 217–222, 1999.

SILVA, J. R. D. A *et al.* Analysis of the Hexane Extracts From Seven Oleoresins of *Protium* Species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 4, p. 305–308, 2011.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. The Journal of Supercritical Fluids Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 311–318, 2014.

SOLDI, C. *et al.* Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, p. 411–417, 2004.

SOVOVÀ, H.; STATEVA, R. P. Supercritical fluid extraction from vegetable materials. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 27, n. 3-4, p. 79–156, 2011.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): Avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7–13, 2009.

THIMMAPPA, R. *et al.* Triterpene biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v. 65, n. January, p. 225–57, 2014.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L. DE; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183–187, mar. 2005.

VIGANÓ, J. *et al.* Exploring the selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 1–10, abr. 2016.

VILKHU, K. *et al.* Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161–169, 2008.

WAGH, S. J.; GUJAR, J. G.; GAIKAR, V. G. Experimental and modeling studies on extraction of amyryns from latex of mandar (*Calotropis gigantea*). **INDIAN JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY**, v. 19, n. 6, p. 427–433, nov. 2012.